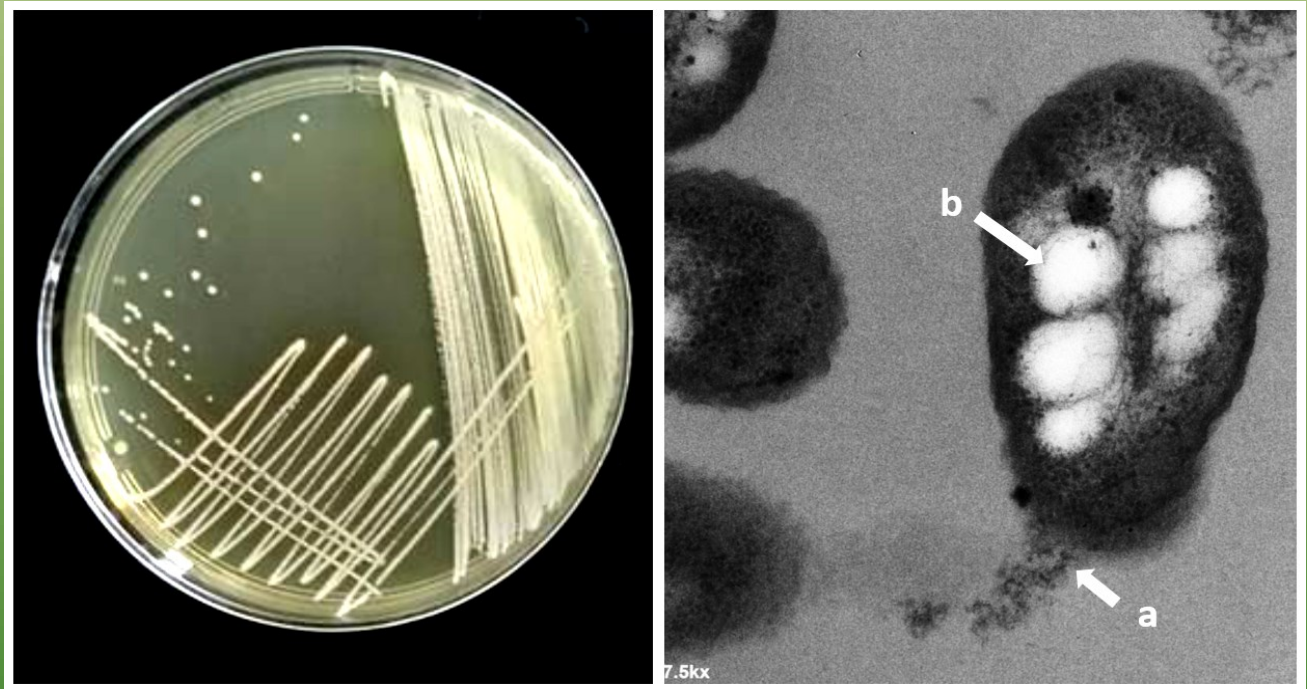


# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

*Fully Bilingual*

VOLUMEN 38, NÚMERO 3, Septiembre 2020



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

**Eitor en Jefe \* Editor in Chief**

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

**Editora Técnica \* Technical Editor**

Dra. Norma Ávila Alistac, UAM-Xochimilco

**Composición Web y RMFito \* Web and RMFito Composition**

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, COLPOS

Ing. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

**Editoras Adjuntas \* Senior Editors**

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH

Dra. Silvia Bautista Baños, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

**Comité Editorial Internacional \* International Editorial Advisory Board**

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA

Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA

**Editoras(es) Asociados en este Número \* Associate Editors in this Number**

Dra. María Guadalupe Guerra Sánchez, IPN

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

Dr. Gabriel Rincón Enríquez, CIATEJ

Dr. Rodolfo Velásquez Valle, INIFAP

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, CIAD

Dr. Alejandro C. Michel Aceves, CSAEGro.

Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, INIFAP

Dr. Guillermo Alejandro Solís Sánchez, CIATEJ

Dr. César del Ángel Hernández Galeno, INIFAP

Dr. Raúl Allende Molar, UV

Dr. Gregg Evans, Driscoll's

Dr. Alejandro Tovar Soto, IPN

Dr. Rodrigo A. Valverde, LSU

Dr. David Espinosa Victoria, CP

Dr. Rómulo García Velasco, UAEM

Dr. José Armando Carrillo Fasio, UAS

Dr. Misael Martínez Bolaños, INIFAP

Dr. Remigio A. Guzmán Plazola, COLPOS

---

**Portada:** Cultivo de la bacteria *Burkholderia cepacia* BUAP-AM51 en agar de soya y tripticaseína. Microscopía electrónica de transmisión de *B. cepacia*, con flagelo monotrico polar degradado (a) y gránulos de polihidroxibutirato (b) en el citoplasma celular.

**Original:** Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. Pág. 339.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS \* SCIENTIFIC ARTICLES

- Interaction between *Mycodiplosis* and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*)** \* Interacción entre *Mycodiplosis* y *Hemileia vastatrix* en tres escenarios de manejo del cultivo de café (*Coffea arabica*). 320  
Santiago-Elena E, Zamora-Macorra EJ, Zamora-Macorra M and Elizalde-Gaytan KG.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN \* REVIEW ARTICLES

- The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity** \* El género *Burkholderia*: entre el mutualismo y la patogenicidad. 337  
Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M.
- Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms** \* Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos. 360  
Gálvez-Irqui AC, Plascencia-Jatomea M and Bautista-Baños S.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS \* PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Fast method applied in previous evaluation of resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*** \* Método rápido aplicado en evaluación previa de resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 384  
García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Yanes-Paz E, Lorenzo-Feijoo JC and Companioni-González B.
- Symbiotic bacteria associated to *Prosthechea citrina*, a Mexican endemic orchid** \* Bacterias simbióticas asociadas a *Prosthechea citrina*, una orquídea endémica de México. 398  
Santiago-Gerónimo T, Lozoya-Saldaña H and Rodríguez-Mejía ML.
- Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection** \* Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. 408  
Reyes-Zambrano SJ, Lecona-Guzmán CA, Gutiérrez-Miceli FA, Santana-Buzzy N, Islas-Flores I, Tzec-Simá M, Barredo-Pool FA, Ruiz-Lau N and Ávila-Miranda ME.
- Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*** \* Identificación del *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima*. 420  
Jacobó-Villegas O, Colinas-León MT, Lozoya-Saldaña H, Alía-Tejacal I, Camacho-Tapia M, Leyva-Mir SG, Tovar-Pedraza JM and Pérez-Nicolás M.

**Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*** \* Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*. 434  
Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA.

**Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*** \* Bacterias antagonicas para control en bioespacio del manchado de jamaica (*Corynespora cassiicola*) en *Hibiscus sabdariffa*. 450  
Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J.

**Nematodes associated with the lychee crop (*Litchi chinensis*) in Oaxaca, Mexico** \* Nematodos asociados con el cultivo de litchi (*Litchi chinensis*) en Oaxaca, México. 463  
Martínez-Bolaños M, Martínez-Bolaños L, Martínez-Reyes R, Avendaño-Arrazate CH, Cruz-Chávez MA and Gálvez-Marroquín LA.

#### REPORTES FITOPATOLÓGICOS \* PHYTOPATHOLOGICAL REPORTS

**Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico** \* Aislamiento de *Fusarium* de plantas de vainilla cultivadas en la Huasteca Potosina México. 475  
Hernández-Martínez JL, Carranza-Álvarez C, Maldonado-Miranda JJ and Martínez-Soto D.

**CP-Elvia 3, new white maize variety resistant to tar spot complex for Mexican subtropical areas** \* CP-Elvia 3, nuevo maíz blanco resistente al complejo de la mancha de asfalto para subtrópico de México. 485  
De León-García de Alba C.

# Interaction between *Mycodiplosis* and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*)

## Interacción entre *Mycodiplosis* y *Hemileia vastatrix* en tres escenarios de manejo del cultivo de café (*Coffea arabica*)

Eduardo Santiago-Elena<sup>1</sup>, Erika Janet Zamora-Macorra<sup>1\*</sup>, Mireya Zamora-Macorra<sup>2</sup>, Karla Giovana Elizalde-Gaytan<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C.P. 56230. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960. México. \*Autor para correspondencia: erikazam@gmail.com

Recibido: 08 de Mayo, 2020.

Aceptado: 06 de Agosto, 2020.

Santiago-Elena E, Zamora-Macorra EJ, Zamora-Macorra M and Elizalde-Gaytan KG. 2020. Interaction between *Mycodiplosis* and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*). Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 320-336.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-2

Primera publicación DOI: 17 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 17, 2020.

**Resumen.** La roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) es una enfermedad devastadora para los cafetales en México. Los métodos de control se han centrado en el uso de fungicidas, pero sin éxito, por lo que el control biológico representa una alternativa. Las larvas de *Mycodiplosis* se reportan como depredadoras de *H. vastatrix*, pero la información disponible sobre este insecto es limitada. Los objetivos de esta investigación fueron describir el tipo de relación entre *H. vastatrix* y *Mycodiplosis* y conocer su patrón de distribución en el dosel de la planta. Se eligieron tres plantaciones con incidencia

**Abstract.** Coffee rust (*Hemileia vastatrix*) is a devastating disease for coffee plantations in Mexico. Control methods have focused on the use of fungicides, with no success, so biological control represents an alternative. *Mycodiplosis* larvae are reported as predators of *H. vastatrix* but the information available about this insect is limited. The objectives of this research were to describe the type of relationship between *H. vastatrix* and *Mycodiplosis*, and to know their distribution pattern in the plant canopy. Three plots with a high incidence of coffee rust in Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, were sampled and were registered periodically the severity of the rust and the number of larvae of *Mycodiplosis* per strata of the canopy. 25 plants per plot were selected, sampled in “cinco de oros”. Larvae were molecularly identified. Using the Kruskal Wallis test, differences were detected in the number of sampling sites in the severity of rust and the number of *Mycodiplosis* larvae, detecting a positive correlation between the severity of rust and the number of *Mycodiplosis* larvae. The *Mycodiplosis* distribution was similar in the strata

de roya en Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla y se registraron periódicamente la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* por estrato de la planta. Se seleccionaron 25 plantas por parcela, muestreada en cinco de oros. Las larvas se identificaron molecularmente. Mediante la prueba de Kruskal Wallis, se encontraron diferencias significativas entre sitios de muestreo en la severidad de roya y el número de larvas de *Mycodiplosis*, detectando una correlación positiva entre la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis*. La distribución de *Mycodiplosis* fue similar en los estratos (baja, media y alta) de las plantas evaluadas.

**Palabras clave:** Roya del cafeto, micófago, control biológico, incidencia, severidad.

La roya del cafeto es una enfermedad causada por el basidiomiceto *Hemileia vastatrix* (Uredinales: Pucciniaceae). Desde el 2012 esta enfermedad se catalogó como destructiva en Centroamérica ya que afectó del 30 al 100% de la producción de los cafetales (Henderson, 2020). En México la roya se encuentra presente en toda el área sembrada con variedades susceptibles, y se ha registrado una disminución en la producción de café cereza desde el 2012, cuando se obtuvieron 1 336 882 t, comparado con el 2018 con una producción de 835 380 t (SAGARPA-SENASICA 2016; SAGARPA-SIAP 2018).

El ciclo de la roya inicia por la deposición y germinación de uredosporas en las hojas; la infección depende de varios factores ambientales y fisiológicos de la planta, pero los principales son la cantidad de lluvia, la temperatura, la edad de las hojas y la carga de inóculo (Nutman y Roberts, 1963). Las uredosporas son dispersadas dentro de una plantación a través del viento o por salpique del agua

(low, medium and high) of the evaluated plants.

**Key words:** Coffee rust, mycophagus, biological control, incidence, severity.

Coffee rust is a disease caused by the basidiomycete *Hemileia vastatrix* (Uredinales: Pucciniaceae). Since 2012, this disease has been catalogued as destructive in Central America, since it has destroyed 30% of all coffee crop productions (Henderson, 2020). In Mexico, rust is present in all areas containing susceptible varieties, and a reduction has been registered in the production of cherry coffee since el 2012, when 1,336,882 t were produced, in comparison with 2018, in which 835,380 t were produced (SAGARPA-SENASICA 2016; SAGARPA-SIAP 2018).

The rust cycle begins with the deposition and germination of uredospores on the leaves; the infection depends on several environmental and physiological factors of the plant, although the main ones are the amount of rainfall, temperature, age of leaves and inoculant (Nutman and Roberts, 1963). Uredospores are scattered throughout a plantation by the wind or the splashing of rainwater (Nutman and Roberts, 1963; Rayner 1961; Arroyo *et al.*, 2018). Rust reduces the photosynthetic ability of plants and the development of the new sprouts in the next planting cycle. A high severity one year will directly affect the production level of the following year, causing a gradual reduction in growth, which triggers defoliations, followed by the progressive death of sprouts and branches (CABI, 2018).

An alternative for the management of rust is the genetic resistance of the varieties. The hybrid Catimor and the variety Robusta have proven to be more tolerant to the disease than the variety Arabiga; however, tolerance is rarely effective against all the

de lluvia (Nutman y Roberts, 1963; Rayner 1961; Arroyo *et al.*, 2018). La roya reduce la capacidad fotosintética de la planta y el desarrollo de los nuevos brotes en el siguiente ciclo de cultivo. La severidad alta de un año afectará directamente el nivel de producción del siguiente, provocando una reducción paulatina del crecimiento, que inicia con defoliaciones y posteriormente con muerte progresiva de brotes y ramas (CABI, 2018).

Una alternativa para el manejo de la roya es la resistencia genética de las variedades. El híbrido Catimor y la variedad Robusta han demostrado ser más tolerantes contra la enfermedad a diferencia de la variedad Arábica; sin embargo, la tolerancia es raramente efectiva contra todas las razas del patógeno (CABI, 2018). Independientemente de la variedad, para prevenir o controlar esta enfermedad se utiliza con frecuencia la aplicación de fungicidas a base de compuestos de cobre (Haddad *et al.*, 2009; Loland y Singh, 2004); sin embargo, éstos pueden ocasionar problemas al ecosistema ya que el cobre se acumula en el suelo y genera toxicidad en las cadenas tróficas al acumularse en altas concentraciones (Loland y Singh, 2004). Aplicaciones aisladas y tardías, cercanas a la época de cosecha o después de la misma, son ineficientes para el control (Martínez *et al.*, 2013). También se recomiendan aplicaciones de algunos fungicidas sistémicos (Martínez *et al.*, 2013); no obstante, estos productos no son selectivos y afectan a hongos entomopatógenos, como *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae), que ayuda a reducir las poblaciones plaga del cafeto, como la escama verde (*Coccus viridis*, Hemiptera: coccidae) (Jackson *et al.*, 2012).

Una alternativa ambientalmente amigable recomendada para el manejo de cualquier enfermedad es el uso de agentes de control biológico. En este sentido, existen insectos micófitos como las larvas del género *Mycodiplosis* (Diptera: Cecidomyiidae)

breeds of the pathogen (CABI, 2018). Regardless of the variety, in order to prevent or control this disease, fungicides based on copper compounds are frequently used to prevent or control this disease (Haddad *et al.*, 2009; Loland and Singh, 2004). Nevertheless, these may bring problems to the ecosystem, since the copper accumulates in the soil and generates toxicity in the trophic chains when it accumulates in high concentrations (Loland and Singh, 2004). Late, isolated applications near to or after the harvesting season are inefficient for the control (Martínez *et al.*, 2013). The use of some systemic fungicides is also recommended (Martínez *et al.*, 2013); however, these products are not selective and will affect entomopathogenic fungi, such as *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Cordycipitaceae), which help reduce coffee pest populations, such as green scale (*Coccus viridis*, Hemiptera: coccidae) (Jackson *et al.*, 2012).

A recommended eco-friendly alternative for the management of any disease is the use of biological control agents. In this sense, mycophagous insects such as the larvae of the genus *Mycodiplosis* (Diptera: Cecidomyiidae) (Kiel, 2014) feed off rust (Basidiomycota: Pucciniales) or mildew (Erysiphales) (Holz, 1970). The number of *Mycodiplosis* species that feed of rust spores, their frequency and distribution is unknown, since few studies have examined the relation between *Mycodiplosis* and the fungi they feed off (Kiel, 2014). *M. hemileiae* is believed to be a potential *H. vastatrix* biological control agent in Latin America and the Caribbean (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016). Kaushal *et al.* (2001) suggest that the relation helps host plants, since the larva reduces the amount of fungal spores. However, Kluth *et al.* (2001) suggest that diptera could function as dissemination agents of the fungus in the plant. Due to this, the aims of the present investigation were to: 1) Describe the type of relation between

(Kiel, 2014), que se alimentan de royas (Basidiomycota: Pucciniales) o cenicillas (Erysiphales) (Holz, 1970). Se desconoce el número de especies de *Mycodiplosis* que se alimentan de esporas de roya, así como su frecuencia y distribución, ya que hay pocos estudios que han examinado la relación entre *Mycodiplosis* y los hongos de los que se alimentan (Kiel, 2014). Se cree que *M. hemileiae* es un agente de control biológico potencial de *H. vastatrix* en Latinoamérica y el Caribe (Hajian-Foroshani *et al.*, 2016). Kaushal *et al.* (2001) sugieren que la relación ayuda a las plantas hospedantes, ya que la larva reduce la cantidad de esporas del hongo; sin embargo, Kluth *et al.* (2001) sugiere que los dípteros podrían servir como dispersores del hongo en la planta. Por lo anterior, los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Describir en tres diferentes sistemas de manejo del cultivo, el tipo de relación entre la roya del café (*H. vastatrix*) y *Mycodiplosis* spp. y 2) Conocer el patrón de distribución de *Mycodiplosis* spp. y de *H. vastatrix* en el dosel de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de muestreo.** La investigación se realizó en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, México; en parcelas con plantas de café (*Coffea arabica*) de diversas variedades (Costa Rica 95, Caturra, Colombiana y Borbón) y edades (10 a 35 años). Se seleccionaron tres parcelas, la primera se ubicó en la localidad de Santa Lucía (19° 58' 17" N; 97° 38' 05" O), a 964 metros sobre el nivel del mar (msnm). La segunda se ubicó en Cuetzinapan (19° 58' 39" N; 97° 3' 08" O) a 930 msnm, y la tercera se ubicó en San Bernardino (19° 58' 44" N; 97° 38' 26" O) a 903 msnm. En Santa Lucía se realizaron siete aplicaciones de fungicidas de contacto (oxi-cloruro de cobre y sulfato de cobre pentahidratado),

coffee rust (*H. vastatrix*) and *Mycodiplosis* spp. in three different crop management systems and 2) to know the distribution patterns of *Mycodiplosis* spp. and *H. vastatrix* in the canopy of the plant.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling site.** This investigation was carried out in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla, Mexico, in plots with coffee plants (*Coffea arabica*) of diverse varieties (Costa Rica 95, Caturra, Colombiana and Borbón) and ages (10 to 35 years). Three plots were chosen, the first of which was located in Santa Lucía (19° 58' 17" N; 97° 38' 05" W), at 964 meters above sea level (masl). The second was located in Cuetzinapan (19° 58' 39" N; 97° 38' 08" W) at 930 masl and the third, in San Bernardo (19° 58' 44" N; 97° 38' 26" W) at 903 masl. In Santa Lucía, seven rounds of contact fungicides (copper oxychloride and copper sulfate pentahydrate) were applied, along with six of systemic fungicides (Cyproconazole, Epoxiconazole, Flutriazole and Azoxystrobin+Cyproconazole), two foliar fertilizations and four nitrogen fertilizations on the soil. In Cuetzinapan, only six rounds of contact fungicides (copper oxychloride and copper sulfate pentahydrate) were applied, along with three rounds of systemic fungicides (Cyproconazole, Epoxiconazole and Azoxystrobin+Cyproconazole), one foliar fertilization and three nitrogen fertilizations on the soil. No fungicide was applied in San Bernardo, but one round of foliar fertilization was applied, along with three nitrogen fertilizations on the soil. In all sites, phytosanitary and formation prunings were carried out.

**Molecular identification of *Mycodiplosis*.** The identification was performed with the molecular



seis de fungicidas sistémicos (Ciproconazol, Epoxiconazol, Flutriazol y Azoxistrobin+Ciproconazol), dos fertilizaciones foliares y cuatro fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En Cuetzinapan solo se realizaron seis aplicaciones de fungicidas de contacto (oxicloruro de cobre y sulfato de cobre pentahidratado), tres de fungicidas sistémicos (Ciproconazol, Epoxiconazol y Azoxistrobin+Ciproconazol), una fertilización foliar y tres fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En San Bernardino no se realizaron aplicaciones de fungicidas y se hizo una fertilización foliar y tres fertilizaciones de nitrógeno al suelo. En todos los sitios se hicieron podas fitosanitarias y de formación.

**Identificación molecular de *Mycodiplosis*.** La identificación se realizó mediante el análisis molecular de secuencias del gen mitocondrial COI, ya que para la caracterización taxonómica a especie es necesario describir morfológicamente a machos adultos (Henk *et al.*, 2011) y su recolección en campo es complicada. Por lo tanto, en cada parcela seleccionada se recolectaron cinco larvas del primer al tercer instar en cada planta de cafeto evaluada para severidad. En total se recolectaron 125 larvas por parcela, las cuales se colocaron en frascos con etanol al 70%, se etiquetaron y se transportaron al laboratorio del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo en Texcoco, estado de México.

La extracción de ADN total se hizo con 30 larvas de cada sitio muestreado. Las larvas se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril para eliminar el exceso de etanol y posteriormente se transfirieron en un tubo eppendorf que contenía CTAB al 2% + 1% de 2-Mercaptoetanol; se maceraron con ayuda de un micropistilo y se incubaron con proteinasa K al 10% durante 1 hora a 65 °C. La separación de fases se realizó con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugación durante 15 minutos a 13000 rpm. Para la precipitación, se

analysis of sequences on the mitochondrial COI gene, since the morphological description of adult males is necessary for the taxonomic characterization by the species (Henk *et al.*, 2011) and gathering them on the field is complicated. Therefore, in each plot selected, five larvae were gathered, from the first to the last instar, in each coffee plant evaluated for severity. A total of 125 larvae were gathered, per plot, then placed in jars containing ethanol at 70%, labelled and transported to the laboratory in the Colegio de Postgraduados, Montecillo campus in Texcoco, State of Mexico.

The total DNA extraction was performed with 30 larvae in each site sampled. The larvae were rinsed three times in sterile distilled water to remove excess ethanol and later transferred to an Eppendorf tube containing CTAB at 2% + 1% of 2-Mercaptoethanol; they were macerated using a micropistile and incubated with K proteinase at 10% for 1 hour at 65 °C. The phases were separated using chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and centrifuged for 15 minutes at 13000 rpm. For precipitation, recovered phase IV of ethanol at 100% was exposed for 30 minutes to a temperature of -20 °C. It was then centrifuged for 15 min at 13000 rpm to recover the pellet, which was dissolved in 30 µL of HPLC water. The concentration and integrity of the DNA was corroborated in a Nanodrop. For the PCR (Polymerase Chain Reaction), the primers (HCO and LCO) were used, along with conditions of amplification described by Vrijenhoek (1994). These amplified a region of ~710 pairs of bases of the mitochondrial gene cytochrome C oxidase subunit I (COI). The PCR products of the expected weight were purified using the kit Wizard® and sent for sequencing to Macrogen® (Seoul, Korea). The sequences were cleaned using the program BioEdit, and compared with the data base available in the GenBank. The best sequence was uploaded onto this system to obtain the access number.

colocó a la fase recuperada 1V de etanol al 100% y se colocó por 30 minutos a -20 °C. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm para recuperar la pastilla, la cual fue disuelta en 30 µL de agua HPLC. La concentración e integridad del ADN se corroboró en un Nanodrop. Para la PCR (Polymerase Chain Reaction) se utilizaron los primers (HCO y LCO) y condiciones de amplificación descritos por Vrijenhoek (1994), estos amplifican una región de ~710 pares de bases del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI). Los productos de PCR del peso esperado, se purificaron con el kit Wizard® y se enviaron a secuenciar a Macrogen® (Seul, Corea). Las secuencias se limpiaron con el programa BioEdit, y se compararon con la base de datos disponibles en el GenBank. La mejor secuencia se subió en este sistema para obtener el número de acceso.

**Evaluación de la severidad por roya.** En cada parcela se realizó un muestreo en cinco de oros y se marcaron cinco plantas por punto, para tener 25 plantas en total. El dosel de la planta se dividió en tres estratos: bajo (< 40 cm), medio (41-80 cm) y alto (>80 cm); se eligieron aleatoriamente tres hojas de cada estrato y se evaluaron individualmente con la escala desarrollada por DGSV-SINAVEF-LANREF (2016) con modificaciones, donde 0= hoja sana sin pústulas, 1= 0.5-1% de cobertura con pústulas (más de un punto clorótico en la hoja), 2= 1-5%, 3= 6-20%, 4= 21-50% y 5 >50%. En total se hicieron seis evaluaciones que iniciaron en julio de 2017 y finalizaron en enero 2019.

**Evaluación del número de larvas de *Mycodiplosis*.** Se realizó en las mismas plantas y hojas seleccionadas para evaluar la severidad ocasionada por roya. De cada hoja seleccionada previamente se contabilizó y registró el número de larvas de *Mycodiplosis* por hoja, para tener en total tres

**Evaluation of rust severity.** In each plot, a 5-point sampling was carried out and five plants were marked in each point, for a total of 25 plants. The plant's canopy was divided into three strata: low (< 40 cm), middle (41-80 cm) and high (>80 cm); three leaves were chosen at random from every stratum and evaluated individually with the scale developed by DGSV-SINAVEF-LANREF (2016) with modifications, where 0= healthy leaf without pustules, 1= 0.5-1% of surface with (more than one chlorotic spot on the leaf), 2= 1-5%, 3= 6-20%, 4= 21-50% and 5 >50%. In total, six evaluations were carried out, starting in July 2017 and ending in January 2019.

**Evaluation of the number of *Mycodiplosis* larvae.** This was carried out on the plants and leaves selected to evaluate the severity caused by the rust. Out of each previously selected leaf, the number of *Mycodiplosis* larvae was counted and recorded per leaf, to obtain a total of three measurements per stratum and nine for every marked plant. The evaluations were carried out at the same time as the measurement of rust severity.

**Statistical analysis and determination of the relation between severity and number of larvae.** Averages were compared with a non-parametric Kruskal Wallis test between the three sampling sites; the rust severity data were used, along with the number of *Mycodiplosis* larvae evaluated in the three strata of the plants (low, middle and high). A reliability of 95% and an alpha of 0.05% were considered. A *spearman* correlation analysis was carried out between the rust severity tests and *Mycodiplosis* to identify whether there is a tendency between the degree of infection and the number of larvae for each plant stratum (low, middle and high). The data were analyzed by sampling site using the program SAS JMP 11.0.

mediciones por estrato y nueve por planta marcada. Las evaluaciones se hicieron simultáneamente con la medición de severidad por roya.

**Análisis estadístico y determinación de la relación entre severidad y número de larvas.** Se realizó una comparación de medias a través de la prueba no paramétrica Kruskal Wallis entre los tres sitios de muestreo, se utilizaron los datos de severidad de roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* evaluados en los tres estratos de la planta (bajo, medio y alto). Se consideró una confiabilidad del 95% y un alfa del 0.05%. También se realizó un análisis de correlación de *spearman* entre los datos de severidad de roya y *Mycodiplosis* para identificar si existe una tendencia entre el grado de infección y el número de larvas por cada estrato de la planta (bajo, medio y alto). Los datos se analizaron por sitios de muestreo, mediante el programa JMP 11.0 de SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación de *Mycodiplosis*.** La secuencia consenso obtenida se registró en la base de datos del GenBank (número de acceso MK986689) y al compararla con otras secuencias se obtuvo un 95% de similitud con ejemplares de la familia Cecidomyiidae. Existe poca información disponible en las bases de datos sobre especies de *Mycodiplosis* y en general, es un género poco estudiado. Los miembros de este género son descritos por la morfología de los machos adultos. Existen 49 especies descritas y depositadas en el Museo Nacional de Historia Natural de Jamaica y Estados Unidos de América. Se cree que puede haber un grado de especialización entre las especies de *Mycodiplosis* y las especies de las cuales se alimentan; aunque se han encontrado a una misma especie alimentándose de

## RESULTS AND DISCUSSION

**Identification of *Mycodiplosis*.** The consensus sequence obtained was registered in the GenBank data base (accession number MK986689), and comparing it with other sequences, a 95% similarity was obtained with specimens of the Cecidomyiidae family. There is little information available in the data bases on *Mycodiplosis* species, and in general terms, it is a scarcely studied genus. The members of this genus are described by the morphology of adult males. There are 49 species described and deposited in the Natural History Museum of Jamaica and the United States of America. It is believed that a degree of specialization may exist between the species of *Mycodiplosis* and the species off of which they feed; although one same species has been found to feed off of different species of rust, such as *M. rubida*, which was described in *Uromyces pisi* (Pucciniales: pucciniaceae) and *Puccinia* sp. (Pucciniales: pucciniaceae). The degree of specialization between the *Mycodiplosis* species is uncertain (Nelsen, 2013).

The phylogenetic analysis carried out on this genus in 2013 was performed with larvae from 261 collections of plants, botanized and infected by fungi. This analysis did not contemplate any coffee plant infected with *Hemileia vastatrix*, (Nelsen, 2013). Further and more profound research is necessary in order to be able to describe the mycophagous species involved.

**Evaluation of rust severity and number of *Mycodiplosis* larvae.** The climate in Xochitlán de Vicente Suárez is classified as Cfa (subtropical humid), with an average temperature of 19.8 °C and annual rainfalls of around 3,293 mm (SMN-CNA, 2018). These conditions promote the development of rust, which is more severe in coffee plantations located at altitudes below 1500 masl, in

diversas especies de royas, como *M. rubida* que fue descrita en *Uromyces pisi* (Pucciniales: pucciniaceae) y *Puccinia* sp. (Pucciniales: pucciniaceae). El grado de especialización entre las especies de *Mycodiplosis* es incierto (Nelsen, 2013).

El análisis filogenético de este género realizado en el 2013 se hizo con larvas provenientes de 261 colecciones de plantas herborizadas e infectadas por hongos, en este análisis no se contempló a alguna planta de cafeto infectada con *Hemileia vastatrix*, (Nelsen, 2013). Es necesario hacer investigación más profunda al respecto para poder describir la o las especies micófagas involucradas.

**Evaluación de severidad por roya y número de larvas de *Mycodiplosis*.** El clima de Xochitlán de Vicente Suárez está clasificado como Cfa (subtropical húmedo), con temperatura promedio de 19.8 °C y precipitaciones anuales alrededor de 3 293 mm (SMN-CNA, 2018), condiciones que favorecen el desarrollo de roya, ya que la enfermedad es más severa en cafetales ubicados en altitudes menores de 1500 msnm, en temperaturas cálidas y con periodos de humedad prolongados (CABI, 2018); por lo que durante la presente investigación siempre hubo prevalencia de la enfermedad en los sitios seleccionados.

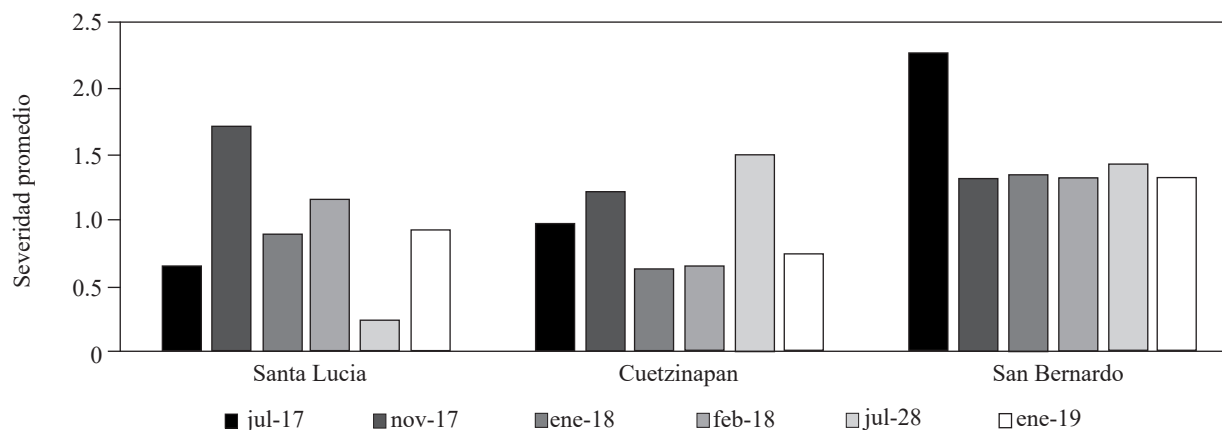
En Santa Lucia y Cuetzinapan se realizaron aplicaciones de fungicidas sistémicos y de contacto, a diferencia de San Bernardo donde no se hicieron aplicaciones. Los datos demuestran que las aplicaciones mantuvieron la severidad de la roya en niveles más bajos que en donde no se realizó un control químico. Los fungicidas actúan directamente sobre la intensidad de esporulación y limitan las áreas con uredosporas (Merle *et al.*, 2019). No obstante, la fluctuación de la severidad fue mayor en Santa Lucia y Cuetzinapan a diferencia de San Bernardo, en donde se mantuvo estable (Figura 1). Además, se encontró que la severidad por roya en

warm temperatures and with prolonged periods of humidity (CABI, 2018); therefore, throughout the present investigation, the diseased always prevailed in the selected sites.

In Santa Lucia and Cuetzinapan, rounds of systemic fungicides were applied, unlike in San Bernardo, where no rounds were applied. The data show that the applications kept rust severity at lower levels than in places in which no chemical control was applied. Fungicides act directly on the intensity of sporulation and they limit the areas with uredospores (Merle *et al.*, 2019). However, the fluctuation of the severity was greater in Santa Lucia and Cuetzinapan, unlike in San Bernardo, where it was stable (Figure 1). Additionally, rust severity was found to be similar in Cuetzinapan and in Santa Lucia, although less fungicide and fertilizer was applied in the former, indicating that the number of fungicide applications could be reduced without reducing the effectiveness of the control.

In regard to *Mycodiplosis*, the presence of larvae was also observed in all the evaluations performed, and the site with the highest population density was San Bernardo, while Cuetzinapan and Santa Lucia were similar (Figure 2). Given that the larvae of this diptera feed off of uredospores, it seems that, the higher their availability, the higher the number of larvae. However, greater evidence is required to determine if the functional response of larvae to the fluctuation of uredospores is not linear (Davies, 2007).

**Severity and number of larvae.** The Kruskal-Wallis analysis displayed significant differences between the sampling sites, in both severity ( $p < .0001$ ) and in number of larvae ( $p < .0001$ ) (Table 1). The plot located in San Bernardo had the highest severity and number of larvae, while the one in Cuetzinapan had the lowest severity



**Figura 1. Severidad de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix*) en tres localidades y seis fechas de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**  
**Figure 1. Severity of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) in three locations and six dates of sampling in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

Cuetzinapan fue similar a la de Santa Lucía, aunque se realizaron menos aplicaciones de fungicidas y menos fertilizaciones; indicando que el número de aplicaciones de fungicidas podría reducirse sin reducir la efectividad del control.

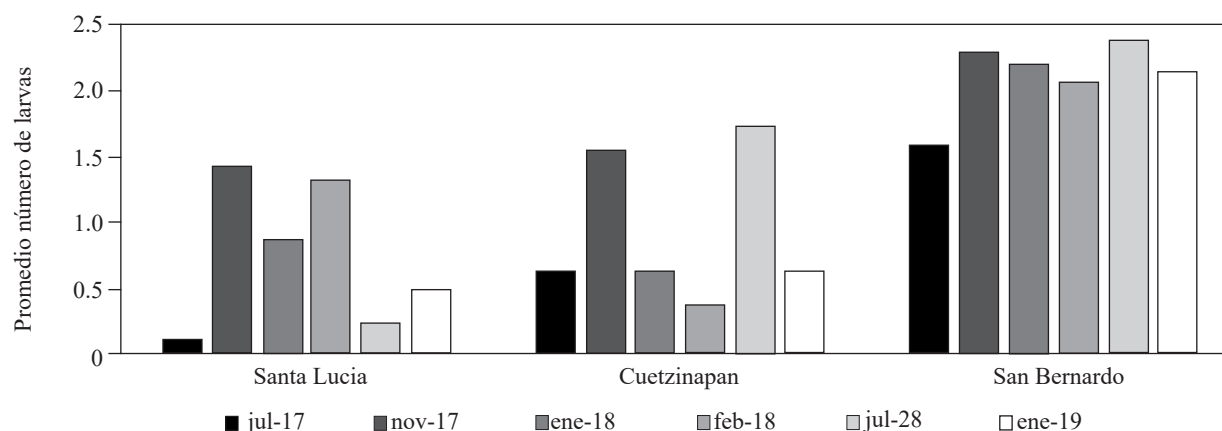
Referente a *Mycodiplosis*, también se observó presencia de larvas en todas las evaluaciones realizadas, y el sitio con mayor densidad poblacional fue San Bernardo mientras que Cuetzinapan y Santa Lucía fueron similares (Figura 2). Dado que las larvas de este díptero se alimentan de las uredosporas, parece que entre mayor disponibilidad haya de las mismas habrá una mayor cantidad de larvas. Sin embargo, se necesita mayor evidencia para determinar si la respuesta funcional que tienen las larvas ante la fluctuación de uredosporas es no lineal (Davies, 2007).

**Severidad y número de larvas.** Con el análisis de Kruskal-Wallis se encontraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo, tanto en severidad ( $p < .0001$ ) como en número de larvas ( $p < .0001$ ) (Cuadro 1). La parcela ubicada en San Bernardo tuvo la mayor severidad y número de larvas,

and number of larvae (Figures 2 and 3). This is due to the applications of fungicides that helped reduce rust severity and, therefore, there was less food availability for larvae. Similar results were reported by Merle et al. (2019), who showed that its natural enemy (*Lecanicillium lecanii*) was also more abundant in areas with more rust.

We assume that in all areas, the population of the diptera helps reduce *Hemileia vastatrix* populations, since it feeds off the uredospores, which could delay the beginning of the infection or contribute to reducing initial infections (Nutman and Roberts, 1963). However, given that the level of severity is high, it would be necessary to explore whether an efficient management option is biological control by flooding.

The comparison of averages performed with the rust severity data per plant stratum (low, middle and high) showed significant differences ( $p < 0.001$ ). The severity in the middle stratum was determined to be greater than in the low and high strata (Table 2). This may be due to several factors, such as the layout of plant tissues, the amount of light/shade and the genotype and age of the plant. In general,



**Figura 2. Fluctuación poblacional de *Mycodiplosis* spp. en tres localidades y seis fechas de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

**Figure 2. Fluctuations in the population of *Mycodiplosis* spp. In three locations and six dates of sampling in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

mientras que la ubicada en Cuetzinapan tuvo la menor severidad y número de larvas (Figura 2 y 3); esto debido a las aplicaciones de fungicidas que ayudaron a disminuir la severidad de la roya y, por tanto, hubo menor disponibilidad de alimento para las larvas. Resultados similares fueron reportados por Merle y colaboradores (2019) quienes demostraron que en sitios donde había más roya, su enemigo natural (*Lecanicillium lecanii*) también fue más abundante.

the middle stratum has a greater amount of plant tissue, whereas the higher stratum is composed of new tissue or tissue in formation, and the lower stratum has a lower number of branches. Shade is different in the strata of the plant, and it is known to have antagonistic effects in the colonization and the sporulation of rust (Toniutti *et al.*, 2017). In addition, the number of appressoria in the fungus decreases in susceptible genotypes as the leaves age, whereas in resistant genotypes, there are more

**Cuadro 1. Comparación entre las medias de la severidad y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) de acuerdo al estrato de la planta y el sitio de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

**Table 1. Comparison between means of the severity and number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the plants and the sampling site in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

		Sitio						$\chi^2$ , p
		Santa Lucia		Cuetzinapan		San Bernardo		
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Severidad	Bajo	0.95	1.19	0.97	1.24	1.49	1.58	28.89, <0.001
	Medio	1.13	1.32	0.97	1.19	1.52	1.52	34.59, <0.001
	Alto	0.83	1.11	0.82	1.18	1.42	1.42	49.67, <0.001
Larvas	Bajo	0.78	1.46	0.69	1.3	2.09	2.09	93.29, <0.001
	Medio	0.91	1.79	0.9	2.24	2.11	2.11	105.9, <0.001
	Alto	0.72	1.25	0.68	1.31	2.32	2.32	121.6, <0.001

$\chi^2$  derivada de una Prueba Wilcoxon y Kruskal Wallis, DE= Desviación Estándar /  $\chi^2$  derived from a Wilcoxon and Kruskal Wallis Test, SD= Standard Deviation.

Suponemos que en todos los sitios la población del díptero ayuda a disminuir las poblaciones de *Hemileia vastatrix*, al alimentarse de las uredosporas, lo que podría retrasar el inicio de la infección o contribuir a reducir las infecciones iniciales (Nutman y Roberts, 1963). Sin embargo, dado que el nivel de severidad es elevado, se tendría que explorar si una opción de manejo eficaz es el control biológico inundativo.

La comparación de medias realizada con los datos de severidad de roya por estrato de la planta (bajo, medio y alto) demostró diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Se determinó que la severidad en el estrato medio es mayor respecto al estrato bajo y alto (Cuadro 2). Esto puede deberse a varios factores, como la disposición de tejido vegetal, la cantidad de luz/sombra y el genotipo y edad de la planta. En general, el estrato medio tiene mayor cantidad de tejido vegetal, mientras que el estrato superior está compuesto de tejido nuevo o en formación y el inferior tiene menor número de ramas. La sombra es diferente en los estratos de la planta y se conoce que tiene efectos antagónicos en la colonización y esporulación de la roya (Toniutti *et al.*, 2017). Además, en genotipos susceptibles, el número de apresorios del hongo disminuye conforme se incrementa la edad de las hojas, mientras que los

apressoria in young and old leaves (Coutinho *et al.*, 1994).

No significant differences ( $p = 0.2686$ ) were found in the distribution of *Mycodiplosis* in the strata of the plant (Table 2). Merle *et al.* (2019) found that, in the strata of coffee plants, the area with uredospores was similar under the shade or in areas exposed to the sun, which reinforces the results obtained in the present investigation, since larvae had the same food availability in the three strata, therefore its distribution was similar.

**Correlation between *Mycodiplosis* and rust severity.** A positive correlation was found in all sites and strata between rust severity and the number of *Mycodiplosis* larvae (Cuadro 3). In San Bernardo there was a very clear positive tendency, in which a higher severity meant a greater number of larvae (Figure 3). In general terms, for all sites, the high stratum displayed a higher correlation. In San Bernardo, no fungicides were applied and this allowed for a better association between rust and *Mycodiplosis*. Copper-based fungicides not only affect rust directly, but also natural enemies and the phenology of the host plant (Brinate *et al.*, 2015).

In diverse experiments, positive correlations have been found between hosts/prey and parasites/

**Cuadro 2. Distribución de la severidad y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) según el estrato de las plantas de café muestreadas en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

**Table 2. Distribution of the severity and number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the coffee plants sampled in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

	Bajo		Medio		Alto		$\chi^2$ , p
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Severidad	1.14	1.37	1.21	1.35	1.02	1.31	18.00, <0.001
No. Larvas	1.19	2.1	1.31	2.4	1.24	2.2	2.62, 0.2686

$\chi^2$  derivada de una Prueba Wilcoxon y Kruskal Wallis, DE= Desviación Estándar /  $\chi^2$  derived from a Wilcoxon and Kruskal Wallis Test, SD= Standard Deviation.

genotipos resistentes hay más apresorios en hojas jóvenes y viejas (Coutinho *et al.*, 1994).

No se encontraron diferencias significativas ( $p=0.2686$ ) en la distribución de *Mycodiplosis* en los estratos de la planta (Cuadro 2). Merle y colaboradores (2019) encontraron que en los estratos de plantas de café el área con uredosporas fue similar bajo sombra o en zonas con exposición al sol, lo que refuerza los resultados obtenidos en esta investigación, ya que la larva tuvo la misma disponibilidad de alimento en los tres estratos y por tanto su distribución fue similar.

**Correlación entre *Mycodiplosis* y severidad de roya.** Se identificó una correlación positiva en todos los sitios y estratos entre la severidad de la roya y el número de larvas de *Mycodiplosis* (Cuadro 3). En San Bernardo hubo una tendencia positiva muy clara, donde a mayor severidad presentó un mayor número de larvas (Figura 3). En general, para todos los sitios, el estrato alto mostró tener una mayor correlación. En San Bernardo no se realizaron aplicaciones de fungicidas, lo que permitió una mejor asociación entre la roya y *Mycodiplosis*. Los fungicidas a base de cobre no solo afectan directamente a la roya, sino también a los enemigos naturales y a la fenología de la planta hospedera (Brinate *et al.*, 2015).

En diversos experimentos se han encontrado correlaciones positivas entre hospedantes/presas y parásitos/depredadores, similares a las observadas en este trabajo; tal es el caso de los diferentes estados del ciclo del coccinelido micófago *Illeis cincta* y la severidad causada por cenicilla (*Oidium* sp.) en girasol (*Helianthus annuus*) (Jagadish *et al.*, 2017); o de la disponibilidad de células de la larva *Trichoplusia ni* y la multiplicación del virus entomopatógeno *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Tseng y Myers, 2014).

predators, similar to those observed in the present work. Such is the case of the different stages of the cycle of the mycophagous coccinelid *Illeis cincta* and the severity caused by mildew (*Oidium* sp.) in sunflower (*Helianthus annuus*) (Jagadish *et al.*, 2017), or of the cell availability of the larva *Trichoplusia ni* and the multiplication of the entomopathogenic virus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (Tseng and Myers, 2014).

In the present investigation, the positive correlation between *Mycodiplosis* and the severity of rust can be analyzed from two perspectives: rust as a pathogenic agent of the coffee plant that depends on the availability of plant tissue and *Mycodiplosis* as a biocontrolling agent (predator) of rust, which depends on the number of uredospores available (prey).

The general conditions of the host have been observed, in various pathosystems, to beneficially or negatively affect the development of the parasite. In some cases, if the host is “low quality” and does not have ideal conditions, biotic and abiotic, for its

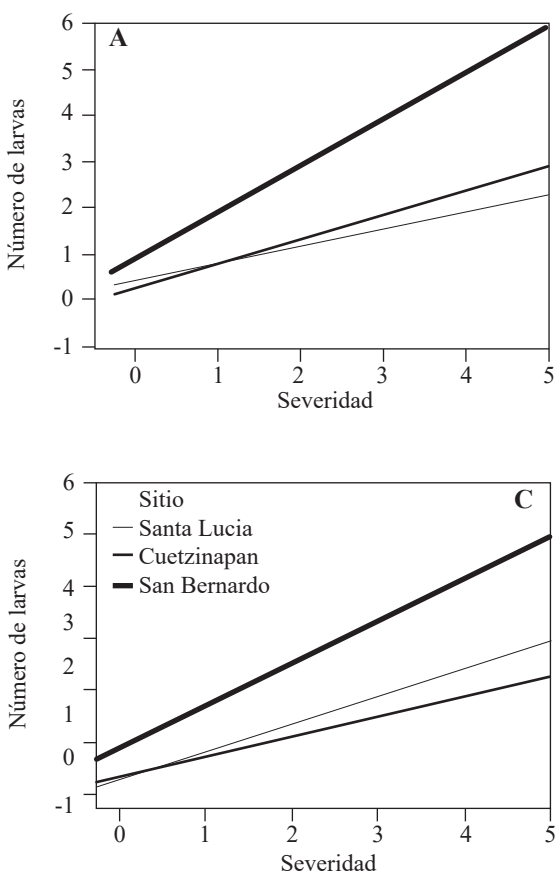
**Cuadro 3. Correlación entre la severidad de la roya y número de larvas (*Mycodiplosis* spp.) según el estrato de la planta y el sitio de muestreo en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

**Table 3. Correlation between rust severity and the number of larvae (*Mycodiplosis* spp.) according to the strata of the plants and the sampling site in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.**

	Santa Lucia r*, p	Cuetzinapan r*, p	San Bernardo r*, p
Bajo	0.4016 p=.000	0.3197 p=.000	0.5054 p=.000
Medio	0.4194 p=.000	0.3290 p=.000	0.4943 p=.000
Alto	0.4198 p=.000	0.4225 p=.000	0.5287 p=.000

\*Correlación de Spearman / \* Spearman Correlation.





**Figura 3.** Relación entre el número de larvas de *Mycodiplosis* spp. y la severidad de roya (*H. vataatrix*) en el estrato alto (A), medio (B) y bajo (C) de las plantas de café muestreadas en el municipio de Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

**Figure 3.** Relation between the number of *Mycodiplosis* spp. larvae and rust (*H. vataatrix*) severity in the high (A), middle (B) and low (C) strata of the coffee plants sampled in the municipal area of Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla.

En la presente investigación la correlación positiva entre *Mycodiplosis* y la severidad de Roya puede ser analizada desde dos perspectivas: la roya como un agente patógeno del café que depende de la disponibilidad de tejido vegetal y *Mycodiplosis* como un agente biocontrolador (depredador) de la roya, que depende del número de uredosporas disponibles (presas).

Se ha observado en varios patosistemas que el desarrollo del parásito puede ser beneficiado o afectado negativamente por las condiciones generales del hospedante. En algunos casos, si el hospedante es de “baja calidad” y no tiene las condiciones idóneas, bióticas y abióticas para su desarrollo, el parásito podrá infectarlo fácilmente y se reproducirá más, generando que la población del huésped

development, the parasite will easily infect it and it will reproduce more, leading the population of the host to continue under non-ideal conditions, making it more and more susceptible, and therefore with a better development of the pathogen (Beldomenico y Begon, 2009). However, well-fed hosts that provide greater amounts of food have also been known to favor the development of the parasite and will help it produce more offspring (Tseng and Myers, 2014).

On the other hand, it is also known that the populations of prey and predators fluctuate due to their interaction, and this investigation found, in every case, a positive correlation between the severity of rust (prey) and the number of larvae (predators), which entails a mutual regulation

continúe bajo condiciones no idóneas, haciéndolo cada vez más susceptible y por lo tanto con mejor desarrollo del patógeno (Beldomenico y Begon, 2009); sin embargo, también se ha visto que un hospedante bien nutrido y que proporcione mayor cantidad de alimento favorecerá el desarrollo del parásito y hará que este tenga mayor descendencia (Tseng y Myers, 2014).

Por otro lado, se sabe que las poblaciones de presas y depredadores oscilan debido a su interacción, y en este trabajo se encontró siempre una correlación positiva entre la severidad de roya (presas) y el número de larvas (depredadores), lo que supone una regulación mutua entre estas poblaciones; sin embargo, la población de roya varía por razones distintas de las presiones de depredación de la larva, por lo que es difícil determinar si los cambios en la población de roya están o no relacionados directamente con los cambios de densidad de la población de su depredador (*Mycodiplosis*). Por lo tanto, se puede inferir que la población del díptero tiene potencial para reducir el crecimiento de la población de roya (Davies, 2007).

La interacción Cafeto-Roya-*Mycodiplosis* es evidentemente más compleja que lo descrito en el presente trabajo; la severidad de la roya es posiblemente determinada por el nivel de desarrollo y susceptibilidad del cultivo y dado que la población de *Mycodiplosis* es dependiente de la severidad de roya (correlación positiva), la población del díptero aumentará si hay mayor disponibilidad de uredosporas. Una severidad alta de la roya afecta directamente el potencial de producción del café del siguiente ciclo, provocando un decrecimiento paulatino, que iniciará con defoliaciones y posteriormente con muerte progresiva de brotes y ramas (CABI, 2018); no obstante, es posible que el díptero, al estar consumiendo las uredosporas, ayude a mantener en equilibrio los niveles de roya del siguiente ciclo, evitando que la producción disminuya notablemente.

between these populations. However, rust population varies for reasons different to the pressure of larva predation, making it difficult to determine whether the changes in the rust population are directly related to the changes in the population density of its predator (*Mycodiplosis*) or not. We can therefore infer that the population of the diptera has the potential to reduce the growth of the rust population (Davies, 2007).

The Coffee plant-Rust-*Mycodiplosis* interaction is evidently more complex than what has been described in the present work. Rust severity is possibly determined by the level of development and susceptibility of the crop, and given that the population of *Mycodiplosis* is dependent on the severity of rust (positive correlation), the population of this insect will increase if there is a greater availability of uredospores. A high rust severity has a direct effect on the coffee production potential of the next cycle, leading to a gradual decrease, which will begin with defoliations, followed by the progressive death of shoots and branches (CABI, 2018). Nevertheless, it is possible that the diptera, when eating the uredospores, helps maintain the balance in the levels of rust of the next cycle, stopping the production from decreasing noticeably.

Along with this, other biotic factors could make the interaction more complex, such as the presence of *Lecanicillium lecanii*, another biocontrolling agent, or the tree ant *Azteca sericeasur* (hymenoptera: formicidae), which may feed off the diptera, avoiding an efficient control of the rust (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016). However, the distribution of *A. sericeasur* in Mexico is scarcely known (Vásquez-Bolaños, 2011) and has seemingly only been reported in the southeast of the country (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016).

In several moments of the present investigation, larvae of the diptera were observed to mobilize

Aunado a esto, otros factores bióticos que podrían hacer más compleja la interacción, como la presencia de *Lecanicillium lecanii*, otro agente biocontrolador, o la hormiga arbórea *Azteca sericeasur* (hymenoptera: formicidae) que podría alimentarse del díptero evitando un eficiente control de la roya (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016). Sin embargo, la distribución de *A. sericeasur* en México es poco conocida (Vásquez-Bolaños, 2011) y al parecer solo se ha reportado en el sureste del país (Hajian-Forooshani *et al.*, 2016; Vandermeer *et al.*, 2016).

Durante la presente investigación se observó en diversas ocasiones que las larvas del díptero se movilizaban dentro de las pústulas alimentándose de las uredosporas, por lo que éstas se encontraban no solo en su tracto digestivo, sino también sobre su tegumento. Hasta ahora se desconoce si esto es suficiente para que el insecto actúe como diseminador de la roya en la misma hoja y contribuya a aumentar la severidad en la planta. Es evidente la necesidad de realizar más investigaciones sobre el ciclo de vida de la larva para poder comprender mejor su función y relación con *H. vastatrix*.

## CONCLUSIONES

La distribución de roya (*H. vastatrix*) en el dosel de los tres escenarios de manejo del cultivo, fue mayor en el estrato medio de la planta, y la distribución de *Mycodiplosis* spp. es similar en los tres estratos de la planta. Existe una correlación positiva entre la severidad ocasionada por la roya del café (*H. vastatrix*) y el número de larvas de *Mycodiplosis* spp., que es favorecida al no usar fungicidas.

inside the pustules, feeding off the uredospores, and were therefore found, not only in their digestive tract, but also on their integument. To date, whether this is enough for the insect to act as a disseminator of rust in the leaf itself and contribute to increase the severity in the plant, is unknown. There is an evident need to carry out further research on the life cycle of the larva to understand its function and relation with *vastatrix* in greater depth.

## CONCLUSIONS

The distribution of rust (*H. vastatrix*) in the canopy of the three crop management scenarios was greater in the middle stratum of the plant, and the distribution of *Mycodiplosis* spp. is similar in the three strata of the plant. There is a positive correlation between the severity caused by rust in coffee plants (*H. vastatrix*) and the number of *Mycodiplosis* spp. larvae, which is favored without the use of fungicides.

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

## LITERATURA CITADA

- Arroyo EJ, Sánchez F and Barboza LA. 2018. Infection model for analyzing biological control of coffee rust using bacterial anti-fungal compounds. *Mathematical Biosciences* 307:13-24. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2018.10.009>.
- Beldomenico MP and Begon M. 2009. Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in Ecology and Evolution* 25(1): 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.015>
- Brinate SVB, Martins LD, Pereira GNG, Cunha VV, Sotero A de J, Amaral JFT, Junior WCJ and Tomaz MA. 2015.

- Copper can influence growth, disease control and production in arabica coffee trees. *Australian Journal of Crop Science* 9(7): 678–683. <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=357328620234232;res=IELHSS>
- CABI. 2018. Plantwise Knowledge Bank. Technical Factsheet: Coffee leaf rust *Hemileia vastatrix*. <https://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=26865>.
- Coutinho TA, Rijkenberg FHJ and Van ASCH MAJ. 1994 The effect of leaf age on infection of Coffea genotypes by *Hemileia vastatrix*. *Plant Pathology* 43(1):97-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb00558.x>
- Davies NB. 2007. Capítulo 14. Depredación. Pp. 299 -326. In: Smith TM y Smith RL (eds.). *Ecología*. 6a edición. Pearson educación S.A, Madrid, España. 776 p. ISBN: 978-84-7829-084-0.
- DGSV-SINAVEF-LANREF. 2016. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/EscalaSeveridadDefoliacionPlanta-yHoja.pdf>
- Haddad F, Maffia L, Mizubuti E and Texeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49(2): 114-119. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>
- Hajian-Forooshani Z, Rivera SIS, Jiménez SE, Perfecto I and Vandermeer J. 2016. Impact of regionally distinct agroecosystem communities on the potential for autonomous control of the coffee leaf rust. *Journal of Environmental Entomology* 45(6):1521-1526. <https://doi.org/10.1093/ee/nvw125>
- Henderson PT. 2020. Elite-led development and Mexico's independent coffee organisations in the wake of the rust epidemic, *Third World Quarterly* 41(6): 1012-1029, <https://doi.org/10.1080/01436597.2020.1729726>
- Henk DA, Farr DF and Aime MC. 2011. *Mycodiplosis* (Diptera) infestation of rust fungi is frequent, wide spread and possibly host specific. *Fungal ecology* 4(4): 284-289. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.03.006>.
- Holz, B. 1970: Revision in Mitteleuropa vorkommender mycophager Gallmücken der *Mycodiplosis*-Gruppe (Diptera, Cecidomyiidae) unter Berücksichtigung ihrer Wirtsspezifität. Unpubl. Thesis. Stuttgart: University of Stuttgart, 237 p.
- Jackson D, Skillman J and Vandermeer J. 2012. Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control* 61(1): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.01.004>
- Jagadish KS, Basavaraj K and Geetha S. 2017. Spatial distribution of the mycophagous ladybird predator, *Illeis cincta* (Fabricius) (Coleoptera Coccinellidae) in relation to powdery mildew disease in sunflower (*Helianthus annuus* L.) Canopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(5): 331-334. <http://www.entomoljournal.com/archives/?year=2017&vol=5&issue=5&ArticleId=2341>
- Kaushal K, Mishra AN, Varma PK, Kapoor KN and Pandey RN. 2001. Dipteran fly (*Mycodiplosis* sp): a natural bioagent for controlling leaf rust (*Puccinia recondita* var. tritici) of wheat (*Triticum aestivum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences* 71(2): 136-138. [https://www.researchgate.net/publication/292558955\\_Dipteran\\_fly\\_Mycodiplosis\\_sp\\_A\\_natural\\_bioagent\\_for\\_controlling\\_leaf\\_rust\\_Puccinia\\_recondita\\_tritici\\_of\\_wheat\\_Triticum\\_aestivum](https://www.researchgate.net/publication/292558955_Dipteran_fly_Mycodiplosis_sp_A_natural_bioagent_for_controlling_leaf_rust_Puccinia_recondita_tritici_of_wheat_Triticum_aestivum)
- Kiel. 2014. Gall midges (Diptera: Cecidomyiidae: Cecidomyiinae) of Germany -Faunistics, ecology and zoogeography by Marcela Skuhrová, Václav Skuhrový and Hans Mayer. *Faunistisch-Ökologische Arbeitsgemeinschaft e.V.* 38: 1-200. [https://www.zobodat.at/pdf/Faun-Oekol-Mitt\\_Supp\\_38\\_0001-0200.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Faun-Oekol-Mitt_Supp_38_0001-0200.pdf)
- Kluth S, Kruess A and Tscharnkte T. 2001. Interactions between the rust fungus *Puccinia punctiformis* and ectophagous and endophagous insects on creeping thistle. *Journal of Applied Ecology* 38(3): 548-556. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00612.x>
- Loland J and Singh B. 2004. Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 69: 203-211. <https://doi.org/10.1023/B:FRES.0000035175.74199.9a>
- Martínez M, Cerna R, Salinas H and Lizardo A. 2013. Guía de manejo de plagas: lista verde y amarilla. CABI. <https://www.plantwise.org/FullTextPDF/2018/20187800210.pdf>
- Merle I, Pico J, Granados E, Boudrot A, Tixier P, de Melo E, Filho V, Cilas C and Avelino J. 2019. Unraveling the complexity of coffee leaf rust behavior and development in different *Coffea arabica* agro-ecosystems. *Phytopathology* 110(2): 418-427. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-19-0094-R>
- Nelsen DJ. 2013. A Phylogenetic Analysis of Species Diversity, Specificity, and Distribution of Mycodiplosis on Rust Fungi. Plant Pathology and Crop Physiology. LSU Master's Theses. [https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool\\_theses/2700](https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/2700)
- Nutman F and Roberts F. 1963. Studies on the Biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Trans British Mycological Society* 46: 27-44. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80005-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80005-4)
- Rayner, R. 1961. Germination and Penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). *Annals of Applied Biology* 49(3): 497-505. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1961.tb03641.x>
- SAGARPA-SENASICA. 2016. Roya del café. *Hemileia vastatrix* (Barkeley & Broome) (Pucciniales: Chaconiaceae). *Aviso público del riesgo y situación actual*. 6 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172768/Aviso\\_publico\\_Roya\\_del\\_cafeto\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172768/Aviso_publico_Roya_del_cafeto_2016.pdf)
- SAGARPA-SIAP. 2018. Atlas Agroalimentario 2012-2018. 50-51 pp. Primera edición. Ciudad de México. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018).
- SMN-CNA. Servicio Meteorológico Nacional- Comisión Nacional del Agua. 2018. <https://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/informacion-climatologica/informacion-estadistica-climatologica>
- Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doubeau S, Urban L, Lambot C, Pinilla JCH and Bertrand B. 2017. Influence of environmental conditions and genetic background of arabica coffee (*C. arabica* L) on leaf rust (*Hemileia vastatrix*) pathogenesis. *Frontiers in Plant Science* 8: 2025. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02025>
- Tseng M and Myers JH. 2014. The relationship between parasite fitness and host condition in an insect-virus System.

- PLoS ONE 9(9): e106401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106401>
- Vandermeer LK, Vandermeer JH and Perfecto I. 2016. Disentangling endogenous versus exogenous pattern formation in spatial ecology: a case study of the ant *Azteca sericeasur* in southern Mexico. Royal Society Open Science 3: 160073. <https://doi.org/10.1098/rsos.160073>
- Vásquez-Bolaños M. 2011. Lista de especies de hormigas (Hymenoptera: Formicidae) para México. Dugesiana 18(1): 95-133. <https://www.antwiki.org/wiki/images/3/3f/V%C3%A1squezBola%C3%B1os2011Mexico.pdf>
- Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3(5): 294-299. [https://www.researchgate.net/publication/15316743\\_DNA\\_primers\\_for\\_amplification\\_of\\_mitochondrial\\_Cytochrome\\_C\\_oxidase\\_subunit\\_I\\_from\\_diverse\\_metazoan\\_invertebrates](https://www.researchgate.net/publication/15316743_DNA_primers_for_amplification_of_mitochondrial_Cytochrome_C_oxidase_subunit_I_from_diverse_metazoan_invertebrates)

# The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity

## El género *Burkholderia*: entre el mutualismo y la patogenicidad

David Espinosa-Victoria\*, Laboratorio Interacción Molecular Planta-Microorganismo, <sup>1</sup>Programa de Edafología Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo Estado de México, México, 56230; Lucía López-Reyes, Moisés Graciano Carcaño-Montiel, Laboratorio Microbiología de Suelos, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Avenida San Claudio s/n, Ciudad Universitaria, La Hacienda, Puebla, Puebla, 72592; <sup>1</sup>María Serret-López. \*Autor para correspondencia: despinos@colpos.mx

Recibido: 28 de Abril, 2020.

Aceptado: 04 de Junio, 2020.

Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 337-359.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-5

Primera publicación DOI: 17 de Junio, 2020.

First DOI publication: June 17, 2020.

**Resumen.** *Burkholderia* es un género ambivalente debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, y simbiótico-patogénicas con plantas, animales y humanos. Desde que la bacteria fitopatógena *B. cepacia* fue reportada como oportunista nosocomial, asociada a la fibrosis quística, surgió la preocupación de posibles infecciones en humanos. El objetivo de esta contribución fue hacer un análisis de la versatilidad funcional de *Burkholderia* y de su efecto en la salud humana. *Burkholderia* albergó cerca de 100 especies y al complejo *B. cepacia* (CBC) constituido por 22 especies. Inicialmente, se determinó la existencia de dos linajes dentro del género: el A que incluía varias

**Abstract.** *Burkholderia* is an ambivalent genus because some of its species establish symbiotic-mutualistic relationships with plants, and symbiotic-pathogenic relationships with plants, animals, and humans. Since the phytopathogenic bacterium *B. cepacia* was reported as a nosocomial opportunist, associated with cystic fibrosis, the concern about possible infections in humans arose. The objective of this contribution was to make an analysis of *Burkholderia*'s functional versatility and its effect on human health. *Burkholderia* harbored about 100 species and the *B. cepacia* complex (BCC) consisting of 22 species. At the beginning, the existence of two lineages within the genus was determined: the A that included several species that were associated with plants, as well as the saprophytes; and B containing BCC species (human pathogenic opportunists), the *B. pseudomallei* subgroup that included human and animal pathogens, and a group of plant pathogenic species. Finally, some individuals were renamed as *Paraburkholderia* and *Caballeronia*. Recent analyzes of burkholderias from humans and the environment indicate that there is no phylogenetic

especies que se asociaban con plantas, así como las saprofitas; y el B que contenía las especies del CBC (oportunistas patógenas de humanos), el subgrupo de *B. pseudomallei* que incluía patógenos de humanos y animales, y un grupo de especies fitopatógenas. Finalmente, se renombraron algunos individuos como *Paraburkholderia* y *Caballeronia*. Los análisis recientes de burkholderias provenientes de humanos y del ambiente, indican que no existe una subdivisión filogenética que distinga entre benéficas y patogénicas. De ahí la importancia de considerar los riesgos para la salud humana, cuando algún miembro de este grupo sea empleado en actividades agrícolas.

**Palabras clave:** *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, mutualismo, parasitismo, fibrosis quística.

El género *Burkholderia* comprende bacilos Gram negativos, no formadores de esporas, que, dependiendo de la especie, se mueven mediante uno o varios flagelos polares. Los individuos que pertenecen al género *Burkholderia* presentan una proporción G + C entre 59 y 69.5%, son aerobios, oxidasa y catalasa positivas, mesófilos y sintetizan polihidroxibutirato como material de reserva (Figura 1). Los miembros que comprende el grupo *Burkholderia* son ubicuos ya que habitan el suelo, el agua y tejidos vegetales y animales (Garrity *et al.*, 2006). La versatilidad nutricional es una característica sobresaliente de este grupo bacteriano ya que puede encontrarse viviendo como biótrofo o como saprófito.

*Burkholderia* es un género bifuncional debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, mientras que otras establecen asociaciones simbiótico-patogénicas con plantas, animales y humanos. En la Figura 2, se muestra la versatilidad funcional del género *Burkholderia*.

subdivision that distinguishes between beneficial and pathogenic ones. Hence the importance of considering risks to human health, when any member of this group is employed in agricultural activities.

**Key words:** *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Caballeronia*, mutualism, parasitism, cystic fibrosis.

The *Burkholderia* genus includes non-spore-forming Gram-negative bacilli, which, depending on the species, uses one or several polar flagella to move. Individuals that belong to the *Burkholderia* genus have a G + C ratio between 59 and 69.5%, are aerobic, oxidase and catalase positive, mesophilic, and synthesize polyhydroxybutyrate as reserve material (Figure 1). The members of the *Burkholderia* group are ubiquitous since they are found in water and soil, as well as in plant and animal tissues (Garrity *et al.*, 2006). Nutritional versatility is one outstanding characteristic of this bacterial group because it can live as a biotroph or as a saprophyte.

*Burkholderia* is a bifunctional genus because some of its species establish symbiotic-mutualistic relationships with plants, while others establish symbiotic-pathogenic associations with plants, animals, and humans. Figure 2 shows the functional versatility of the *Burkholderia* genus.

**Classification of the *Burkholderia* genus.** William Burkholder described *Pseudomonas cepacia* for the first time as the causal agent of onion rot (Burkholder, 1950). Subsequent isolations indicated that *P. cepacia* was a versatile group formed by isolates that can establish mutualistic and pathogenic interactions. Due to the phenotypic diversity observed in *P. cepacia* isolates, it was reclassified within the pseudomonadals order.

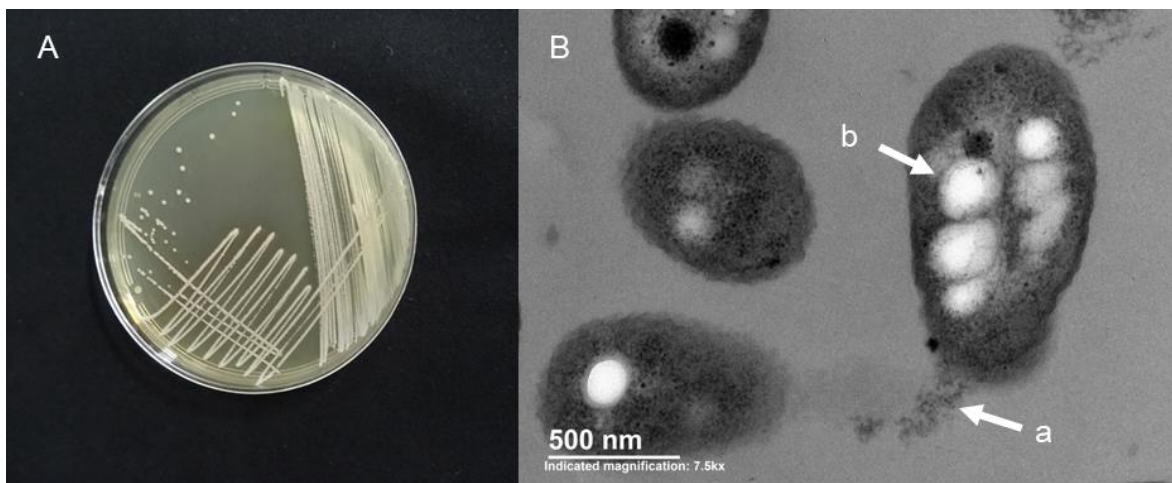


Figura 1. A, Cultivo de *Burkholderia cepacia* BUAP-AM51 (accesión KX161745) creciendo en agar de soya y tripticaseína. B, Microfotografía de la misma cepa vista con Microscopía Electrónica de Transmisión, donde se observan el flagelo polar (a) y gránulos de polihidroxibutirato (b).

Figure 1. A, *Burkholderia cepacia* BUAP-AM51 culture (accession KX161745) growing in trypticasein-soybean agar. B, Microphotography of the same strain, using transmission electron microscopy, where the polar flagellum (a) and polyhydroxybutyrate granules (b) are observed.

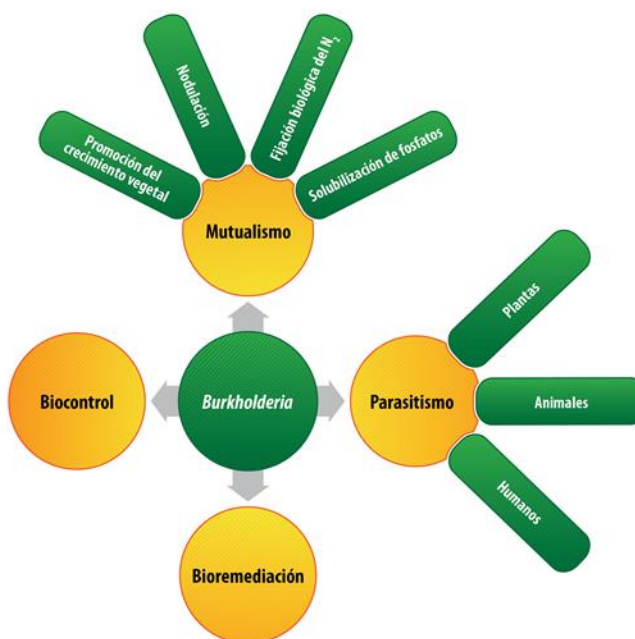


Figura 2. Multiplicidad de funciones que llevan a cabo los individuos del género *Burkholderia*.

Figure 2. Multiplicity of functions performed by individuals of the *Burkholderia* genus.



**Clasificación del género *Burkholderia*.** William Burkholder describió por primera vez a *Pseudomonas cepacia*, como agente causal de la pudrición de la cebolla (Burkholder, 1950). Los posteriores aislamientos de *P. cepacia*, indicaron que se trataba de un grupo versátil, constituido por aislamientos capaces de establecer interacciones mutualistas y patogénicas. La diversidad fenotípica observada en los aislamientos de *P. cepacia*, condujo a su reclasificación dentro de las pseudomonadales.

El género *Burkholderia* fue propuesto por Yabuuchi *et al.* (1992) como resultado de la transferencia de siete especies de *Pseudomonas*: *P. cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. plantarii*, *P. caryophyllii*, *P. pickettii* y *P. solanacearum*. Posteriormente, *Burkholderia pickettii* y *B. solanacearum*, fueron transferidas al género *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.*, 1995). El género *Burkholderia* comprende cerca de 100 especies (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015) que ocupan muy diversos nichos ecológicos. Particularmente, el CBC es ubicuo en la naturaleza y puede encontrarse en el suelo, agua, rizosfera, varias especies animales, humanos y en hospitales (Chiarini *et al.*, 2006). Actualmente, el CBC está conformado por 22 especies (Cuadro 1).

Todas las especies del CBC presentan considerable variabilidad fenotípica (Vandamme *et al.*, 1997), aun dentro de los aislamientos clínicos de la misma especie (Larsen *et al.*, 1993). Probablemente, la versatilidad ecológica del CBC se debe al tamaño inusual de su genoma, el cual normalmente consiste de dos a cuatro (típicamente tres) replicones (cromosomas) grandes (>500 kb); así como a su habilidad de usar una larga lista de compuestos como fuentes de carbono. Sin embargo, su clasificación taxonómica no permite distinguir claramente aquellas cepas que son patógenas para humanos (Parke y Gurian-Sherman, 2001).

A medida que el número de especies descritas de *Burkholderia* se incrementó, el análisis de secuencias multilocus (*atpD*, *gltB*, *lepA*, and *recA*)

The *Burkholderia* genus was proposed by Yabuuchi *et al.* (1992) as a result of the transference of seven *Pseudomonas* species: *P. cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. plantarii*, *P. caryophyllii*, *P. pickettii* and *P. solanacearum*. Later, *Burkholderia pickettii* and *B. solanacearum* were transferred to the *Ralstonia* genus (Yabuuchi *et al.*, 1995). The *Burkholderia* genus includes around 100 species (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015) distributed in diverse ecological niches. Particularly, BCC is ubiquitous in nature and can be found in soil, water, rhizosphere, several animal species, and hospitals (Chiarini *et al.*, 2006). Currently, BCC is formed by 22 species (Table 1).

All the BCC species exhibit considerable phenotypic variability (Vandamme *et al.*, 1997),

**Cuadro 1. Especies del Complejo *Burkholderia cepacia* (CBC).**

**Table 1. Species of the *Burkholderia cepacia* complex (BCC)**

| Núm. | Especie                     | Referencia                       |
|------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1    | <i>B. alpina</i>            | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 2    | <i>B. ambifaria</i>         | Coenye <i>et al.</i> , 2001      |
| 3    | <i>B. anthina</i>           | Vandamme <i>et al.</i> , 2002    |
| 4    | <i>B. arboris</i>           | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 5    | <i>B. cenocepacia</i>       | Vandamme <i>et al.</i> , 2003    |
| 6    | <i>B. cepacia</i>           | Vandamme <i>et al.</i> , 1997    |
| 7    | <i>B. contaminans</i>       | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 8    | <i>B. diffusa</i>           | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 9    | <i>B. dolosa</i>            | Vermis <i>et al.</i> , 2004      |
| 10   | <i>B. lata</i>              | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 11   | <i>B. latens</i>            | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 12   | <i>B. metallica</i>         | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 13   | <i>B. multivorans</i>       | Vandamme <i>et al.</i> , 1997    |
| 14   | <i>B. paludis</i>           | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 15   | <i>B. pseudomultivorans</i> | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 16   | <i>B. pyrrocinia</i>        | Vandamme <i>et al.</i> , 2002    |
| 17   | <i>B. seminalis</i>         | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 18   | <i>B. stabilis</i>          | Vandamme <i>et al.</i> , 2000    |
| 19   | <i>B. stagnalis</i>         | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 20   | <i>B. territorio</i>        | Rojas-Rojas <i>et al.</i> , 2018 |
| 21   | <i>B. vietnamiensis</i>     | Gillis <i>et al.</i> , 1995      |
| 22   | <i>B. ubonensis</i>         | Vermis, <i>et al.</i> , 2002     |

y la secuenciación del *16SrRNA* revelaron que el género estaba compuesto por lo menos de dos linajes, A y B (Estrada-de los Santos *et al.*, 2013). El linaje A estuvo originalmente dividido en dos sublinajes: las especies saprofitas y aquellas asociadas con plantas, incluyendo las que inducen la formación de nódulos en las leguminosas (Angus *et al.*, 2014). El linaje B estuvo conformado por: miembros del CBC que son patógenos oportunistas de seres humanos, patógenos de animales y humanos del grupo *B. pseudomallei*, especies fitopatógenas y algunas especies saprofitas. Las especies, *B. andropogonis* y *B. rhizoxinica*/*B. endofungorum*, que no quedaron incluidas en ninguno de los dos linajes, probablemente podrían ser nuevos géneros (Martínez-Aguilar *et al.*, 2013). La existencia de grupos intermedios entre los linajes A y B, cuestionó si esta evidencia era suficiente para la separación del género *Burkholderia* (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015).

Con el uso de Secuencias Indel Conservadas (SICs) específicas, como marcadores moleculares, se separaron 45 especies de *Burkholderia* del linaje B. Con base en estos resultados, se hizo una enmienda a la descripción del género *Burkholderia* de este linaje. Los marcadores SICs no se encuentran en el genoma de las burkholderias medioambientales del linaje A. No obstante, las bacterias medioambientales del linaje A, junto con las especies fitopatógenas *B. andropogonis*, *B. rhizoxinica* y *B. endofungorum* fueron transferidas al nuevo género *Paraburkholderia*, con *Paraburkholderia graminis* como especie tipo (Sawana *et al.*, 2014).

En el periodo en el que se validaron y publicaron alrededor de 46 especies del género *Paraburkholderia* en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Oren y Garrity, 2015), se describieron también 16 nuevas especies del género *Burkholderia*. De estas, *B. stagnalis* y *B. territorii* resultaron muy similares a la secuencia del

even within clinical isolates of the same species (Larsen *et al.*, 1993). Probably, the BCC ecological versatility is caused by the unusual size of its genome, which normally consists of two to four (typically three) large replicons (chromosomes) (>500 kb), as well as by its ability to use a long list of compounds as carbon sources. However, its taxonomic classification does not permit to clearly distinguish the strains that are pathogenic to humans (Parke and Gurian-Sherman, 2001).

As the number of described *Burkholderia* species increased, the analysis of multilocus sequences (*atpD*, *gltB*, *lepA*, and *recA*) and *16SrRNA* sequencing revealed that the genus was formed by at least two lineages, A and B (Estrada-de los Santos *et al.*, 2013). Lineage A was originally divided in two sub-lineages: saprophyte species and species associated with plants, including those that induce the formation of nodules in legumes (Angus *et al.*, 2014). Lineage B was formed by BBC members that are opportunistic pathogens in human beings; animal and human pathogens of the *B. pseudomallei* group; phytopathogenic species; and some saprophyte species. The *B. andropogonis* and *B. rhizoxinica*/*B. Endofungorum* species not included in any of the two lineages could probably be new genera (Martínez-Aguilar *et al.*, 2013). The existence of intermediate groups between lineages A and B questioned if this evidence was enough to separate the *Burkholderia* genus (Estrada-de los Santos *et al.*, 2015).

Forty-five *Burkholderia* species of lineage B were separated using specific conserved sequence indels (CSIs) as molecular markers. Based on the results, the description of the *Burkholderia* genus of lineage B was amended. The CSIs markers are not found in the genome of environmental burkholderias of lineage A. Nevertheless, environmental bacteria of lineage A, along with the phytopathogenic species *B. andropogonis*, *B. rhizoxinica* and

gen 16S rRNA de *B. glumae*; y muy similares a la secuencia de 7 fragmentos de genes housekeeping de *B. ubonensis* y *B. latens* (De Smet *et al.*, 2015). Sin embargo, dadas las similitudes de las restantes 14 especies con especies del género *Paraburkholderia*, se reconsideró la reclasificación de las especies del género *Burkholderia* propuesto por Sawana *et al.* (2014). Así, se transfirieron 11 especies del género *Burkholderia* al género *Paraburkholderia*, y se propuso el nuevo género *Caballeronia*, al que se transfirieron las tres especies restantes de *Burkholderia* (Dobritsa y Samadpour, 2016).

Se han descrito nuevas especies de *Burkholderia*. En un estudio en el que se analizaron 17 aislamientos provenientes de humanos y ambientales, a través de la secuenciación parcial del gene *gyrB*, que se emplea en la secuenciación multilocus para identificar burkholderias aún no clasificadas, se determinaron 13 genomovares bacterianos a los que se les identificó como bacterias del Clado *Burkholderia glathei* (CBG). Estos aislamientos representaron 13 nuevas especies de *Burkholderia*, las cuales se diferenciaron a través de sus características genotípicas y fenotípicas como: *B. arvi*, *B. hypogeia*, *B. pterochthonis*, *B. glebae*, *B. pedi*, *B. arationis*, *B. fortuita*, *B. temeraria*, *B. calidae*, *B. concitans*, *B. turbans*, *B. catudaia* y *B. peredens* (Peeters *et al.*, 2016).

Los suelos volcánicos son fuente de aislamiento de nuevas especies oxidadoras de CO. Weber y King (2017) describieron a *Burkholderia alpina*, proveniente del volcán Pico de Orizaba y *Paraburkholderia hiitaka*, *P. paradisi*, *P. peleae* y *P. metrosideri* provenientes del volcán Kilauea. Todos los aislamientos presentaron el gene *coxL* que codifica la subunidad catalítica del monóxido de carbono deshidrogenasa.

Recientemente, Jin *et al.* (2020) al usar el genoma completo de 116 cepas de *Burkholderia*, reportaron 36 genomovares dentro del CBC. Con base

*B. endofungorum* were transferred to the new *Paraburkholderia* genus with *Paraburkholderia graminis* as a type species (Sawana *et al.*, 2014).

During the period when about 46 species of the *Paraburkholderia* genus were validated and published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Oren and Garrity, 2015), 16 new species of the *Burkholderia* genus were also described. Of these species, *B. stagnalis* and *B. territorii* were very similar remarkably similar to the 16S rRNA gene sequence of *B. glumae*, and very similar to the sequence of 7 fragments of *B. ubonensis* and *B. latens* housekeeping genes (De Smet *et al.*, 2015). However, given the similarities of the remaining 14 species with species of the *Paraburkholderia* genus, the reclassification of the species of the *Burkholderia* genus, proposed by Sawana *et al.* (2014), was considered. Thus, 11 species of the *Burkholderia* genus were transferred to the *Paraburkholderia* genus, and the new *Caballeronia* genus was proposed, to which the remaining three *Burkholderia* species were transferred (Dobritsa and Samadpour, 2016).

New *Burkholderia* species have been described. In a study in which 17 isolates from human beings and the environment were analyzed through a partial sequencing of the *gyrB* gene, which is used in multilocus sequencing to identify burkholderias that have not yet been classified, 13 bacterial genomovars were determined and identified as *Burkholderia glathei* Clade bacteria (BGC). These isolates represented 13 new *Burkholderia* species, which were distinguished by their genotypic and phenotypic traits as: *B. arvi*, *B. hypogeia*, *B. pterochthonis*, *B. glebae*, *B. pedi*, *B. arationis*, *B. fortuita*, *B. temeraria*, *B. calidae*, *B. concitans*, *B. turbans*, *B. catudaia* and *B. peredens* (Peeters *et al.*, 2016).

Volcanic soils are a source of isolation of new CO-oxidizing species. Weber and King (2017)

en estos resultados, sugirieron un nuevo re-arreglo del CBC, debido a que 22 de los genomovares correspondieron a las especies del CBC hasta ahora conocidas, mientras que los 14 restantes sean probablemente nuevas especies que deberán ser agregadas al CBC.

**Burkholderia como agente fitopatógeno.** Son muchos los cultivos de importancia antropogénica infestados por diferentes especies de *Burkholderia*. Desde el reporte de Burkholder en 1950, hasta inicios del siglo XXI, se han incrementado los reportes de enfermedades en plantas debidas a este controversial género bacteriano (Cuadro 2).

La presencia de miembros del complejo *B. cepacia* es común en el suelo agrícola. Jacobs *et al.* (2008) caracterizaron 1,290 aislamientos de *Burkholderia* en parcelas de cebolla (980 de la rizosfera y 310 de suelo), de los cuales 160 correspondieron a *B. cepacia*, 480 a *B. cenocepacia*, 623 a *B. ambifaria* y 27 a *B. pyrrocinia*. La mayoría de los aislamientos de *B. cepacia* (85%), *B. cenocepacia* (90%) y *B. ambifaria* (76%) resultaron ser patogénicos cuando se inocularon en bulbos de cebolla. Debido a que *B. gladioli* fue recientemente aislada de algunas especies de orquídeas (Cuadro 2), esta

describió *Burkholderia alpina*, from the Pico de Orizaba volcano, and *Paraburkholderia hiiakae*, *P. paradisi*, *P. peleae* and *P. metrosideri* from the Kilauea volcano. All the isolates had the *coxL* gene that encodes the catalytic subunit of carbon monoxide dehydrogenase.

Recently, Jin *et al.* (2020) reported 36 genomovars within the BCC when they used the whole genome of 116 *Burkholderia* strains. Based on these results, the authors suggested a new BCC re-arrangement because 22 genomovars corresponded to the BCC species known so far, while the remaining 14 are probably new species that should be added to the BCC.

**Burkholderia as a phytopathogenic agent.** There are many anthropogenically important crops infested by different *Burkholderia* species. Since Burkholder's report in 1950 up to the beginning of the 21 century, reports of plant diseases caused by this controversial bacterial genus have increased (Table 2).

The presence of members of the *B. cepacia* complex is common in agricultural soil. Jacobs *et al.* (2008) characterized 1,290 *Burkholderia* isolates in onion plots (980 from rhizosphere and 310 from

**Cuadro 2. Algunas especies de *Burkholderia* patógenas de cultivos de importancia antropogénica.**  
**Table 2. Some *Burkholderia* pathogenic species of anthropogenically important crops.**

| Especie                                 | Hospedero/Enfermedad                                                        | Referencia                         |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>B. cepacia</i>                       | Pudrición agria de la cebolla                                               | Burkholder, 1950                   |
| <i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> | Piel resbaladiza de la cebolla                                              | Burkholder, 1950                   |
| <i>B. glumae</i>                        | Tizón bacteriano de la panoja del arroz                                     | Shahjahan <i>et al.</i> , 2000     |
| <i>B. andopogonis</i>                   | Mancha de la hoja del maíz                                                  | Vidaver y Carlson, 1978            |
| <i>B. andopogonis</i>                   | Raya bacteriana del sorgo, pasto sudan, teozintle y maíz dulce              | Xin <i>et al.</i> , 2009           |
| <i>B. gladioli</i>                      | Bacteriosis de los bulbos de <i>Leucojum aestivum</i>                       | Stoyanova <i>et al.</i> , 2013     |
| <i>B. tropica</i>                       | Filodendro y helecho Boston                                                 | Ramírez-Rojas <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>B. gladioli</i>                      | Azafrán, maíz y arroz                                                       | Mirghasempour <i>et al.</i> 2018   |
| <i>B. gladioli</i>                      | Orquídeas <i>Dendrobium</i> sp., <i>Oncidium</i> sp. y <i>Miltonia</i> spp. | Keith y Thammakijjawat, 2019       |

especie puede ser considerada como un patógeno emergente.

Se conoce poco acerca de los factores de virulencia de las especies de *Burkholderia* fitopatógenas. Uno de los casos mejor documentado es el de *B. glumae* que induce el añublo bacteriano en el cultivo de arroz (Quesada-González y García-Santamaría, 2014). Cuando las condiciones ambientales son favorables, la densidad bacteriana aumenta (*quorum sensing*), lo que conlleva a la expresión de sus factores de virulencia como la síntesis de toxoflavina, la biogénesis de flagelos, la respuesta quimiotáctica, el sistema de secreción tipo III y la síntesis de la enzima catalasa (Kim *et al.*, 2007; Quesada-González y García-Santamaría, 2014). El principal factor de daño es la síntesis de la toxoflavina, una toxina transportadora de electrones entre NADH y el oxígeno, sin la intermediación de los citocromos, que genera peróxido de hidrógeno, que es altamente tóxico para el tejido vegetal y microorganismos, y que además obstruye los haces vasculares del arroz (Chung *et al.*, 2009). Las cepas de *B. glumae* que carecen de la producción de toxoflavina son avirulentas y pueden ser identificadas en laboratorio, porque no producen el pigmento amarillo de la toxoflavina sobre medio agar King B (Nandakumar *et al.*, 2009). Sin embargo, Suzuki *et al.* (2004), sugieren que la producción de toxoflavina, aunque es un requisito para causar clorosis en panículas jóvenes, no parece desempeñar un papel importante en los síntomas de pudrición causados por *B. glumae*.

El patógeno se transmite principalmente mediante semilla infectada, y por medio de esta se disemina a diferentes regiones. Desde la germinación de la semilla hasta el estado de plántula, la pudrición es causada por un incremento rápido de las poblaciones de *B. glumae* en las plúmulas. Una vez que *B. glumae* invade las espiguillas, se multiplica rápido y finalmente causa la pudrición bacteriana

soil), of which 160 corresponded to *B. cepacia*, 480 to *B. cenocepacia*, 623 to *B. ambifaria*, and 27 to *B. pyrrocinia*. Most of the isolates of *B. cepacia* (85%), *B. cenocepacia* (90%) and *B. ambifaria* (76%) were pathogenic when inoculated in onion bulbs. Since *B. gladioli* was recently isolated from some orchid species (Table 2), this species can be considered as an emerging pathogen.

Little is known about the virulence factors of the *Burkholderia* phytopathogenic species. One of the best documented cases is that of *B. glumae*, which causes rice bacterial blight (Quesada-González and García-Santamaría, 2014). When the environmental conditions are favorable, the bacterial density increases (*quorum sensing*) and induces the expression of its virulence factors such as synthesis of toxoflavin, flagella biogenesis, chemotactic response, type III secretion system and synthesis of the catalase enzyme (Kim *et al.*, 2007; Quesada-González and García-Santamaría, 2014). The major damage factor is the synthesis of toxoflavin, a toxin that transports electrons between NADH and oxygen, without intermediation of cytochromes, and generates hydrogen peroxide, a highly toxic compound for plant tissue and microorganisms, which also obstructs the rice vascular bundles (Chung *et al.*, 2009). The *B. glumae* strains that do not produce toxoflavin are avirulent and can be identified in the laboratory, because they do not produce the yellow pigment of toxoflavin in King B agar medium (Nandakumar *et al.*, 2009). However, Suzuki *et al.* (2004) suggested that although the production of toxoflavin is a requirement for chlorosis in young panicles, it does not seem to play an important role in rot symptoms caused by *B. glumae*.

The pathogen is mainly transmitted by infected seed, on which it is transmitted to different regions. From seed germination until the seedling stage, rot is caused by a rapid increase of *B. glumae*

del grano o añublo de la panícula (Sayler *et al.*, 2006).

La dispersión de la bacteria se da por salpicadura, también por arrastre del viento y la lluvia y por contacto entre panículas; pero la enfermedad se desarrolla entre 30-35 °C, especialmente por la noche, cuando se presentan precipitaciones frecuentes (Ham *et al.*, 2011).

*B. gladioli*, también causa el añublo bacteriano de la panícula del arroz. Los síntomas del añublo de panícula y pudrición de grano del arroz ocasionados por *B. gladioli* son similares a los de *B. glumae*, es decir, *B. gladioli* también produce toxo flavina (Nandakumar *et al.*, 2009).

El añublo bacteriano de la panícula de arroz ha sido un serio problema a nivel mundial, debido a que se extendió rápidamente y provocó grandes pérdidas en la producción de arroz. La enfermedad se reportó por primera vez en Japón en 1967, posteriormente en Corea y Taiwán, en 2005 se reportó en los Estados Unidos, y en 2006 y 2007 se reportó en Panamá y Colombia, respectivamente (Pérez y Saavedra, 2011). *B. glumae* y *B. gladioli* atacan al grano y producen similares síntomas, induciendo vaneamiento del grano en 90 y 60 %, respectivamente; no obstante, en los campos de arroz severamente afectados por *B. glumae*, se reportan pérdidas del 75 % de la producción, debido a que la bacteria causa daños adicionales como: inhibición de la germinación de la semilla, esterilidad de flores y aborto del grano (Nandakumar *et al.*, 2009).

***Burkholderia* como simbionte mutualista de plantas.** El interés por los microorganismos del suelo se ha incrementado en años recientes debido a que son cruciales en el reciclaje de nutrientes, el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la biodegradación de compuestos contaminantes. Dentro de las rizobacterias destaca el grupo de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPRs (del inglés Plant Growth-Promoting Rhizo-

populations in the plumules. Once *B. glumae* invades the spikelets, it multiplies rapidly and finally causes grain bacterial rot or panicle blight (Sayler *et al.*, 2006).

The bacteria is dispersed by splashing but also by wind and rain, and by contact between panicles, but the disease occurs between 30–35 °C, especially at night, when there is frequent rainfall (Ham *et al.*, 2011). *B. gladioli* also causes bacterial blight in the rice panicles. The symptoms of rice panicle blight and grain rot caused by *B. gladioli* are similar to those caused by *B. glumae*, that is, *B. gladioli* also produces toxo flavin (Nandakumar *et al.*, 2009).

The bacterial blight of rice panicle has been a serious problem worldwide as it spread rapidly and caused significant rice production losses. The disease was reported for the first time in Japan in 1967, and then in Korea and Taiwan; in 2005 it was reported in the United States, and in 2006 and 2007 in Panama and Colombia, respectively (Pérez and Saavedra, 2011). *B. glumae* and *B. gladioli* infect the grain and produce similar symptoms, inducing 90 and 60% vain grain (empty hulls), respectively. Nonetheless, in rice fields that are severely affected by *B. glumae*, production losses of 75% have been reported because the bacterium causes additional damages such as seed germination inhibition, flower sterility and grain abortion (Nandakumar *et al.*, 2009).

***Burkholderia* as plants mutualist symbiont.** Interest in soil microorganisms has increased in recent years because they are essential to recycle nutrients, maintain soil fertility and biodegrade contaminating compounds. Among rhizobacteria, the group of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is one of the most important because they establish symbiotic-mutualistic interactions with plant roots.

The biotroph members of the *Burkholderia* genus are mutually related to plants (Table 3) to

bacteria), que establecen interacciones simbiótico-mutualistas con las raíces de las plantas.

Los miembros biótrofos del género *Burkholderia* se relacionan mutualistamente con plantas (Cuadro 3), a las cuales nodulan y proveen de nitrógeno fijado biológicamente, gracias a la presencia de los genes *nif* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). Igualmente, sintetizan reguladores del crecimiento, como el AIA, que promueve el crecimiento vegetal (Angus *et al.*, 2013). También, hacen disponible el fósforo para la nutrición de las plantas a través del proceso de solubilización del fosfato (Gyaneshwar *et al.*, 2002) y controlan agentes causales de enfermedad (De los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se ha demostrado la presencia de *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* y *B. pseudomallei* en esporas de *Gigaspora decipiens* (Levy *et al.*, 2003). La presencia de genes *nif* en *Burkholderia* sugiere que *G. margarita* obtiene nitrógeno vía bacteriana (Minerdi *et al.*, 2001). Pero también, se han descrito nuevas especies de burkholderias endosimbióticas (*Burkholderia rhizoxinica* y *B.*

which they nodulate and provide biologically fixed nitrogen, because of the presence of the *nif* genes (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). Similarly, they synthesize growth regulators, such as AIA, which promote plant growth (Angus *et al.*, 2013). They also provide phosphorus for plant nutrition through a phosphate solubilization process (Gyaneshwar *et al.*, 2002) and control disease causal agents (De los Santos-Villalobos *et al.*, 2012).

The presence of *B. vietnamiensis*, *B. cepacia* and *B. pseudomallei* has also been detected on *Gigaspora decipiens* spores (Levy *et al.*, 2003). The presence of *nif* genes in *Burkholderia* suggests that *G. margarita* obtains nitrogen from bacteria (Minerdi *et al.*, 2001). New species of endosymbiotic burkholderias have been also described (*Burkholderia rhizoxinica* and *B. endofungorum*) in phytopathogenic fungi such as *Rhizopus microsporus* (Partida-Martinez *et al.*, 2007).

Many endosymbionts of the *Burkholderia* genus are not cultivable. Thus, the endosymbionts

**Cuadro 3. Funciones de especies de *Burkholderia* en asociación simbiótica-mutualista con plantas de importancia antropogénicas.**

**Table 3. Functions of *Burkholderia* species in a symbiotic-mutualistic relationship with anthropogenically important plants.**

| Función                           | <i>Burkholderia</i> -Hospedero                                                                                     | Referencia                             |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Promoción del crecimiento vegetal | <i>B. cepacia</i> - <i>Zea mays</i>                                                                                | Singh <i>et al.</i> , 2013             |
|                                   | <i>B. cepacia</i> - <i>Cicer arietinum</i>                                                                         | Sánchez-Yáñez <i>et al.</i> , 2014     |
|                                   | <i>B. ambifaria</i> - <i>Amaranthus cruentus</i>                                                                   | Parra-Cota <i>et al.</i> , 2014        |
|                                   | <i>B. ambifaria</i> - <i>A. hypochondriacus</i>                                                                    |                                        |
| Nodulación                        | <i>B. tuberum</i> - <i>Aspalathus carnosa</i>                                                                      | Vandamme <i>et al.</i> , 2002          |
|                                   | <i>B. phymatum</i> - <i>Machaerium lunatum</i>                                                                     |                                        |
|                                   | <i>B. mimosarum</i> , y <i>B. nodosa</i> - <i>Mimosa bimucronata</i> , <i>M. scabrella</i> y <i>Dalbergia</i> spp. | Chen <i>et al.</i> , 2007              |
| Fijación de N <sub>2</sub>        | <i>B. vietnamiensis</i> , <i>B. unamae</i> , <i>B. tropica</i> , <i>B. xenovorans</i> y <i>B. kururiensis</i>      | Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004 |
| Solubilización de P               | <i>B. tropica</i> , <i>B. unamae</i> y <i>B. cepacia</i> - <i>Lycopodium cernuum</i>                               | Ghosh <i>et al.</i> , 2016             |

*endofungorum*) en hongos fitopatógenos como *Rhizopus microsporus* (Partida-Martinez *et al.*, 2007).

Muchos endosimbiontes del género *Burkholderia* son no cultivables. Así, los endosimbiontes de las agallas de la hoja de *Psychotria kirkii* fueron clasificadas como *Candidatus Burkholderia kirkii* (Van Oevelen *et al.*, 2002). Igualmente, los endosimbiontes no cultivables que habitan dentro de los hongos micorrizicos arbusculares de la familia Gigasporaceae (Bianciotto *et al.*, 2000) fueron clasificados como *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (Bianciotto *et al.*, 2003) debido a su cercanía filogenética con *Burkholderia* y a la posible presencia de los genes *nif* (Minerdi *et al.*, 2001). Finalmente, Van Borm *et al.* (2002), reportaron la presencia de especies de *Burkholderia* en el órgano en forma de bolsa de la parte media del intestino de la hormiga *Tetraponera*. Dichos endosimbiontes fueron filogenéticamente relacionados con *B. fungorum* y *B. caledonica*.

***Burkholderia* y el control biológico.** El género *Burkholderia* también incluye individuos que reducen o suprimen el desarrollo de patógenos. Muchas enfermedades de las plantas originadas en el suelo, causadas por hongos y oomycetos, son controladas por individuos del CBC (Huang y Wong, 1998).

Los casos más estudiados se relacionan con el biocontrol de la enfermedad damping-off o seca-dera causado por *Pythium* spp. (Heungens y Parke, 2000), *Rhizoctonia solani* (Kang *et al.*, 1998) y *Fusarium* spp. (Bevivino *et al.*, 1998). El biocontrol del damping-off es crucial, dado el amplio rango de plantas hospedaderas, y al hecho de que el tratamiento de semillas se realiza con fungicidas deletéreos para la salud humana (Parke y Gurian-Sherman, 2001).

El Damping-off puede ser tratado efectivamente a través del control biológico, dado el corto periodo de susceptibilidad de la planta (horas o días), la cual requerirá de protección por poco tiempo.

of *Psychotria kirkii* leaf galls were classified as *Candidatus Burkholderia kirkii* (Van Oevelen *et al.*, 2002). Similarly, the non-cultivable endosymbionts that live within arbuscular mycorrhizal fungi of the Gigasporaceae family (Bianciotto *et al.*, 2000) were classified as *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* (Bianciotto *et al.*, 2003) due to its phylogenetic closeness to *Burkholderia* and to the possible presence of the *nif* genes (Minerdi *et al.*, 2001). Finally, Van Borm *et al.* (2002) reported the presence of *Burkholderia* species in the organ in the form of a pouch in the middle part of the *Tetraponera* ant's intestine. Those endosymbionts were phylogenetically related to *B. fungorum* and *B. caledonica*.

***Burkholderia* and biological control.** The *Burkholderia* genus also includes individuals that reduce or suppress the development of pathogens. Many soil-borne plant diseases caused by fungi and oomycetes are controlled by BCC individuals (Huang and Wong, 1998).

The most studied cases are related to the biocontrol of the damping-off or root rot disease (secadera) caused by *Pythium* spp. (Heungens and Parke, 2000), *Rhizoctonia solani* (Kang *et al.*, 1998) and *Fusarium* spp. (Bevivino *et al.*, 1998). The biocontrol of damping-off is essential because of the wide range of host plants and the fact that the seed is treated with fungicides that are deleterious to human health (Parke and Gurian-Sherman, 2001).

The damping-off disease can be effectively treated using biological controls given the short susceptibility period of the plant (hours or days), which will require protection for a short time. The specifically localized infection site allows a direct application of the biocontrol agent in the area where the plant requires protection. However, the biocontrol must be rapidly applied to prevent infection (Martin and Loper, 1999).



El sitio de infección específicamente localizado permite la aplicación del agente de biocontrol directamente en el lugar donde la planta requiere de protección. Sin embargo, el biocontrol debe ser aplicado rápidamente para prevenir la infección (Martin y Loper, 1999).

Entre los antibióticos sintetizados por los miembros del CBC, se encuentran las cepacinas A y B, que exhiben actividad antibacteriana contra estafilococos y toxicidad en ratas (Parker *et al.*, 1984); cepaciamida A, que presenta actividad fungicida contra *Botrytis cinérea* (Jiao *et al.*, 1996); cepacidina A, que tiene actividad antifúngica contra hongos patógenos de animales y plantas como *Microsporum canis*, *Trichophyton* spp, *Epidermophyton* spp, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* (Lee *et al.*, 1994); quinolinonas, que promueven el crecimiento de *Capsicum annuum* e inhiben el crecimiento de *Phytophthora capsici* causante del tizón del pimiento rojo (Moon *et al.*, 1996); fenilpirroles, que inhiben el desarrollo de *Fusarium sambucinum* causante de la podredumbre seca de la papa (Burkhead *et al.*, 1994); fenazina, que inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani* causante de la pudrición del tallo de flor de nochebuena (Cartwright *et al.*, 1995) y la pyrrolnitrina, que contribuyen a la supresión de hongos como *R. solani* y *Fusarium* (Parke y Gurian-Sherman, 2001).

Por otro lado, el biocontrol de patógenos del suelo se logra con el uso de sideróforos como ornibactinas, piochelina y cepabactina sintetizados *in vitro* por miembros del CBC (Sokol *et al.*, 1999). Adicional al biocontrol de patógenos del suelo, Knudsen y Spurr (1987) reportaron la eficacia de algunos individuos del CBC en el biocontrol de enfermedades fúngicas foliares.

**Burkholderia y la biorremediación.** La degradación microbiana es una de las rutas más expeditas para la remoción de contaminantes en ambientes

Among the antibiotics that are synthesized by the BCC members are cepacin A and cepacin B, which have antibacterial activity against staphylococci and toxicity in rats (Parker *et al.*, 1984); cepaciamide A, which has fungicidal activity against *Botrytis cinérea* (Jiao *et al.*, 1996); cepacidine A, which has antifungal activity against animal and plant pathogenic fungi such as *Microsporum canis*, *Trichophyton* spp, *Epidermophyton* spp, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* (Lee *et al.*, 1994); quinolinones, which promote *Capsicum annuum* growth and inhibit *Phytophthora capsici* growth, the causal agent of red pepper blight (Moon *et al.*, 1996); phenylpyrroles, which inhibit the development of *Fusarium sambucinum*, the causal agent of potato dry rot (Burkhead *et al.*, 1994); phenazine, which inhibits *Rhizoctonia solani* growth, the causal agent of poinsettia stem rot (Cartwright *et al.*, 1995), and pyrrolnitrin, which contributes to suppress fungi such as *R. solani* and *Fusarium* (Parke and Gurian-Sherman, 2001).

On the other hand, the biocontrol of soil-borne pathogens is achieved using siderophores such as ornibactins, pyochelin and cepabactin that are synthesized *in vitro* by the BCC members (Sokol *et al.*, 1999). In addition to the control of soil-borne pathogens, Knudsen and Spurr (1987) reported the effectiveness of some BCC individuals to control foliar fungal diseases.

**Burkholderia and bioremediation.** Microbial degradation is one of the most expedited routes to remove contaminants in terrestrial and aquatic environments. The *Burkholderia sensu lato* genus hosts individuals that are considered biodegraders or detoxifiers.

The *B. vietnamiensis* G4 strain of BCC is a species that efficiently degrades trichlorethylene (TCE), the most abundant organic contaminant in aquifers in the United States. The key in

terrestres y acuáticos. El género *Burkholderia sensu lato* alberga individuos que son considerados como biodegradadores o detoxificadores.

*B. vietnamiensis* cepa G4 del CBC es una especie eficiente en la degradación del tricloroetileno (TCE), el contaminante orgánico más abundante en los acuíferos en USA. La clave en el proceso de biodegradación del TCE es la enzima tolueno o-monooxigenasa (Tom), que es la primera enzima del operón TOM, codificado por el plásmido pTOM (Shields *et al.* 1995).

*B. xenovorans* cepa LB400 es una de las más efectivas degradadoras aeróbicas de los bifenil policlorinados (PACBs), vía la enzima bifenil-2,3-dioxigenasa, que es codificada por el locus *bhp* (Ferrer *et al.* 2003).

El 2,4,5-triclorofenoxiacetato (2,4,5-T), un potente herbicida componente del Agente naranja es usado como única fuente de carbono por *B. phenoliruptrix* cepa AC1100 (Coeyne *et al.* 2004). Igualmente, *B. cepacia* PCL3 utiliza carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamate), un insecticida de amplio espectro empleado en actividades agrícolas para controlar insectos y nematodos, como única fuente de carbono (Plangklang y Reungsang, 2008). Plangklang y Reungsang (2011), reportaron que las células inmovilizadas de *B. cepacia* PCL3, redujeron más efectivamente la vida media del carbofuran de 127 a 16 días, a diferencia de las células libres que lo hicieron de 127 a 28 días.

La degradación del pireno, un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), de amplia distribución en el medio acuático, ocurre predominantemente vía microbiana a través de la actividad de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (C23O) de *B. cepacia* (Chen *et al.*, 2013).

Una gran cantidad de especies de *Burkholderia* son comúnmente aisladas de la rizosfera, lo que las hace idóneas para la estrategia de rizoremediación; es decir, la degradación de contaminantes por las

the TCE biodegradation process is the toluene o-monooxigenase enzyme (Tom), which is the first enzyme of the TOM operon encoded by the pTOM plasmid (Shields *et al.*, 1995).

The *B. xenovorans* LB400 strain is one of the most effective aerial degrader of polychlorinated biphenyls (PACB), through the biphenyl-2,3-dioxygenase enzyme, which is encoded by the *bhp* locus (Ferrer *et al.*, 2003).

The 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T), a potent herbicide component of the Orange Agent, is used by the *B. phenoliruptrix* AC1100 strain as a unique carbon source (Coeyne *et al.*, 2004). Similarly, *B. cepacia* PCL3 uses carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-il methylcarbamate), a wide spectrum insecticide used in agricultural activities to control insects and nematodes, as a unique carbon source (Plangklang and Reungsang, 2008). Plangklang and Reungsang (2011) reported that the immobilized cells of *B. cepacia* PCL3 were more effective to reduce carbofuran half-life from 127 to 16 days compared to the free cells that took from 127 to 28 days. Degradation of pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), which is widely distributed in aquatic environments, predominantly occurs microbially through the activity of the 2,3-dioxygenase catechol enzyme (C23O) of *B. cepacia* (Chen *et al.*, 2013).

A large amount of *Burkholderia* species are usually isolated from the rhizosphere, which makes them ideal for rhizoremediation strategies, that is, degradation of contaminants by rhizosphere bacteria. The genomic analysis of the degrading routes could eventually be useful to optimize the *Burkholderia* strains in the bioremediation processes, as well as to develop new or more efficient processes for the degradation of contaminants (O'Sullivan and Mahenthiralingam, 2005).

**Human pathogenic *Burkholderia*.** Some members of the *Burkholderia* genus are opportunistic

bacterias de la rizosfera. El análisis genómico de las rutas degradativas podría eventualmente permitir la optimización de las cepas de *Burkholderia* en los procesos de biorremediación, así como la construcción de vías novedosas o más eficientes para la degradación de contaminantes (O'Sullivan y Mahenthiralingam, 2005).

***Burkholderia* patógena de humanos.** Algunos miembros del género *Burkholderia* son patógenos oportunistas de seres humanos. Por ejemplo, *B. pseudomallei* y *B. mallei* son los agentes causales de la melioidosis y el muermo, respectivamente (Wiersinga *et al.*, 2006). Estas son enfermedades severas para seres humanos y animales, endémicas del sudeste de Asia y norte de Australia, cuyos síntomas se confunden con la tuberculosis y la neumonía (Ulrich *et al.*, 2004).

En 1984, Isles *et al.*, reportaron el primer caso de infección de *B. cepacia* en personas con fibrosis quística (FQ). Un año después, el segundo reporte confirmó que las infecciones con esta bacteria estaban relacionadas con la FQ (Tablan *et al.*, 1985). La FQ es una enfermedad genética, asociada a insuficiencia pancreática e infecciones de vías aéreas (Anderson, 1938).

La proteína transmembranal CFTR (del inglés: cystic fibrosis transmembrane regulator) codificada por el gene FQ (Riordan *et al.*, 1989), funciona como canal del ion cloro. Las personas con mutaciones en los alelos del gen FQ, presentan severos defectos en el transporte del ion cloro y sudor típicamente salado. Este defecto conduce a la presencia de mucosa deshidratada pegajosa en diferentes conductos del cuerpo, como los sexuales femeninos, pancreáticos y pulmonares, que son objeto de una severa colonización microbiana. Durante la enfermedad se presentan bronquiolitis, atelectasia, hemoptisis, neumotórax, fibrosis, falla respiratoria y finalmente la muerte (Govan y Deretic, 1996).

pathogens in human beings. For example, *B. pseudomallei* and *B. mallei* are the causal agents of melioidosis and glanders, respectively (Wiersinga *et al.*, 2006). These are animal and human severe diseases, endemic in southeast Asia and northern Australia, whose symptoms are confused with those of tuberculosis and pneumonia (Ulrich *et al.*, 2004).

In 1984, Isles *et al.* reported the first case of infection by *B. cepacia* in patients with cystic fibrosis (CF). One year later, the second report confirmed that the infections caused by this bacterium were associated with CF (Tablan *et al.*, 1985). Cystic fibrosis is a genetic disease associated with pancreatic insufficiency and airways infections (Anderson, 1938).

The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), a protein encoded by the CF gene (Riordan *et al.*, 1989) acts as a chloride ion channel. People with mutations in the CF gene alleles have severe defects in chloride ion transportation and typically salty sweat. This defect causes sticky dehydrated mucosa in different ducts of the body such as female sexual ducts, and pancreatic and pulmonary ducts, which are prone to severe microbial colonization. During the disease, patients may suffer from bronchiolitis, atelectasis, hemoptysis, pneumothorax, fibrosis, respiratory failure, and eventually, death (Govan and Deretic, 1996). Chronic microbial colonization transmitted by the air causes pulmonary infection, which is the main cause of morbidity and mortality of CF patients (Gilligan, 1991). The pathogen is transmitted to humans through nosocomial infections, that is, by the multiplication of microorganisms within the body during hospitalization, and they may or may not have symptoms (Fariás, 2008).

The typical CF pathogens are *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Haemophilus influenzae*, but there were also

La colonización microbiana crónica que proviene del aire conlleva a la infección pulmonar, que es la principal causa de morbilidad y mortalidad de pacientes con FQ (Gilligan, 1991). Los humanos, adquieren el patógeno a través de infecciones nosocomiales, es decir, por la multiplicación de los microorganismos dentro de sus cuerpos durante la hospitalización, pudiendo o no presentar síntomas (Farías, 2008).

Los patógenos típicos de la FQ son *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*, pero también se reportaron algunos no fermentadores de la glucosa como *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *R. pickettii*, y *B. gladioli* (Burns *et al.*, 1998). Se sabe que *P. aeruginosa* infecta comúnmente a los pacientes de FQ y que *B. cepacia* es el patógeno oportunista más letal (Govan and Deretic, 1996).

De 1984 a 1985 se documentó la agresividad de *B. cepacia*, relacionados con la FQ, por el deceso de muchos individuos en los hospitales, bajo lo que se denominó “síndrome cepacia”. En 1990, se reportó que la cepa denominada “tipo 12”, “ET12”, “cable pilus strain” o “tipo 2”, prevaleció en poblaciones de individuos con FQ en Canadá y en el Reino Unido (Mahenthalingam *et al.*, 2008).

De 1993 a 2009, se estudiaron 33 casos de bacteriemias en España causadas por *B. cepacia*, 21 de las cuales fueron detectados en dos brotes. No se pudo identificar la fuente de contagio del primer brote; sin embargo, la fuente del segundo fue un lote de crema hidratante (Ibarguren *et al.*, 2011).

En el Reino Unido, históricamente, *B. cenocepacia* fue el patógeno del CBC más abundante en la FQ. Sin embargo, debido a las estrictas prácticas de control, se redujo su prevalencia, convirtiéndose *B. multivorans* en el nuevo patógeno dominante. Así, se produjo un cambio epidemiológico, que ocurrió también en Estados Unidos (Mahenthalingam *et al.*, 2008).

reports of non-glucose fermenting pathogens such as *Stenotrophomonas maltophilia*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *R. pickettii* and *B. gladioli* (Burns *et al.*, 1998). It is known that *P. aeruginosa* usually infects CF patients and that *B. cepacia* is the most lethal opportunistic pathogen (Govan and Deretic, 1996).

From 1984 to 1985, *B. cepacia* aggressiveness in CF cases was documented as “cepacia syndrome” due to the decease of many individuals in hospitals. In 1990, the strain called “type 12,” “ET12,” “cable pilus strain” or “type 2” was reported to prevail in individual populations with CF in Canada and the United Kingdom (Mahenthalingam *et al.*, 2008).

From 1993 to 2009, a study of 33 cases of bacteriemias caused by *B. cepacia* was conducted in Spain, 21 of which were detected in two outbreaks. The source of the first outbreak could not be identified but the source of the second outbreak was a moisturizing cream lot (Ibarguren *et al.*, 2011).

Historically, in the United Kingdom, *B. cenocepacia* has been the most abundant BCC pathogen in CF. However, due to the strict control practices, its prevalence was reduced and replaced by *B. multivorans* as the new dominant pathogen. Thus, an epidemiological change took place, which also occurred in the United States (Mahenthalingam *et al.*, 2008).

To study the pathogenic potential of some *Burkholderia* symbiotic-mutualist strains, Angus *et al.* (2014) inoculated the *Caenorhabditis elegans* nematode and HeLa cells (of human cervical carcinoma). Based on their results, the authors concluded that there was an extremely low risk of opportunistic infections by symbiotic-mutualist bacteria such as *B. tuberum*. However, Mahenthalingam *et al.* (2008) reported the presence of strains clonally identical to those of BCC that cause infection in natural environments.

Para estudiar el potencial patogénico de algunas cepas simbiótico-mutualistas de *Burkholderia*, Angus *et al.* (2014) inocularon al nematodo *Caenorhabditis elegans* y a células HeLa (de carcinoma cervical humano). De acuerdo con sus resultados, concluyeron que era extremadamente bajo el riesgo de infecciones oportunistas por bacterias simbiótico-mutualistas como *B. tuberum*. Sin embargo, Mahenthiralingam *et al.* (2008) reportaron la presencia de cepas clonalmente idénticas a las del CBC, causantes de infección, en ambientes naturales. Este hecho mantiene la preocupación del uso de estas bacterias en actividades agrícolas como la biofertilización, biorremediación o el control biológico (Cuadro 3).

El análisis de 17 aislamientos de *Burkholderia* provenientes de humanos y el ambiente, confirmó que no existe una subdivisión filogenética que distinga entre cepas benéficas y cepas patogénicas (Peeters *et al.*, 2016).

La Figura 3, representa un modelo del proceso de simbiosis mutualista y patogénica del género *Burkholderia sensu lato*. Es amplio el acervo bacteriano para establecer relaciones benéficas y deletéreas con plantas, así como relaciones antagonicas con animales y seres humanos. No se tiene certeza de cuántas burkhordelias ambientales más pudieran ser patógenas para humanos. Tampoco se sabe cómo las burkholderias patógenas de humanos podrían transitar del ambiente agrícola al hospitalario, y viceversa. Dada esta situación controversial, y teniendo en cuenta el proceso de pérdida y ganancia de genes, que ocurre de forma natural en las bacterias, persiste la interrogante: ¿las ambientales y las patogénicas son las mismas burkholderias?

## CONCLUSIONES

El género *Burkholderia sensu lato* es versátil y controversial. Versátil, porque las especies que lo

This fact causes concern about the use of these bacteria in agricultural activities, such as biofertilization, bioremediation or biological control (Table 3).

The analysis of 17 *Burkholderia* isolates from humans and from the environment confirmed that there is no phylogenetic subdivision to distinguish between beneficial and pathogenic strains (Peeters *et al.*, 2016).

Figure 3 shows a model of the mutualistic and pathogenic symbiosis of *Burkholderia sensu lato* genus. There is a large bacterial pool to establish beneficial and deleterious relationships with plants, as well as antagonistic relationships with animals and human beings. It is uncertain how many more environmental burkhordelias could be pathogenic for humans, or how human pathogenic burkholderias can move from the agricultural environment to hospitals, and vice versa. Given this controversial situation, and considering the process of gene loss and gain, which occurs naturally in bacteria, the question remains: are environmental and pathogenic burkholderias the same?

## CONCLUSIONS

*Burkholderia sensu lato* is a versatile and controversial genus. It is versatile because its species establish symbiotic-mutualistic relationships with plants, and symbiotic-pathogenic relationships with plants, animals, and human beings; and controversial because some environmental and plant pathogens can at the same time be pathogenic to humans. Actually, the number of nitrogen fixing and plant growth promoting species that were analyzed was too low to be able to conclude that they are of low risk to human health. Unfortunately, the recent analyses of *Burkholderia* from humans and from the environment do not allow to distinguish between beneficial and

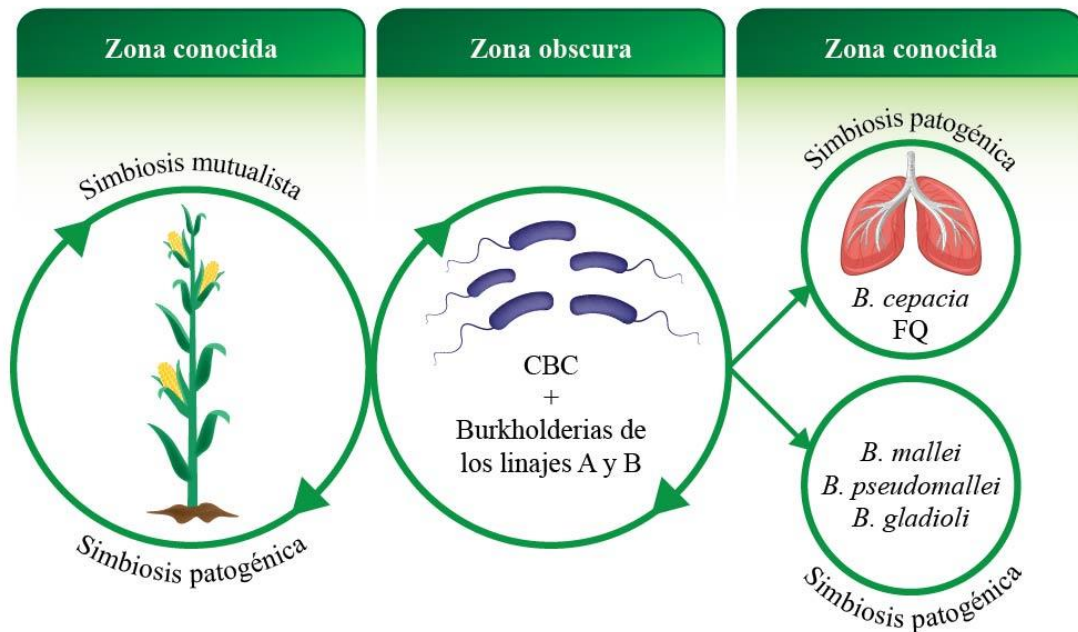


Figura 3. Modelo de las simbiosis mutualista y patogénica del género *Burkholderia sensu lato*. El círculo central muestra el acervo de especies de *Burkholderia* (CBC y burkholderias de los linajes A y B). Las flechas hacen referencia a una taxonomía dinámica con reclasificación constante de las especies. El círculo de la izquierda representa al grupo de burkholderias que establecen relaciones mutualistas y/o patogénicas con las plantas (las flechas enfatizan el movimiento constante de una condición a la otra). Los círculos de la derecha se refieren a las relaciones patogénicas que las especies de *Burkholderia* establecen con seres humanos y animales. El círculo superior enfatiza la Fibrosis Quística (FQ), donde *P. cepacia* ha resultado ser la más letal para los seres humanos. En el círculo inferior, se señalan tres especies patógenas (*B. mallei*, *B. pseudomallei* y *B. gladioli*) para seres humanos y/o animales, que no están consideradas dentro de las 22 especies del CBC (Cuadro 1), y por lo tanto, no están relacionadas con la FQ. El círculo de la izquierda y los dos de la derecha están bien documentados, pero el central es aún oscuro, en el sentido de que no se sabe qué otras especies de *Burkholderia* podrían resultar patógenas para humanos y animales. Tampoco está clara la vía de tránsito entre el círculo central y los de la derecha. CBC= Complejo *Burkholderia cepacia*.

Figure 3. Model of the mutualistic and pathogenic symbiosis of the *Burkholderia sensu lato* genus. The circle in the center shows the *Burkholderia* species pool (BCC and burkholderias of lineages A and B). The arrows indicate a dynamic taxonomy with a continuous species reclassification. The circle on the left represents the group of burkholderias that establish mutualistic and/or pathogenic relationships with plants (the arrows highlight the constant movement from one condition to another). The circles on the right indicate the pathogenic relationships that the *Burkholderia* species establish with human beings and animals. The circle on the upper part highlights cystic fibrosis (CF), where *P. cepacia* was the most lethal pathogen for human beings. The circle on the lower part shows three species (*B. mallei*, *B. pseudomallei* and *B. gladioli*) pathogenic to human beings and/or animals which are not considered within the 22 BCC species (Table 1) and, therefore, not associated with CF. The circle on the left and the two on the right are well documented, but the one in the center is still dark, that is, that it is not known what other *Burkholderia* species could be pathogenic to humans and animals. The transit route between the circle in the center and those on the right is also unclear. BCC= *Burkholderia cepacia* complex.

conforman establecen relaciones simbiótico mutualistas con plantas y relaciones simbiótico-patógenicas con plantas, animales y el ser humano; y controversial porque algunas especies ambientales y patógenas de plantas pueden al mismo tiempo ser patógenas para los seres humanos. En realidad, es reducido el número de especies fijadoras de nitrógeno y promotores del crecimiento vegetal analizadas, para arribar a la conclusión de bajo riesgo para la salud humana. Desafortunadamente, los análisis recientes de aislamientos de *Burkholderia*, provenientes de humanos y del ambiente, no permiten distinguir entre cepas benéficas y cepas patógenas. A pesar de que los ensayos de patogenicidad *in vitro* proporcionan información valiosa, deben tomarse con reserva, debido a que las condiciones en el campo son diferentes y cambiantes. Adicionalmente, habrá que considerar la condición de susceptibilidad existente en los seres humanos que manipulen estos microorganismos. Los grupos intermedios encontrados entre los dos linajes de burkholderias, son una razón para investigar el posible intercambio de genes entre las burkholderias simbiótico-mutualistas y simbiótico-patógenicas. Por lo tanto, es riesgoso generalizar la idea de que las burkholderias ambientales no son patógenas para seres humanos. Resulta no ética la recomendación de usar especies del linaje A en actividades agrícolas, como la biofertilización o la bioremediación, a menos que se tengan evidencias experimentales de que son inocuas para humanos y animales. Finalmente, como medida precautoria, a partir de 2003, la aplicación de *B. cepacia* ha sido restringida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

## LITERATURA CITADA

Anderson DH. 1938. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study.

pathogenic strains. Although pathogenicity tests *in vitro* provide valuable information, they should be taken with reserve because the conditions in the field are different and changing. The condition of susceptibility in humans who handle these microorganisms should also be considered. The intermediate groups found between the two burkholderia lineages are one of the reasons to investigate the possible gene exchange between symbiotic-mutualistic and symbiotic-pathogenic burkholderias. It is therefore risky to generalize the idea that the environmental burkholderias are not pathogenic to humans. Recommending the use of the A-lineage species in agricultural activities, such as biofertilization or bioremediation, is unethical, unless there is experimental evidence that they are safe for humans and animals. Finally, as a precautionary measure, since 2003, the United States Environmental Protection Agency has restricted the use of *B. cepacia*.

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

- The American Journal of Diseases of Children 56:344-399. <http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013>
- Angus AA, Agapakis CM, Fongm S, Yerrapragada S, Estrada-de los Santos P, Yang P, Song N, Kano S, Caballero-Mellado J, de Faria SM, Dakora FD, Weinstock G, and Hirsch AM. 2014. Plant-associated symbiotic *Burkholderia* species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. Public Library of Science ONE 9: e83779. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083779>
- Angus AA, Lee A, Lum MR, Shehayeb M, and Hessabi R. 2013. Nodulation and effective nitrogen fixation of *Macroptilium atropurpureum* (siratro) by *Burkholderia tuberum*, a nodulating and plant growth promoting beta-proteobacterium, are influenced by environmental factors. Plant and Soil 369:543-562. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1590-7>
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Cantale C, and Chiarini L. 1998. characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. FEMS Microbiology Ecology 27:225-237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496\(98\)00069-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6496(98)00069-5)

- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, and Vandamme P. 2003. '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:121–124. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02382-0>
- Bianciotto V, Lumini E, Lanfranco L, Minerdi D, Bonfante P, and Perotto S. 2000. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4503–4509. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.66.10.4503-4509.2000>
- Burkhead KD, Schisler DA, and Slininger PJ. 1994. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2031–39. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201598/pdf/aem00023-0337.pdf>
- Burkholder W. 1950. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 64:468–475. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19501101355>
- Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW, and Clausen CR. 1998. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 27:158–163. <http://dx.doi.org/10.1086/514631>
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Pardes-Valdez G, and Estrada-de los Santos P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1165–1172. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02951-0>
- Cartwright DK, Chilton WS, and Benson DM. 1995. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:211–16. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00172814.pdf>
- Chen K, Zhu Q, Qian Y, Song Y, Yao J, and Choi MMF. 2013. Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98:361–367. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.012>
- Chen WM, de Faria SM, James EK, Elliott GN, Lin K, Chou JH, Sheu SY, Cnockaert M, Sprent JI, and Vandamme P. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1055–1059. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64873-0>
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S, and Visca P. 2006. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *Trends in Microbiology* 14:277–286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.006>
- Chun H, Choi O, Goo E, Kim N, Kim H, Kang Y, Kim J, Moon JS & Hwang I. 2009. The quorum sensing-dependent gene katG of *Burkholderia glumae* is important for protection from visible light. *US: Journal of Bacteriology*, 191:4152–4157. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00227-09>
- Coeyne T, Henry D, Speert DP and Vandamme P. 2004. *Burkholderia phenoliruptrix* sp. nov., to accommodate the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and halophenol-degrading strain AC1100. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 623–627. <http://dx.doi.org/10.1078/0723202042369992>
- Coenye T, Mahenthalingam E, Henry D, Lipuma JJ, Laevens S, Gillis M, Speert DP, and Vandamme P. 2001. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1481–1490. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-51-4-1481>
- De los Santos-Villalobos S, Barrera-Galicia GC, Miranda-Salcedo MA, and Pena-Cabriaes JJ. 2012. *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:2615–2623. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-012-1071-9>
- De Smet B, Mayo M, Peeters C, Zlosnik JE, Spilker T, Hird TJ, LiPuma JJ, Kidd TJ, Kaestli M, Ginther JL, Wagner DM, Keim P, Bell SC, Jacos JA, Currie BJ, and Vandamme P. 2015. *Burkholderia stagnalis* sp. nov. and *Burkholderia territorii* sp. nov., two novel *Burkholderia cepacia* complex species from environmental and human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2265–2271. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.000251>
- Dobritsa AP, and Samadpour M. 2016. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 2836–2846. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001065>
- Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L, Vinuesa P, Hirsch AM, and Caballero-Mellado J. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by Multilocus Sequence Analysis. *Current Microbiology* 67:51–60. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-013-0330-9>
- Estrada-de los Santos P, Rojas-Rojas FU, Tapia-García EY, Vásquez-Murrieta MS, and Hirsch AM. 2015. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Annals of Microbiology* 66:1303–1314. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1183-1>
- Farias SJA. 2008. *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*). Nuevo patógeno de infecciones nosocomiales. Serie de casos clínicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28:19–23. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2008/ei081d.pdf>
- Ferrer M, Golyshin P and Timmis KN. 2003. Novel maltotriose esters enhance biodegradation of Aroclor 1242 by *Burkholderia cepacia* LB400. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 637–643. <https://doi.org/10.1023/A:1025124019986>



- Garrity G, Staley JT, Boone DR, De Vos P, Goodfellow M, Rainey F A, and Schleifer KH. 2006. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. D. J. Brenner, & N. R. Krieg (Eds.). Springer Science & Business Media. <https://www.springer.com/gp/book/9780387241449>
- Ghosh R, Barman S, Mukherjee R, and Mandal, L. 2016. Role of solubilizing *Burkholderia* spp. for successful and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India. *Microbial Research* 183: 80-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.011>
- Gilligan PH. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiological Reviews* 4:35-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358177/pdf/cm00042-0051.pdf>
- Gillis M, Vanvan T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, and Kersters K. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp-nov for N-2-fixing isolates from rice in Vietnam. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45:274-289. <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/45/2/ijms-45-2-274.pdf?expires=1570735297&id=id&accname=guest&checksum=A3753345BCC75CCA575AEFC833B09F8F>
- Govan JRW, and Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60:539-574. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239456/pdf/600539.pdf>
- Gyaneshwar P, Kumar GN, and Parekh L. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* 245:83-93. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1020663916259.pdf>
- Heungens K, and Parke JL. 2000. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDRI on two oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 66:5192-5200. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92443/pdf/am005192.pdf>
- Huang Y, and Wong PTW. 1998. Effect of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* and soil type on the control of crown rot in wheat. *Plant and Soil* 203:103-108. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1004377801490.pdf>
- Ibarguren PM, Cobos-Trigueros N, Soriano A, Martínez JA, Zboromyrska Y, Almela M, y Mensa J. 2011. Bacteriemias por *Burkholderia cepacia*: análisis prospectivo de 33 episodios. *Revista Española de Quimioterapia* 24:209-212. <https://seq.es/seq/0214-3429/24/4/ibarguren.pdf>
- Isles A, Macluskay I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, and Levison H. 1984. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *Journal Pediatrics* 104: 206-210. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476\(84\)80993-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-3476(84)80993-2)
- Jacobs JL, Fasi AC, Ramette A, Smith JJ, Hammerschmidt R, and Sundin GW. 2008. Identification and onion pathogenicity of *Burkholderia cepacia* Complex isolates from the onion rhizosphere and onion field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3121-3129. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01941-07>
- Ham JH, Melanson RA & Rush MC. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology* 12: 329-339. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00676.x>
- Jiao Y, Yoshihara T, Ishikuri S, Uchino H, and Ichihara A. 1996. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. *Tetrahedron Letters* 37:1039-1042. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)02342-9](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039(95)02342-9)
- Jin Y, Zhou J, Zhou J, Hu M, Zhang Q, Kong Na, Ren H, Liang L and Yue J. 2020. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status. *Biology Direct* 15 (6): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13062-020-0258-5>
- Kang Y, Carlson R, Tharpe W, and Schell MA. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3939-3947. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106582/pdf/am003939.pdf>
- Keith L y Thammakijawat P. 2019. Detection of *Burkholderia gladioli* in Orchids. <https://doi.org/10.1094/9780890545416.048>
- Kim J, Kang Y, Choi O, Jeong Y, Jeong Y, Jeong J-E, Lim JY, Kim M, Moon JS, Suga H & Hwang I. 2007. Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in *Burkholderia glumae*. *Molecular Microbiology*, 64(1), pp.165-179. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05646.x>
- Knudsen GR, and Spurr HW Jr. 1987. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. *Plant Disease* 71:442-445. [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1987Articles/PlantDisease71n05\\_442.PDF](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1987Articles/PlantDisease71n05_442.PDF)
- Larsen GY, Stull TL, and Burns JL. 1993. Marked phenotypic variability in *Pseudomonas cepacia* isolated from a patient with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 31:788-792. <https://jcm.asm.org/content/jcm/31/4/788.full.pdf>
- Lee CH, Kim S, Hyun B, Suh JW, and Yon C, 1994. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)* 47:1402-1405. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.47.1402>
- Levy A, Chang BJ, Abbott LK, Kuo J, Harnett G, and Inglis TJJ. 2003. Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6250-6256. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.10.6250-6256.2003>

- Mahenthalingam E, Baldwin A, and Dowson CG. 2008. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology* 104:1539–1551. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03706.x>
- Martin FN, and Loper JE. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:111–81. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689991309216>
- Martínez-Aguilar L, Salazar-Salazar C, Díaz-Méndez R, Caballero-Mellado J, Hirsch AM, Vásquez-Murrieta MS, and Estrada-de los Santos P. 2013. *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 104:1063–1071. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-0028-9>
- Minerdi D, Fani R, Gallo R, Boarino A, and Bonfante P. 2001. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 67:725–732. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.2.725-732.2001>
- Mirghasempour S.A., Huang S., Xie G. L. 2018. First report of *Burkholderia gladioli* causing rice panicle blight and grain discoloration in China. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0758-PDN>
- Moon SS, Kang PM, Park KS, and Kim CH. 1996. Plant growth promoting and fungicidal 4-quinolinones from *Pseudomonas cepacia*. *Phytochemistry* 42:365–368. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00897-7](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(95)00897-7)
- Nandakumar R, Shahjahan AK, Yuan XL, Dickstein ER, Groth DE, Clark CA, Cartwright RD & Rush MC. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *US: Plant Disease* 93: 896-905. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-93-9-0896>
- Oren A, and Garrity GM. 2015b. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2777–2783. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000464>
- O'Sullivan LA, and Mahenthalingam E. 2005. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Letters in Applied Microbiology* 41:8–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01758.x>
- Parke JL, and Gurian-Sherman D. 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology* 39:225–258. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.225>
- Parker WL, Rathnum ML, Seiner V, Trejo WH, Principe PA, and Sykes RB. 1984. Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of Antibiotics* 37:431–40. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.37.431>
- Parra-Cota FI, Peña-Cabrales JJ, de los Santos-Villalobos S, Martínez-Gallardo NA, and Délano-Frier JP. 2014. *Burkholderia ambifaria* and *B. caribensis* promote growth and increase yield in rain amaranth (*Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*) by improving plant nitrogen uptake. *Public Library of Science ONE* 9:e88094. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088094>
- Partida-Martínez LP, Groth I, Schmitt I, Richter W, Roth M, and Hertweck, C. 2007. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2583–2590. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.64660-0>
- Peeters C, Meier-Kolthoff JP, Verheyde B, De Brandt E, Cooper VS, and Vandamme P. 2016. Phylogenomic study of *Burkholderia glathei*-like organisms, proposal of 13 novel *Burkholderia* species and emended descriptions of *Burkholderia sordidicola*, *Burkholderia zhejiangensis*, and *Burkholderia grimmiae*. *Frontiers in Microbiology*. 7:1-19. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00877>
- Pérez C y Saavedra E. 2011. Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Colombia: Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3(1): 111-124. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n1.2011.344>
- Plangklang P and Reungsang A. 2008. Effects of rhizosphere remediation and bioaugmentation on carbofuran removal from soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24:983-989. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9562-9>
- Plangklang P, and Reungsang A. 2011. Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by *Burkholderia cepacia* PCL3: A small-scale field study. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:902-905. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.011>
- Quesada-González A, García-Santamaría F. 2014. *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana* 25(2):371-381. <https://www.redalyc.org/pdf/437/43731480015.pdf>
- Ramírez-Rojas S, Osuna-Canizalez FJ, García-Pérez F, Canul-Ku J, Palacios-Talavera A, Hernández-Romano J, Ornelas-Ocampo K y Landa-Salgado P. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:173-183. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3>
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak K, Zielenski J, Lok J, Plasic J, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, and Tsui LC. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066–1073. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2475911>
- Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, Méndez-Canarios A, Ibarra JA y Estrada-de los Santos P. 2019. El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Revista Argentina de Microbiología* 51 (1): 84-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>

- Sánchez-Yáñez JM, Villegas Moreno J, Vela-Muzquiz GR, y Márquez-Benavides L. 2014. Respuesta del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) a la inoculación con *Azotobacter vinelandii* y *Burkholderia cepacia* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Scientia Agropecuaria* 5:115-120. <http://www.scielo.org.pe/pdf/agro/v5n3/a01v5n3.pdf>
- Sayler RJ, Cartwright RD & Yang Y. 2006. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *US: Plant Disease* 90 (5): 603-610. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0603>
- Sawana A, Adeolu M, y Gupta RS. 2014. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Frontiers in Genetics* 5: 1-22. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00429>
- Seo YS, Lim J, Choi BS, Kim H, and Goo E. 2011. Complete genome sequence of *Burkholderia gladioli* BSR3. *Journal of Bacteriology* 193:3149. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00420-11>
- Shahjahan AKM, Rush MC, Groth D, and Clark C. 2000. Panicle blight. Recent research points to a bacterial cause. *Rice Journal* 15:26-29. [www.ricejournal.com/april2000](http://www.ricejournal.com/april2000)
- Shields MS, Reagin MJ, Gerger RR, Campbell R and Somerville C. 1995. TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1352-1356. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7538275/>
- Singh RK, Malik N, and Singh S. 2013. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). *Nusantara Bioscience* 5:8-14. <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n050102>
- Sokol PA, Darling P, Woods DE, Mahenthalingam E, and Kooi C. 1999. Role of ornibactin biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia*: characterization of pvdA, the gene encoding L-ornithine N (5)-oxygenase. *Infection and Immunity* 67:4443-55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96763/pdf/ii004443.pdf>
- Stoyanova M, Georgieva L, Moncheva P, and Bogatzevska N. 2013. *Burkholderia gladioli* and *Pseudomonas marginalis* pathogens of *Leucojum aestivum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 27:4069-4073. <http://dx.doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0139>
- Suzuki F, Sawada H, Azegami K & Tsuchiya K. 2004. Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology* 70: 97-107. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0096-1>
- Tablan OC, Chorba TL, Schidlow DV, White JW, Hardy KA, Gilligan PH, Morgan WM, and Carson LA. 1985. *Pseudomonas cepacia* colonization in patients with cystic fibrosis: risk factors and clinical outcome. *The Journal of Pediatrics* 107:382-387. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(85\)80511-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(85)80511-4)
- Ulrich RL, DeShazer D, Hines HB, and Jeddeloh JA. 2004. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infection and Immunity* 72:6589-6596. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.11.6589-6596.2004>
- Van Borm S, Buschinger A, Boomsma JJ, and Billen J. 2002. *Tetraponera* ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 269:2023-2027. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2101>
- Van Oevelen S, De Wachter R, Vandamme P, Robbrecht E, and Prinsen E. 2002. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (Rubiaceae, angiosperms) and proposal of '*Candidatus Burkholderia kirkii*' sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:2023-2027. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-6-2023>
- Vandamme P, Henry D, Coenye T, Nzula S, Vancanneyt M, Lipuma JJ, Speert DP, and Govan JR. 2002. *Burkholderia anthina* sp. nov. *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 33:143-149. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2002.tb00584.x>
- Vandamme P, Holmes B, Coenye T, Goris J, Mahenthalingam E, Lipuma JJ, and Govan JR. 2003. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.—a new twist to an old story. *Research in Microbiology* 154:91-96. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00026-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00026-3)
- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M, Coenye T, Hoste B, Coopman R, Revets H, and Lauwers S. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:1188-1200. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-4-1188>
- Vandamme P, Mahenthalingam E, Holmes B, Coenye T, Hoste B, De Vos P, Henry D, and Speert DP. 2000. Identification and population structure of *Burkholderia stabilis* sp. nov. (Formerly *Burkholderia cepacia* genomovar IV). *Journal of Clinical Microbiology* 38:1042-1047. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86333/pdf/jm001042.pdf>
- Vermis K, Coenye T, Lipuma JJ, Mahenthalingam E, Nelis HJ, and Vandamme P. 2004. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:689-691. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02888-0>
- Vermis K, Coenye T, Mahenthalingam E, Nelis HJ, and Vandamme P. 2002. Evaluation of species-specific recA-based PCR tests for genomovar level identification within the *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Medical Microbiology* 51:937-940. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-51-11-937>

- Vidaver AK, Carlson RR. 1978. Leaf spot of field corn caused by *Pseudomonas andropogonis*. Plant Disease Report 62:213-216. <http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1004&context=bpdfpub>
- Weber CF, and King GM. 2017. Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing Paraburkholderia and Burkholderia: *Paraburkholderia hiiakae* sp. nov., *Paraburkholderia metrosideri* sp. nov., *Paraburkholderia paradisi* sp. nov., *Paraburkholderia peleae* sp. nov., and *Burkholderia alpina* sp. nov. a member of the *Burkholderia cepacia* Complex. Front. Microbiol. 8: 1-10. 207. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00207>
- Wiersinga WJ, van der Poll T, White NJ, Day NP, and Peacock SJ. 2006. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. Nature Reviews in Microbiology 4:272-282. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmi-cro1385X>
- Xin G, Zhang G, Kang JW, Staley JT, and Doty SL. 2009. A diazotrophic, indole-3-acetic acid-producing endophyte from wild cottonwood. Biology and Fertility of Soils. <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-009-0377-8>
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, and Hashimoto Y. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov. Microbiology and Immunology 36:1251-1275. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>
- 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>

# Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms

## Lisozimas: características, mecanismo de acción y aplicaciones tecnológicas en el control de microorganismos patógenos

**Alma Carolina Gálvez-Iriqui, Maribel Plascencia-Jatomea\***, Laboratory of Microbiology and Mycotoxins, Department of Food Research and Postgraduate, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales S/N, Colonia Centro, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México; **Silvia Bautista-Baños**, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, CEPROBI 8, C.P. 62731, San Isidro Yautepec, Morelos, México. \*Autor para correspondencia: maribel.plascencia@unison.mx

Recibido: 22 de Mayo, 2020.

Aceptado: 29 de Julio, 2020.

Gálvez-Iriqui AC, Plascencia-Jatomea M and Bautista-Baños S. 2020. Lysozymes: characteristics, mechanism of action and technological applications on the control of pathogenic microorganisms. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3): 360-383.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-6

Primera publicación DOI: 11 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 11, 2020.

**Abstract.** Since lysozymes and enzymes-like lysozymes have antibacterial and antifungal activity, they are becoming attractive as new alternatives for controlling pathogenic microorganisms. Although the antimicrobial enzymes have been proposed in the food industry and crop protection, their use involves some disadvantages. These include the inactivation by inhibitors, chemicals, or processing conditions, the high production and purification costs, and problems of solubility and

**Resumen.** Dentro de las enzimas antimicrobianas reportadas, las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas procedentes de diversas fuentes naturales han mostrado actividad antibacteriana y antifúngica, haciéndolas atractivas como nuevas alternativas para controlar los microorganismos patógenos. Aunque las enzimas antimicrobianas se han propuesto ampliamente en la industria alimentaria y en la protección de cultivos, su uso implica algunas desventajas, como la inactivación por inhibidores o productos químicos o condiciones de procesamiento, los altos costos de producción y purificación, y problemas de solubilidad e inestabilidad. La tecnología de inmovilización enzimática es una herramienta prometedora capaz de reducir estos inconvenientes, particularmente cuando está destinada a trabajar en medios sólidos. Esta revisión muestra el estado del arte sobre la actividad de la lisozima contra bacterias y hongos, centrándose en los mecanismos de acción involucrados. Además, también se discuten los aspectos y características más

instability. Enzyme immobilization is a promising tool capable of reducing some inconveniences, mainly when it is intended to work in solid media. This review shows state of the art on the lysozyme activity against bacteria and fungi, focusing on its mechanisms of action. The most important aspects and characteristics of the antimicrobial lysozymes and their possible technological application, including the application of chitosan-based polymeric matrices for the immobilization of the antimicrobial enzymes, are also discussed.

**Key words:** Antimicrobial enzymes, nanomaterials, polymeric matrices, chitosan

Enzymes belong to a great diversity of molecules from natural origin, and within their attributes, some of them possess antimicrobial activity (Oh and Park, 2018). Enzymes present particular characteristics that make them excellent biologic catalysts and can accelerate the rate at which specific biological reactions are carried out to form or degrade a new product (Sheng *et al.*, 2016). In microorganisms, as in other types of living organisms, enzymes play an essential role to perform their biological functions such as cell division and cell development, defense, and adaptation to unfavorable conditions in a given environment (Gow *et al.*, 2017). On the other hand, the ability of the microorganisms to colonize specific habitats has led to the emergence of various economic and health problems worldwide (Gálvez-Iriqui *et al.*, 2019). However, plants and organisms are not defenseless against the microbial offensive, since enzymes participate extensively in defense processes.

Currently, the antimicrobial enzymes that have been studied, are among others, the proteolytic, the oxidative, and those capable of hydrolyzing polysaccharides, including the

importantes de las lisozimas y su posible aplicación tecnológica, incluida la aplicación de matrices poliméricas a base de quitosano para la inmovilización de las enzimas antimicrobianas.

**Palabras clave:** Enzimas antimicrobianas, nanomateriales, matrices poliméricas, quitosano

Las enzimas pertenecen a una gran diversidad de moléculas de origen natural y, como parte de sus atributos, algunas poseen actividad antimicrobiana (Oh y Park, 2018). Las enzimas presentan características particulares que las convierten en excelentes catalizadores biológicos y aceleran la velocidad a la que se llevan a cabo las reacciones biológicas específicas para formar o degradar un nuevo producto (Sheng *et al.*, 2016). En los microorganismos, como en otros tipos de organismos vivos, las enzimas tienen un papel primordial en sus funciones biológicas, como la división y el desarrollo celular, la defensa y la adaptación a condiciones desfavorables en un ambiente dado (Gow *et al.*, 2017). Por otro lado, la capacidad que tienen los organismos de colonizar hábitats específicos ha dado como resultado el surgimiento de varios problemas económicos y sanitarios en todo el mundo (Gálvez-Iriqui *et al.*, 2019). Sin embargo, las plantas y los organismos no están indefensos ante el ataque microbiano, ya que las enzimas tienen una amplia participación en los procesos de defensa.

Hasta ahora, las enzimas antimicrobianas que han sido estudiadas son, entre otras, las proteolíticas, las oxidativas y las que tienen la capacidad de hidrolizar polisacáridos, incluidas las amilasas, las liasas, Dispersin B y las lisozimas (Thallinger *et al.*, 2013). En particular, se ha reportado ampliamente la actividad de las lisozimas contra varios microorganismos debido a su capacidad de hidrolizar los polímeros presentes en la pared celular de

amylases, lyases, Dispersin B, and lysozymes (Thallinger *et al.*, 2013). In particular, the activity of lysozymes against several microorganisms has been extensively reported due to their ability to hydrolyze the polymers present in the bacteria cell wall, specifically those that belong to the Gram (+) group (Phillips, 1967). In recent studies, the ability of this enzyme to hydrolyze the cell wall of fungi and yeast has also been reported (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Its enhancement as an antibacterial and antifungal agent by combining them with other active compounds has been reported (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018a). Biopolymeric molecules such as chitosan have been used to prepare functional materials or composites formulated with lysozyme. Chitosan is a polycationic biopolymer capable of retarding or inhibiting bacterial and fungal development by interacting with cellular components present in the membrane and cell wall (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

The lysozyme and chitosan combination has been used for developing materials in the form of solutions, films, fibers, hydrogels, and micro and nanoparticles, which have been proposed for controlling microorganisms within the fields of human health, agriculture, and food processing and preservation industry (Wu *et al.*, 2018a). Therefore, it is possible to assume that lysozyme alone or combines with chitosan is capable of acting on different biopolymer and peptides present in fungi and yeast cells inducing cell death or abnormalities during growth. Hence, the following review aims to present the most important aspects and characteristics of lysozymes and their technological applications as antimicrobial enzymes.

**Lysozyme overview.** Lysozyme or muramidase is part of the group of glycosidic hydrolases and catalyzes the hydrolysis of the  $\beta$  (1-4) bond between

las bacterias, específicamente aquellas que pertenecen al grupo Gram (+) (Phillips, 1967). En estudios recientes se ha reportado también la capacidad que tiene esta enzima de hidrolizar la pared celular de hongos y levaduras (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Asimismo se ha reportado su efectividad como agente antibacterial y antifúngico cuando se combina con otros compuestos activos (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018a). Las moléculas biopoliméricas como el quitosano se han utilizado en la preparación de materiales funcionales o de compuestos formulados a base de lisozimas. El quitosano es un biopolímero policationico capaz de retardar o inhibir el desarrollo de bacterias y hongos al interactuar con los componentes celulares presentes en la membrana y la pared celular (Bautista-Baños *et al.*, 2016).

La combinación de lisozimas y quitosano se ha utilizado en la fabricación de materiales en forma de soluciones, películas, fibras, hidrogeles y micro y nanopartículas, cuyo uso se ha propuesto para el control de microorganismos en los ámbitos de la salud humana, la agricultura y la industria de transformación y preservación de alimentos (Wu *et al.*, 2018a). Por tanto, es posible suponer que las lisozimas, solas o combinadas con el quitosano, pueden actuar en los diferentes biopolímeros y péptidos presentes en las células de los hongos y la levadura induciendo la muerte de la célula o anomalías durante el crecimiento. Por tanto, el objetivo de la siguiente revisión es presentar los aspectos y las características más importantes de las lisozimas y sus aplicaciones tecnológicas como enzimas antimicrobianas.

**Información general sobre la lisozima.** La lisozima o muramidasa forma parte del grupo de las hidrolasas glucosídicas y cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$  (1-4) entre la N-acetilglucosamina y el ácido

N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid of bacterial cell walls (Jana *et al.*, 2017). Its primary structure consists of one single polypeptide chain, which varies on the number of amino acid residues, 130 for the human lysozyme (hLyz), and 129 for the chicken lysozyme (cLyz) (Cao *et al.*, 2015). However, they are very similar in structure. The cLyz is an enzyme with 14.6 kDa and a high isoelectric point of 11.16 (Yu *et al.*, 2018). Meanwhile, the hLyz has 14.7 kDa and an isoelectric point of 9.28, however, aspartate-52 and glutamate-35 are the critical amino acids to the enzymatic activity (Cao *et al.*, 2015). Besides, the tertiary enzyme structure of both lysozymes has similarities, however, they differ in one beta region. Figure 1 shows the four alpha-helices, four random coils, and a double antiparallel beta-pleated sheet for human lysozyme, and a triple-stranded and antiparallel beta-pleated sheet for the chicken lysozyme (Strader, 2018). Generally, it folds into a compact and globular tertiary structure with a long slit on its surface (Sheng *et al.*, 2016; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018). The enzyme structure has six tryptophan (Trp-28, Trp-62, Trp-63, Trp-108,

N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias (Jana *et al.*, 2017). Su estructura primaria está formada por una cadena polipeptídica simple cuyo número de residuos de aminoácidos varía: 130 en la lisozima humana (hLyz) y 129 en la lisozima de pollo (cLyz) (Cao *et al.*, 2015). Sin embargo, ambas tienen una estructura muy similar. La cLyz es una enzima con 14.6 kDa y un alto punto isoeléctrico de 11.16 (Yu *et al.*, 2018), en tanto que la hLyz tiene 14.7 kDa y un punto isoeléctrico de 9.28; sin embargo, el aspartato-52 y el glutamato-35 son los aminoácidos esenciales en la actividad enzimática (Cao *et al.*, 2015). Además, la estructura terciaria de la enzima de ambas lisozimas es similar, pero difiere en una región beta. En la Figura 1 se muestran los cuatro hélices alfa, las cuatro bobinas aleatorias y una doble hoja beta plegada y antiparalela de la lisozima humana y una hoja beta plegada trenzada y antiparalela de la lisozima de pollo (Strader, 2018). En general, la lisozima se pliega en una estructura terciaria compacta y globular con una larga hendidura en su superficie (Sheng *et al.*, 2016; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018). La estructura de la enzima tiene seis triptófanos (Trp-28,

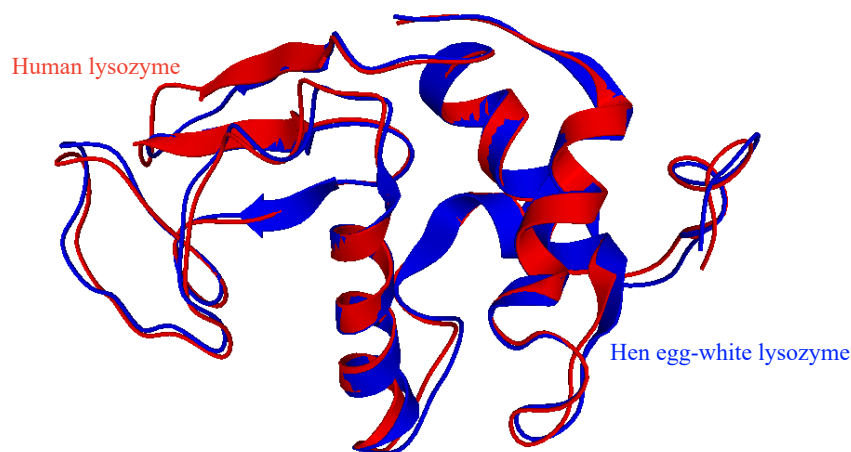


Figure 1. Tertiary structure of human (red) and egg-white (chicken, blue) lysozyme (Strader, 2018).  
Figura 1. Estructura terciaria de la lisozima humana (rojo) y de la lisozima de clara de huevo (pollo, azul) (Strader, 2018).



Trp-111, and Trp-123) and three tyrosines (Tyr-20, Tyr-23, and Tyr-53), where three Trp residues are situated at the substrate-binding site, two are on the hydrophobic part, and one is at the edge of the lysozyme. Within these amino acids, Trp-62 and Trp-108 are found in the substrate-binding site, performing an essential function of substrate binding and enzyme structure stabilization (Figure 2) (Sheng *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

**Lysozyme substrate.** Peptidoglycan is an essential component of the prokaryotic cell wall outside the cytoplasmic membrane (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). This polymeric structure is crucial for the bacterial cells; it carries out the maintenance of its morphology, serves as a scaffold to anchor other components on the cell envelope such as proteins, deals with the mechanical stress, and allows the diffusion of nutrients towards the plasma membrane containing the transporters (i.e., proteins, porins, permeases, among others) required for their translocation into the cytosol to achieve the survival of bacteria (Jana *et al.*, 2017). Peptidoglycan or murein is a biopolymer consisting

Trp-62, Trp-63, Trp-108, Trp-111 y Trp-123) y tres tirosinas (Tyr-20, Tyr-23 y Tyr-53), de los cuales tres residuos de Trp se localizan en el sitio de unión del sustrato, dos en la parte hidrofóbica y uno en el borde de la lisozima. Dentro de estos aminoácidos, Trp-62 y Trp-108 se encuentran en el sitio de unión del sustrato y desempeñan una función esencial en la unión del sustrato y la estabilización de la estructura de la enzima (Figura 2) (Sheng *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019).

**Sustrato de la lisozima.** El peptidoglucano es un componente básico de la pared celular de las procarionotas fuera de la membrana citoplásmica (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Esta estructura polimérica es fundamental para las células de las bacterias, ya que lleva a cabo el mantenimiento de su morfología, sirve como andamio para fijar otros componentes en la envoltura celular, como las proteínas, se ocupa del estrés mecánico y permite que los nutrientes lleguen a la membrana plásmica que contiene los transportadores (e.d., proteínas, porinas, permeasas, entre otros) necesarios para su translocación en el citosol, procesos todos estos

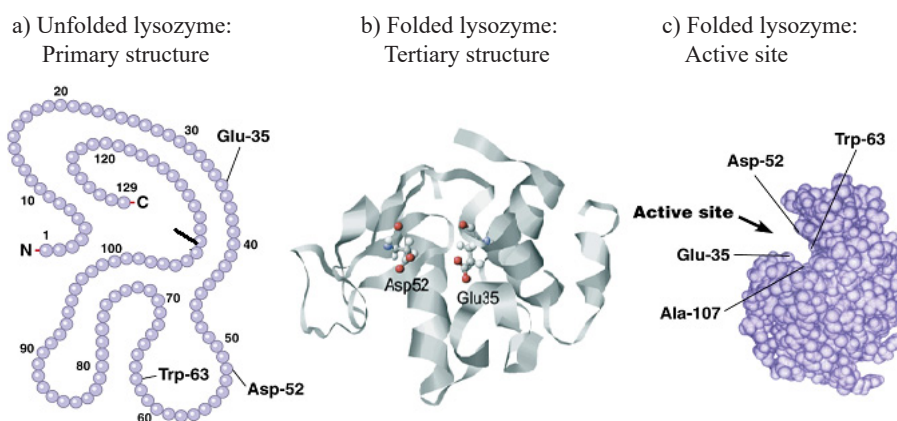


Figure 2. Chicken lysozyme primary (a) and tertiary structure (b). Active site with the amino acids responsible for the lysozyme activity (c). (Held and Van Smaalen, 2014; Hardin *et al.*, 2016).

Figura 2. Estructuras primaria (a) y terciaria (b) de la lisozima de pollo. Sitio activo con los aminoácidos responsables de la actividad de la lisozima (c). (Held y Van Smaalen, 2014; Hardin *et al.*, 2016).

of linear glucan chains, cross-linked by short peptides with different compositions depending on the type of bacteria. They are assembled by N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylmuramic acid (MurNAc) residues linked by  $\beta$  (1-4) bonds (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Pathogenic bacteria have developed resistance to the bacteriolytic activity of host secreted lysozyme during infection; the primary mechanism is the modification of its peptidoglycan glycan backbone (Sukhithasri *et al.*, 2013) (Figure 3).

necesarios para la supervivencia de las bacterias (Jana *et al.*, 2017).

El peptidoglucano o mureína es un biopolímero formado por cadenas lineales de glucanos, entrecruzadas por péptidos cortos con diferentes composiciones, dependiendo del tipo de bacteria. Están ensambladas por residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y el N-acetil ácido murámico (MurNAc) unidos por enlaces  $\beta$  (1-4) (Jana *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2018). Las bacterias patogénicas han generado resistencia a la actividad bacteriolítica

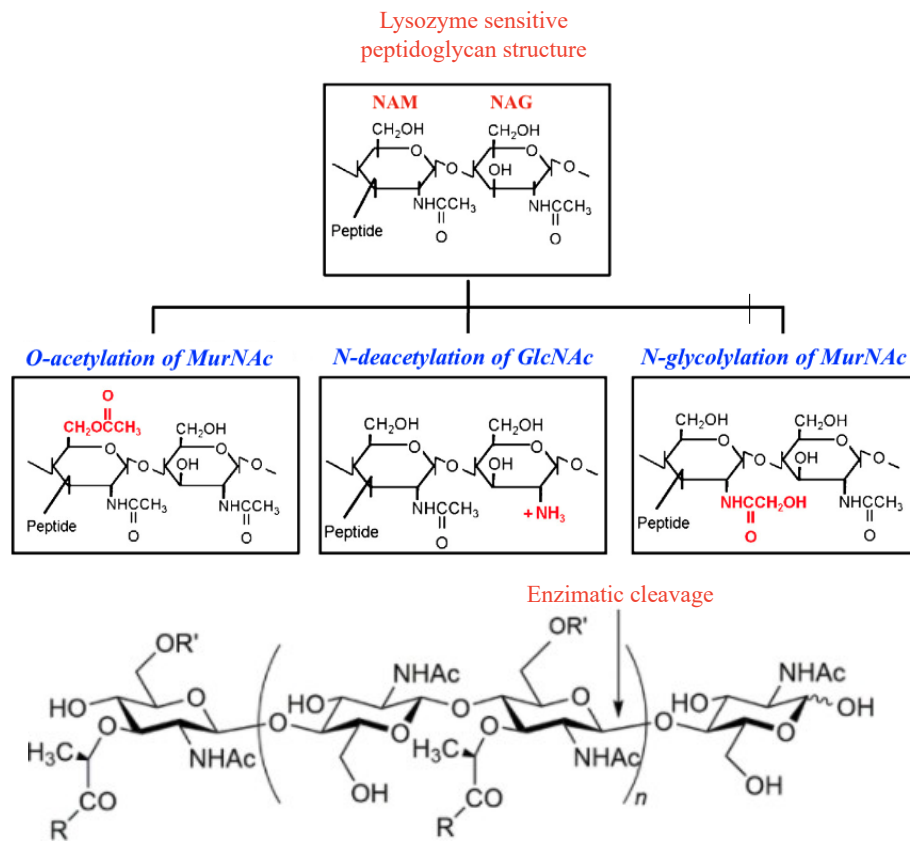


Figure 3. Structure of lysozyme sensitive and lysozyme resistant peptidoglycan (a) and enzymatic cleavage of lysozyme, (b) Pathogenic bacteria modify this structure by *O*-acetylation of NAM at C-6 position, *N*-deacetylation of NAG at C-2 position and *N*-glycosylation of muramic acid at C-2 position (Sukhithasri *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2019).

Figura 3. Estructura de un peptidoglucano sensible y uno resistente a la lisozima (a) y escisión enzimática de lisozima; (b) Bacteria patogénica que modifica esta estructura por *O*-acetilación de AAM en la posición C-6, *N*-deacetilación de NAG en la posición C-2 y *N*-glicosilación de ácido murámico en la posición C-2 (Sukhithasri *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2019).

Recently, the synthesis of monosaccharides and disaccharides from acetylmuramic acid (NAM) and the possibility that these compounds can bind to the lysozyme's active site, resulting in their hydrolysis, has been reported (Jana *et al.*, 2017). The arrangement in the space of the functional groups of these compounds can impede or promote the binding to the active site of the enzyme, in this case, methoxy (-OCH<sub>3</sub>), acetyl (-COCH<sub>3</sub>), and methyl (-CH<sub>3</sub>) groups. This study suggests that the substrates related to peptidoglycan, which can adopt the necessary conformation for interacting with the active site, will be hydrolyzed on the *o*-glycosidic bonds by the lysozyme.

This brings the query of how lysozyme and other polysaccharides different from the peptidoglycan can interact, especially those present in the cell wall of lysozyme-sensitive fungi or yeast, such as chitin and chitosan, which are structurally related, or even other polysaccharides such as  $\beta$ -glucans. However, these microorganisms do not have peptidoglycan. Interestingly, how it interacts at the molecular level with these polysaccharides has not been reported yet (Sowa-Jasiłek *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018;). Chitin (a long-chain polymer of N-acetylglucosamine) or chitosan (composed of randomly distributed  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine residues) may play an important role in the interaction of lysozyme with the fungal cell wall (Han *et al.*, 2012).

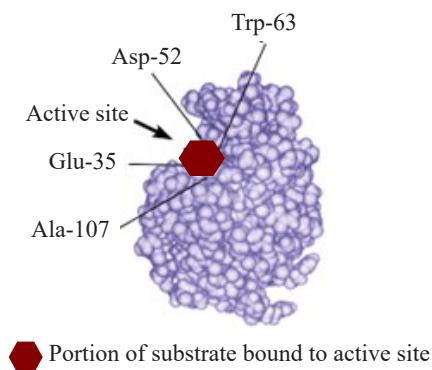
**Mechanism of catalysis.** The catalysis mechanism of lysozyme was the first to be studied in the glycosidases group. It catalyzes the cleavage of  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds between N-acetyl muramic acid and N-acetyl glucosamine in peptidoglycan (Yu *et al.*, 2018). Lysozyme has two carboxylic acid residues, aspartate-52, and glutamate-35, strategically positioned on the glycosidic bond and catalyze the cleavage in two steps (Figure 3, 4 and 5).

del hospedante que secreta la lisozima durante la infección; el mecanismo primario es la modificación de la cadena de su peptidoglucano glucano (Sukhithasri *et al.*, 2013) (Figura 3).

Recientemente, se ha reportado la síntesis de los monosacáridos y disacáridos del ácido acetil-murámico (AAM), así como la posibilidad de que estos compuestos puedan unirse al sitio activo de la lisozima, para producir su hidrólisis (Jana *et al.*, 2017). La disposición en el espacio de los grupos funcionales de estos compuestos pueden impedir o promover la unión al sitio activo de la enzima, en este caso, los grupos metoxilo (-OCH<sub>3</sub>), acetilo (-COCH<sub>3</sub>) y metilo (-CH<sub>3</sub>). Este estudio sugiere que los sustratos relacionados con el peptidoglucano, que puedan adoptar la conformación necesaria para interactuar con el sitio activo, serán hidrolizados en los enlaces *o*-glicosídicos por la lisozima.

De aquí surge la pregunta sobre cómo pueden interactuar la lisozima y otros polisacáridos distintos al peptidoglucano, sobre todo aquellos que están presentes en la pared celular de los hongos o la levadura, como la quitina y el quitosano, que están estructuralmente relacionados, o incluso otros polisacáridos como los  $\beta$ -glucanos. Sin embargo, es de destacar que estos microorganismos no tienen peptidoglucano. Es importante señalar que aún no se ha reportado la manera en que estos polisacáridos interactúan a nivel molecular (Sowa-Jasiłek *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018;). Es posible que la quitina (un polímero de cadena larga de N-acetilglucosamina) o el quitosano (compuesto de residuos de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidos a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)) tengan una función importante en la interacción entre la lisozima y la pared celular fúngica (Han *et al.*, 2012).

**Mecanismo de catálisis.** El mecanismo catalítico de la lisozima fue el primero que se estudió del grupo de las glicosidasas. Éste cataliza la escisión



**Figure 4. Enzyme-substrate complex for chicken lysozyme, where can be appreciated the catalytic residues Glu-35 and Asp-52 in the active site. Figure edited from Hardin *et al.*, 2016.**

**Figura 4. Complejo enzima-sustrato de la lisozima de pollo donde se pueden apreciar los residuos catalíticos Glu-35 y Asp-52 en el sitio activo. Figura editada de Hardin *et al.*, 2016.**

In general, the catalytic process initiates with a fragment of six residues of the polysaccharide (subsites A-F); this fragment binds to the active site of the enzyme, where all monomers of the fragment are readily embedded, except one (D). The D monomer undergoes a half-chair conformation, which changes to enter to a specific point of the active site of the enzyme. This site contains two ionic amino acids, glutamic (Glu-35) and aspartate acids (Asp-52). These two residues carry out quite different functions, where Glu-35 acts as an acid-base residue and the Asp-52 as an enzymatic nucleophile (Jana *et al.*, 2017).

Phillips (1967) established in his work the distance between the glycosidic oxygen-linking residues D and E. The nearest oxygen of Glu 35 is almost 3 Å, the nearest oxygen of Asp 52 is about 3 Å from the C(1) atom of sugar residue D, and about the same distance from the ring oxygen atom of that residue.

In the first step (glycosylation), D is strained into a conformation similar to a transition state.

de los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetil glucosamina en el peptidoglucano (Yu *et al.*, 2018). La lisozima tiene dos residuos de ácido carboxílico, aspartato-52 y glutamato-35, que se encuentran estratégicamente situados en el enlace glicosídico y catalizan la escisión en dos pasos (Figuras 3, 4 y 5).

En general, el proceso catalítico comienza con un fragmento de seis residuos del polisacárido (subsitos A-F); este fragmento se une al sitio activo de la enzima, donde todos los monómeros del fragmento son fácilmente incrustados, excepto uno (D). El monómero D produce una conformación de media silla, la cual cambia para entrar en un punto específico del sitio activo de la enzima. Este sitio contiene dos aminoácidos iónicos, ácidos glutámico (Glu-35) y aspartato (Asp-52). Estos dos residuos desempeñan funciones muy diferentes; el Glu-35 actúa como residuo ácido-base y el Asp-52 como un nucleófilo enzimático (Jana *et al.*, 2017).

En su trabajo, Phillips (1967) estableció la distancia entre los residuos glicosídicos D y E que unen el oxígeno. El oxígeno más cercano de Glu 35 es de casi 3 Å; el más cercano de Asp 52 es de aproximadamente 3 Å desde el átomo C(1) del residuo D de azúcar, y de aproximadamente la misma distancia desde el átomo de oxígeno del anillo de ese residuo.

En el primer paso (glicosilación), D se tensa en una conformación similar a la del estado de transición. El residuo ácido-base Glu-35 actúa como donador de un protón al oxígeno, que participa en la unión glicosídica de los residuos D y E; por tanto, la reducción del oxígeno induce la escisión del enlace C-O. Glu-35 tiene ahora un oxígeno de carga negativa y D es un ión inestable con carga positiva. Al mismo tiempo, el carboxilato desprotonado de Asp-52 realiza un ataque nucleofílico al carbón anomérico y, mediante resonancia, estabiliza el carbón con carga positiva. En el segundo paso

The acid-base residue Glu-35 acts by donating a proton to the oxygen, which participates in the glycosidic bond of residues D and E; therefore, the reduction of the oxygen, induces the cleaver of the C-O bond. Glu-35 now has a negatively charged oxygen, and D is an unstable, positively charged ion. At the same time, the deprotonated carboxylate of Asp-52 performs a nucleophilic attack on the anomeric carbon, and through resonance, stabilizes the positively charged carbon. In the second step (deglycosylation), the deprotonated Glu-35 acts as a general base where it accepts a proton (deprotonate). This proton comes from a directly positioned water molecule, performing a nucleophilic substitution in the glycosyl enzyme. The resulting hydroxide can bond with residue D, neutralizing the charge and causing its release from the cleft. Then the nucleophile is regenerated in the active site (Figure 5) (Stick *et al.*, 2009; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018; Wu *et al.*, 2019).

#### Catalytic differences among types of lysozymes.

Lysozyme and enzyme-like lysozyme (low muramidase activity) have been isolated and purified from natural sources and organisms.

(deglicosilación), el Glu-35 desprotonado actúa como base general donde acepta un protón (desprotonado). Este protón proviene de una molécula de agua directamente posicionada y lleva a cabo una sustitución nucleofílica en la enzima glicosil. El hidróxido resultante se puede unir con el residuo D neutralizando la carga y permitiendo su liberación de la hendidura. A continuación, el nucleófilo se regenera en el sitio activo (Figura 5) (Stick *et al.*, 2009; Jana *et al.*, 2017; Strader, 2018; Wu *et al.*, 2019).

#### Diferencias catalíticas entre los tipos de lisozimas.

La lisozima y las enzimas tipo lisozima (poca actividad de la muramidasa) han sido aisladas y purificadas a partir de fuentes y organismos naturales. Estas enzimas pueden inducir cambios en la estructura de la célula y causar la muerte de los microorganismos (Chen *et al.*, 2016). En los animales, existen cuatro principales tipos de lisozimas, que se clasifican dependiendo de la fuente: tipo-c (de pollo o convencional), tipo-g (ganso), tipo-i (invertebrado) y tipo-ch (chalaropsis) (Zhou *et al.*, 2017). Los tipos -c y -g se encuentran en todos los vertebrados, en tanto que los invertebrados

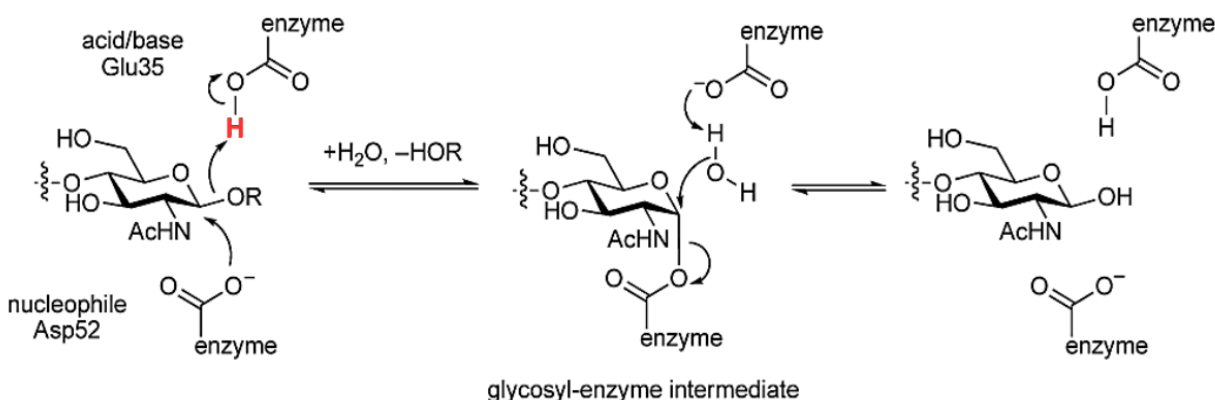


Figure 5. Catalytic mechanism of lysozyme mediated by Glu-35 and Asp-52 amino acids (Stick *et al.*, 2009).  
Figure 5. Mecanismo catalítico de la lisozima mediado por los aminoácidos Glu-35 y Asp-52 (Stick *et al.*, 2009).

These enzymes can induce changes in cell structure, leading microorganisms to death (Chen *et al.*, 2016). In animals, there are four main types of lysozymes, referring to the source: type-c (chicken or conventional), type-g (goose), type-i (invertebrate), and type-ch (chalaropsis) (Zhou *et al.*, 2017). Types -c and -g are found in all vertebrates, while invertebrates typically produce type-i. Different types of lysozyme have been reported in some invertebrates, for example, type-c lysozymes in Arthropoda, type-g in Mollusca, and type-ch in Nematodes (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

Table 1 summarizes diverse types of lysozymes and enzyme-like lysozymes from animals, plants, and those obtained from genetic recombination. In both vertebrates and invertebrates, lysozymes and enzyme-like lysozymes are multifunctional enzymes, which serve as non-specific innate immunity molecules responsible for antibacterial defense (pathogens and non-pathogens) and/or digestion (Zhou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). Notwithstanding, few studies report a previous stimulation with a bacterial or fungal infection in the host organisms to induce the expression of lysozymes and enzyme-like lysozymes (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019); Once were isolated some of them had low or null lysozyme or muramidase activity, however, exhibit high peptidase activity or were overexpressed on the digestive tract. This behavior suggests that in certain living organisms lysozymes or lysozyme-like enzymes have a primary function related to digestive functions and nutrition (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

The catalytic differences among the diverse types of lysozyme suggest that the lack of muramidase activity of the lysozymes type-i concerning type-c may be due to differences in the amino acid sequence. Zhou *et al.* (2017) obtained and purified a

típicamente producen el tipo-i. Los diferentes tipos de lisozima se han reportado en algunos invertebrados, por ejemplo, lisozimas tipo c en artrópodos, de tipo g en moluscos y de tipo-ch en nematodos (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

En el Cuadro 1 se resumen los diversos tipos de lisozimas y enzimas tipo lisozimas de animales, plantas y los que se obtienen por recombinación genética. Tanto en los vertebrados como en los invertebrados, las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas son enzimas multifuncionales que sirven como moléculas de inmunidad innata inespecífica responsables de la defensa antibacteriana (patógenos y no patógenos) y/o de la digestión (Zhou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). No obstante, pocos estudios han reportado estimulación previa con una infección bacteriana o fúngica en los organismos hospedantes para inducir la expresión de las lisozimas y las enzimas tipo lisozimas (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019); después de que fueron aislados, la actividad de la lisozima en algunos de ellos fue poca o nula, pero la actividad de la peptidasa aumentó o fue sobreexpresada en el tracto digestivo. Este comportamiento sugiere que ciertas lisozimas de organismos vivos o enzimas tipo lisozimas tienen una función primaria relacionada con las funciones digestivas y la nutrición (Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019).

Las diferencias catalíticas entre los diversos tipos de lisozima sugieren que la ausencia de actividad de la muramidasa de las lisozimas tipo-i con respecto a las de tipo-c podrían deberse a diferencias en la secuencia del aminoácido. Zhou *et al.* (2017) obtuvieron y purificaron una lisozima recombinante de tipo-i de cangrejo de manglar (*Scylla paramamosain*), que tenía 54% de similitud con la lisozima tipo-i aislada de camarón (*Litopenaeus vannamei*); ésta fue altamente expresada tanto en el tracto digestivo como en los hemocitos. El análisis de la secuencia del aminoácido reveló

**Table 1. Properties of some purified lysozymes isolated from animals, plants and genetic recombination.**  
**Cuadro 1. Propiedades de algunas lisozimas purificadas obtenidas de animales, plantas y recombinación genética.**

| Source of lysozyme  | Characteristic   | pH                              | Molecular Weight | Biological activity  | Reference                         |
|---|--|---------------------------------|------------------|--|-----------------------------------|
| Pupae<br>( <i>Cameraria ohridella</i> )                                 | Crude extract with lysozyme activity   | Experimental conditions: 6.4    | 15 & 28 kDa      | Antibacterial activity against <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus megaterium</i>  | Fiolka <i>et al.</i> , 2005       |
| Mung bean<br>( <i>Phaseolus mungo</i> )                                 | SLA = 355 U mg <sup>-1</sup> at 30 °C pI: 9.7<br>Optimum temperature of 55 °C            | Optimum at 5.5                  | 14.4 kDa         | Antifungal activity against <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>B. cinerea</i>   | Wang <i>et al.</i> , 2005         |
| Clam ( <i>Ruditapes philippinarum</i> )                                 | SLA = 3.76×10 <sup>5</sup> U mg <sup>-1</sup>  | 5.5                             | 13.4 kDa         | N/D  | Kim <i>et al.</i> , 2012          |
| Cauliflower<br>( <i>Brassica oleracea</i> )                             | EA = 133.0 µg<br>Optimum temperature of 40 °C  | 3.0-9.0<br>Optimum at 8         | 22.0 kDa         | Antimicrobial activity against <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>E. carotovora</i> , <i>F. solani</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Cheilomenes lunata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>A. alternata</i> | Manikandan <i>et al.</i> , 2015   |
| Lyz-i2 recombinant from white shrimp<br>( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) | Physicochemical parameters = N/D   | Experimental condition: 6.2     | 16.9 kDa         | Antibacterial activity against <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i>   | Chen <i>et al.</i> , 2016         |
| Lyz type-c from silkworm<br>( <i>Galleria mellonella</i> )              | Physicochemical parameters = N/D   | Experimental condition: 6.4-7.4 | N/D              | Activity against <i>Candida albicans</i>   | Sowa-Jasilek <i>et al.</i> , 2016 |
| Lyz type-i recombinant from mud crab<br>( <i>Scylla paramamosain</i> )  | Lyz with a 54% identity to Lys of <i>L. vannamei</i><br>Physicochemical parameters = N/D | Optimum at 8                    | 16 kDa           | Low muramidase activity, moderate antimicrobial activity against Gram (+) and Gram (-) bacteria and <i>C. albicans</i>   | Zhou <i>et al.</i> , 2017         |
| Lyz recombinant from whitefly<br>( <i>Bemisia tabaci</i> )              | Type-c: <i>Btlysc</i> ,<br>Type-I: <i>Btlysi1-Btlysi2</i>                                | Optimum at 6                    | 15 kDa           | Antibacterial activity against <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Staphylococcus aureus</i>   | Wang <i>et al.</i> , 2018         |
| Lyz type-i from earthworm<br>( <i>Eisenia andrei</i> )                  | Isopeptidase activity.<br>Chain of 226 amino acid residues                               | N/D                             | 22.2 kDa         | Important for the digestive system   | Yu <i>et al.</i> , 2019           |

<sup>a</sup>EA = enzymatic activity; <sup>b</sup>SLA = specific lysozyme activity, <sup>c</sup>pI = isoelectric point, <sup>d</sup>N/D = not determined. / <sup>e</sup>EA = actividad enzimática; <sup>f</sup>SLA = actividad específica de la lisozima, <sup>g</sup>pI = punto isoeléctrico, <sup>h</sup>N/D = no determinado.

type-i recombinant lysozyme from mud crab (*Scylla paramamosain*), which presented 54% similarity with type-i isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*); this was highly expressed in both, the digestive tract and the hemocytes. The amino acid sequence analysis revealed that this enzyme lacked the two amino acids responsible for muramidase activity, aspartic and glutamic acids. Despite this, type-i lysozyme homologs in invertebrates, *Splys-i* enzyme, showed antimicrobial activity against both Gram (+) and Gram (-) bacteria, as well as on fungal cells, when crabs were previously exposed to them. The authors suggest that the mechanism of action against these microorganisms is not related to muramidase activity, but to the isopeptidase activity and the protein agglutination phenomena on the microbial surface, making it possible to bind to cellular components such as peptidoglycan and lipopolysaccharide.

The lysozyme type-i obtained from the earthworm *Eisenia andrei* showed a polypeptide sequence of 226 amino acid residues, with 14 cysteine residues (Cys). The authors theorize that these Cys residues are possibly involved in the high numbers of sulfur bridges that distinguish the type-i from other lysozymes (Yu *et al.*, 2019). An important aspect of this enzyme sequence (*Ea-iLys*) is that it contains three residues of aspartic and glutamic acids and serine, promoting the activity of muramidase, alanine, and histidine-mediated isopeptidase. The 14 Cys residues form seven disulfide bridges, which block the few cleavage sites for trypsin (< 10), possibly making this enzyme resistant to digestive proteinases secreted by the intestinal glands. These differences suggest that this enzyme activity mainly focuses on digestive functions, instead of being part of the effectors of the immune system (Yu *et al.*, 2019). Finally, Wang *et al.* (2018) obtained from the whitefly (*Bemisia tabaci*) three genes for three

que esta enzima carecía de los dos aminoácidos responsables de la actividad de la muramidasa, los ácidos aspártico y glutámico. Pese a esto, los homólogos tipo-i de la lisozima en invertebrados, la enzima *Splys-i*, mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), así como en células fúngicas, cuando los cangrejos fueron previamente expuestos a éstas. Los autores sugieren que el mecanismo de acción contra estos microorganismos no está relacionada con la actividad de la muramidasa sino con la actividad de la isopeptidasa y los fenómenos de aglutinación de las proteínas en la superficie microbiana, haciendo posible la unión con los componentes de la célula como los peptidoglucanos y los lipopolisacáridos.

La lisozima tipo-i obtenida de lombriz de tierra *Eisenia andrei* mostró una secuencia del polipéptido de 226 residuos de aminoácidos, con 14 residuos de cisteína (Cys). La teoría de los autores es que posiblemente los residuos de Cys tienen que ver con el alto número de puentes de azufre que distinguen el tipo-i de otras lisozimas (Yu *et al.*, 2019). Un aspecto importante de esta secuencia enzimática (*Ea-iLys*) es que contiene tres residuos de ácidos aspártico y glutámico, y serina, que promueven la actividad de la muramidasa, la alanina y la isopeptidasa mediada por la histidina. Los 14 residuos de Cys forman siete puentes de disulfuro, que bloquean los pocos sitios de escisión de la tripsina (< 10), posiblemente haciendo que esta enzima sea resistente a las proteinasas digestivas que secretan las glándulas intestinales. Estas diferencias sugieren que la actividad de esta enzima se concentra principalmente en las funciones digestivas y que no es parte de los efectores del sistema inmunológico (Yu *et al.*, 2019). Por último, Wang *et al.* (2018) obtuvieron tres lisozimas recombinantes de tres genes de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), una de tipo-c (*Btlysc*) y dos de tipo-i (*Btlysi1* y *Btlysi2*). Estas enzimas mostraron variaciones en el número de



recombinant lysozymes, one type-c (*Btlysc*), and two type-i (*Btlysi1* and *Btlysi2*). These enzymes showed variations in the number of amino acids in their sequence, 146 for type-c and 156 and 160 for both type-i, respectively. Type-c contained eight conserved cysteine residues, while *Btlysi1* and *Btlysi2* had twelve conserved cysteine residues capable of forming six disulfide bridges.

These findings agree with Yu *et al.* (2019) and Zhou *et al.* (2017). They suggested that type-i lysozymes contain large numbers of disulfide bridges, due to their relation with the digestive function of *E. andrei* and *S. paramamosain*. Further, type-c lysozyme was expressed before and after the whitefly was infected with *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungus, without changing their behavior pattern; this suggested that the type-c lysozyme plays a role as an effector of the immunological system. The two types-i enzymes changed their expression pattern when the feeding of the flies varied and did not suffer any infection with pathogenic microorganisms, which indicates that these enzymes are closely related to digestive processes.

**Effect of pH and temperature on the enzymatic activity.** The amino acids responsible for the polysaccharide cleavage are susceptible to variations in the acidity of the medium. The pH and temperature affect the enzyme's catalytic activity and, therefore, the reaction rate, which performs the mechanism of action. Depending on the source of isolation and purification, the lysozyme may exhibit slight variations in its optimum pH and temperature (Table 1). Most studies show that the optimal pH ranges from slightly acidic (5.5-6.7) for type-c (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018) to alkaline (7.4-8) for type-i (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019;). The optimal temperature

aminoácidos en sus secuencias, 146 en las de tipo-c y 156 y 160 en las dos de tipo-i, respectivamente. Las de tipo-c contenían ocho residuos de cisteína conservados, en tanto que *Btlysi1* y *Btlysi2* tenían 12 residuos de cisteína conservados con la capacidad de formar seis puentes de disulfuro.

Estos resultados coinciden con los que obtuvieron Yu *et al.* (2019) y Zhou *et al.* (2017). Estos autores sugieren que las lisozimas de tipo-i contienen numerosos puentes de disulfuro debido a su relación con la función digestiva de *E. andrei* y *S. paramamosain*. Además, la expresión de la lisozima de tipo-c ocurrió antes y después de que la mosquita blanca fuera infectada con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, sin cambiar su patrón de comportamiento; esto sugiere que la lisozima tipo-c desempeña la función de un efector del sistema inmunológico. Las dos enzimas de tipo-i cambiaron su patrón de expresión cuando la alimentación de las mosquitas varió y no contrajeron ningún tipo de infección con microorganismos patogénicos, lo cual indica que estas enzimas están muy relacionadas con los procesos digestivos.

**Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática.** Los aminoácidos responsables de la escisión del polisacárido son susceptibles a variaciones en la acidez del medio. El pH y la temperatura afectan la actividad catalítica de la enzima y, en consecuencia, la velocidad de la reacción, que lleva a cabo el mecanismo de acción. Dependiendo de la fuente de aislamiento y purificación, la lisozima puede tener pequeñas variaciones en su pH y temperatura óptimos (Cuadro 1). La mayoría de los estudios indican que las escalas óptimas de pH van desde ligeramente ácido (5.5-6.7) para el tipo-c (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018) hasta alcalino (7.4-8) para el tipo-i (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2019;). La temperatura óptima de

of lysozymes varies depending on the source, but most studies indicate that it is around 40 °C for insects and animals.

**Antibacterial and antifungal activity of lysozyme.** The biological activity of lysozyme leads to a disturbance of the bacterial growth, especially Gram (+). Furthermore, the discovery of the lysozyme structure promoted more research studies about its possible application. In general, the lysozyme activity is determined using *Micrococcus* sp. strains, which serve as a substrate for visualizing the activity by turbidimetry. Currently, the *Micrococcus* sp. assay is considered a gold standard for measuring lysozyme activity (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012).

Fiołka *et al.* (2005) isolated and purified a lysozyme from the pupae of *Cameraria ohridella*, allowing the lysis of *Bacillus megaterium* cells, caused a decrease in the optical density of the bacterial growth compared with the lysozyme control. According to the authors, lysozymes may play two roles, a digestive way breaking down the ingested bacteria in the gut and a defense response against pathogens that enter the hemocoel. Wang *et al.* (2005) obtained similar results with a purified lysozyme from mung beans (*Phaseolus mungo*), which showed antibacterial and antifungal activities. The mung bean lysozyme seems to have more effectiveness in inhibiting *Fusarium solani* and *Botrytis cinerea*. Furthermore, it was able to interrupt the radial growth of *F. solani* and induced abnormalities in its cellular structure, such as detachment of cell membrane and cell wall of hypha, and leaking out of its cytoplasm, which suggested the vital role of lysozyme in the constitutive host defense mechanisms against microbial pathogens (Wang *et al.*, 2005). A lysozyme, isolated and purified from a cauliflower plant tissue, affected the growth of phytopathogenic fungi and bacteria such

las lisozimas varía según la fuente, pero la mayoría de los estudios indican que es de aproximadamente 40 °C para insectos y animales.

**Actividad antibacteriana y antifúngica de la lisozima.** La actividad biológica de la lisozima causa una interferencia en el crecimiento bacteriano, sobre todo en las Gram (+). Además, el descubrimiento de la estructura de la lisozima promovió más estudios de investigación sobre su posible aplicación. En general, la actividad de la lisozima se determina utilizando cepas de *Micrococcus* sp., que sirven como sustrato para visualizar la actividad por medio de turbidimetría. Actualmente, el ensayo de *Micrococcus* sp. es considerado el estándar de referencia para medir la actividad de la lisozima (Fiołka *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012).

Fiołka *et al.* (2005) aislaron y purificaron una lisozima de la pupa de *Cameraria ohridella* capaz de lisar las células de *Bacillus megaterium*, ocasionando una disminución en la densidad óptica del crecimiento bacteriano comparada con la del control de la lisozima. Según los autores, es posible que las lisozimas tengan dos funciones, una forma digestiva que descompone las bacterias ingeridas en el intestino y una respuesta de defensa contra patógenos que se introducen en el hemocele. Wang *et al.* (2005) obtuvieron resultados similares con una lisozima purificada de frijoles mungo (*Phaseolus mungo*), que mostraron actividad antibacteriana y antifúngica. Al parecer, la lisozima de frijol mungo es más eficaz para inhibir *Fusarium solani* y *Botrytis cinerea*. Además, pudo interrumpir en el crecimiento radial de *F. solani* e indujo anomalías en su estructura celular, como desprendimiento de la membrana celular y la pared celular de la hifa, así como fugas de su citoplasma, lo cual sugiere la función vital de la lisozima en los mecanismos constitutivos de defensa del hospedante contra patógenos microbianos (Wang *et al.*, 2005).

as *F. solani* and *Erwinia carotovora* that usually infects this crop (Manikandan *et al.*, 2015).

Regarding the activity against phytopathogenic fungi, *Acremonium obclavatum* showed higher enzymatic sensitivity, followed by *Leptosphaeria maculans* and *Alternaria alternata* (Manikandan *et al.*, 2015). All these studies suggest that lysozymes from plant and insect tissues inhibited bacteria and fungi; however, in some cases, the antibacterial activity of hen egg lysozyme remains more efficient than other types of lysozymes previously reported. Although the mechanism of action in which the lysozyme exerts the antibacterial activity has been already enlightened, to date, there is little information about the exact mechanism of action that the lysozymes follow to cause damage to the fungal cell surface (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017).

Lysozyme isolated from *Pithecellobium dulce* seeds exerted antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, with a rather high thermal stability at up to 80 °C for 15 min, at pH=8.0 (Sawasdipuksa *et al.*, 2011). The activity of hen egg-white lysozyme on the growth of dimorphic fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis* (Lopera *et al.*, 2008) and the anti-biofilm effect on *Candida albicans* (Sebaa *et al.*, 2017) have also been reported. When *P. brasiliensis* yeast cells were exposed to lysozyme, the multiple-budding ability was impaired. Also, ultra-structural changes like a fusion of lipid vacuoles, lamellar structures, subcellular degradation, and interruption of fibrillar layers were observed in conidia after exposure to the enzyme. Thus, lysozyme seems to exert a dual role as part of the antifungal defense mechanisms (Lopera *et al.*, 2008). Human lysozyme displayed >80% of antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Candida parasilopsis*, and *C. albicans*, commonly identified in patients with chronic rhinosinusitis (Woods *et al.*, 2011).

Una lisozima aislada y purificada del tejido de una planta de coliflor afectó el crecimiento de hongos fitopatógenos y bacterias como *F. solani* y *Erwinia carotovora*, que normalmente infectan este cultivo (Manikandan *et al.*, 2015).

Con respecto a la actividad contra hongos fitopatógenos, *Acremonium obclavatum* mostró una mayor sensibilidad a la enzima, seguida de *Leptosphaeria maculans* y *Alternaria alternata* (Manikandan *et al.*, 2015). Todos estos estudios sugieren que las lisozimas de tejido vegetal y de insectos inhiben el desarrollo de bacterias y hongos. Sin embargo, en algunos casos, la actividad antibacteriana de la lisozima de huevo de gallina sigue siendo más eficaz que la de otros tipos de lisozima previamente reportadas. Aunque ya se ha esclarecido el mecanismo de acción asociado a la actividad antibacteriana de la lisozima, a la fecha existe poca información acerca del mecanismo exacto de acción que las lisozimas siguen para dañar la superficie de la célula fúngica (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017).

Una lisozima aislada de semillas de *Pithecellobium dulce* ejerció actividad antifúngica contra *Macrophomina phaseolina*, con una alta estabilidad térmica de hasta 80 °C por 15 min y pH=8.0 (Sawasdipuksa *et al.*, 2011). También se ha reportado la actividad de la lisozima de clara de huevo de pollo en el crecimiento de hongos dimórficos como *Paracoccidioides brasiliensis* (Lopera *et al.*, 2008) y el efecto antibiopelícula en *Candida albicans* (Sebaa *et al.*, 2017). Cuando se expusieron células de levadura de *P. brasiliensis* a la lisozima, la capacidad de gemación múltiple disminuyó. Asimismo, se observaron cambios ultraestructurales como la fusión de vacuolas lípidas, estructuras laminares, degradación subcelular e interrupción de las capas fibrilares en los conidios después de su exposición a la enzima. Por tanto, la lisozima parece ejercer una doble función como parte de los mecanismos de defensa antifúngicos (Lopera *et al.*, 2008). La

It has been suggested that lysozyme can hydrolyze the ( $\beta$ -1,4)-glycosidic bonds between the N-acetylglucosamine monomers which integrate the chitin, affecting the cell wall function (Sowa-Jasilek *et al.*, 2016; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Sowa-Jasilek *et al.* (2016) indicated that the lysozyme affected the growth of *Candida albicans* since they enter in an apoptotic state, caused by a loss of the membrane potential in the mitochondria; however, the mechanism was not discussed. Various effects undergoing in the cell nucleus level, such as chromatin condensation and DNA fragmentation, were also observed. Hernández-Téllez *et al.* (2017, 2018) reported that chitosan-lysozyme nanoparticles and their separate components could disrupt the first stage of *Aspergillus parasiticus* growth. The authors found low percentages of cell viability at particle concentrations of 200 to 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The germination and diameter of spores, reducing sugar production, and membrane integrity, were also affected.

Until now, data about the mechanism of action of how lysozyme affects fungal development is still insufficient. Structural affectations could be associated with the  $\beta$ -1,3-glucanase production, which agree with the low reducing sugar production detected in *Aspergillus parasiticus* after exposure to chitosan-lysozyme nanoparticles (Hernández-Téllez *et al.*, 2017). It should be noted that these studies have been carried out using pure enzymes, without combination with other antimicrobial agents; therefore, it is necessary first to establish how the enzyme works on fungi and yeast, in order to achieve their technological applications in the pharmaceutical, food and agricultural industries.

**Lysozyme immobilization in chitosan-based antimicrobial nanomaterials.** The enzymes' industrial application is highly desirable due to their selectivity and specificity under moderate conditions (Figure 6).

lisozioma humana mostró >80% de actividad anti-fúngica contra *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium sp.*, *Acremonium sp.*, *Candida parasilopsis* y *C. albicans*, que comúnmente se identifican en pacientes con rinosinusitis crónica (Woods *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que la lisozioma puede hidrolizar los enlaces ( $\beta$ -1,4)-glicosídicos entre los monómeros N-acetilglucosamina que integran la quitina, afectando la función de la pared celular (Sowa-Jasilek *et al.*, 2016; Hernández-Téllez *et al.*, 2018). Sowa-Jasilek *et al.* (2016) indicaron que la lisozioma afectó el crecimiento de *Candida albicans*, ya que entra en un estado apoptótico, causado por una pérdida de la potencial membrana en la mitocondria; sin embargo, no describieron el mecanismo. También se observaron varios efectos nivel del núcleo de la célula, como la condensación de la cromatina y la fragmentación ADN. Hernández-Téllez *et al.* (2017, 2018) reportaron que las nanopartículas de quitosano-lisozioma y sus componentes por separado pudieron interrumpir la primera etapa del crecimiento de *Aspergillus parasiticus*. Los autores encontraron bajos porcentajes de viabilidad celular en concentraciones de partículas de 200 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La germinación y el diámetro de las esporas, la producción de azúcares reductores y la integridad de la membrana también fueron afectadas.

Hasta ahora, los datos acerca de cómo el mecanismo de acción de la lisozioma afecta el desarrollo fúngico siguen siendo insuficientes. Las afectaciones estructurales pueden estar relacionadas con la producción de  $\beta$ -1,3-glucanasa, lo cual coincide con la baja producción de azúcares reductores detectada en *Aspergillus parasiticus* después de su exposición a nanopartículas de quitosano-lisozioma (Hernández-Téllez *et al.*, 2017). Cabe señalar que en la realización de estos estudios se han utilizado enzimas puras, sin combinarlas con otros agentes antimicrobianos y que, por tanto, es necesario, en primerer lugar, establecer cómo trabaja la enzima en los hongos y la levadura, con el fin de llevar

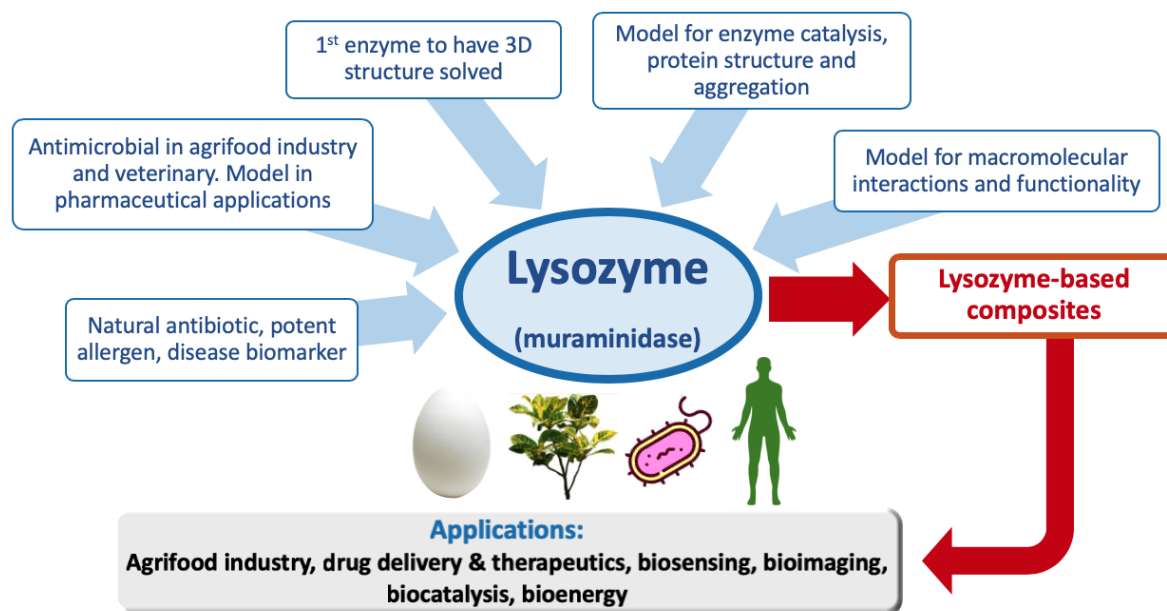


Figure 6. Importance and applications of lysozyme and lysozyme-based materials.  
Figure 6. Importancia y aplicación de lisozimas y materiales a base de lisozimas.

Furthermore, the enzymes can improve a large number of industrial processes in a sustainable and environmentally-friendly way, since their performance could reduce the use of chemical compounds and their inherent toxicity generated during the reactions (Bilal and Iqbal, 2019; Wang and Jiang, 2019). However, there are still some disadvantages to their application at the industrial level, such as high costs (depending on the process), low operational stability, deactivation by solvents, and the lack of recovery or recyclability, among others.

Regarding their biological origin, enzymes are soluble and could be inhibited by substrates and reaction products, metabolites, and other compounds in the media (Bilal and Iqbal, 2019). One proposed strategy is the immobilization of the enzymes in polymeric matrices designed to increase their antibacterial activity and prolong their activity and effectiveness. To date, this procedure has been carried out with different solid supports and has

a cabo su aplicación tecnológica en las industrias farmacéutica, alimentaria y agrícola.

**Inmovilización de la lisozima en nanomateriales antimicrobianos a base de quitosano.** La aplicación industrial de las enzimas se recomienda debido a su selectividad y especificidad en condiciones moderadas (Figura 6).

Además, las enzimas pueden mejorar un gran número de procesos industriales de manera sostenible e inocua para el medio ambiente, ya que su comportamiento podría reducir el uso de compuestos químicos, así como la toxicidad inherente que éstos generan durante las reacciones (Bilal e Iqbal, 2019; Wang y Jiang, 2019). Sin embargo, todavía existen algunas desventajas para su aplicación en la industria, como los altos costos (dependiendo del proceso), la poca estabilidad operacional, la desactivación por algunos solventes y la falta de recuperación o reciclabilidad, entre otras.

allowed overcoming the previously mentioned problems effectively but at a lower scale (Huang *et al.*, 2012; Wang and Jiang, 2019). Immobilization can improve the control of the reaction, prevents the contamination of the product by the enzyme, which is notably relevant in the food industry, allowing the use of different reactors. The enzyme immobilization technology can promote and improve enzyme stability.

Moreover, it supposes that enzymes immobilized can be reused. Even the immobilization technique can be used for enzyme isolation and purification purposes. Besides, this process is usually necessary when achieving optimal performance in non-aqueous media is crucial (Bilal and Iqbal, 2019). To date, the pre-existing solids to immobilize the enzymes is the most widespread strategy. Therefore, many polymers and their derivatives have been recommended, including alginate, cellulose, dextran, agarose, agar-agar, carrageenan, gelatin, guar gum, pectin, chitosan, and others (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Bilal and Iqbal, 2019).

The most-reported synthesis methods to perform the enzyme immobilization can be classified as physical and chemical. In the physical methods, the enzymes bind to the support with hydrogen bonds or by entrapment in the polymer matrix, while, in the chemical methods, the enzymes are closely united in the support by covalent bonds (Bilal and Iqbal, 2019). When using these methods, the enzyme immobilization is carried out by adsorption on insoluble materials, entrapment in polymeric gel networks, encapsulation, crosslinking using bifunctional agents, covalent binding to an insoluble vehicle, and the formation of enzyme aggregates by crosslinking. The enzyme immobilization generally provides better accessibility and additional stabilization denaturation processes. Immobilized enzymes have shown higher thermal and operational stability to pH, extreme temperature conditions, and organic solvents (Bilal and Iqbal, 2019). However,

Respecto a su origen biológico, las enzimas son solubles y podrían ser inhibidas por los sustratos y los productos de reacción, los metabolitos y otros compuestos en los medios (Bilal e Iqbal, 2019). Una estrategia que se propone es la inmovilización de las enzimas en matrices poliméricas diseñadas para aumentar su actividad antibacterial y prolongar su actividad y eficacia. A la fecha, este procedimiento se ha realizado con diferentes soportes sólidos y esto ha permitido resolver con buenos resultados los problemas antes mencionados, pero a menor escala (Huang *et al.*, 2012; Wang y Jiang, 2019). La inmovilización puede mejorar el control de la reacción, evitar que la enzima contamine el producto, un factor que es particularmente relevante en la industria alimentaria, permitiendo el uso de diferentes reactores. La tecnología de inmovilización de las enzimas puede promover y mejorar la estabilidad de la enzima.

Asimismo, esto supone la reutilización de las enzimas inmovilizadas. La técnica de inmovilización puede utilizarse incluso en el aislamiento y purificación de enzimas. Adicionalmente, este proceso suele ser necesario cuando se quiere lograr un comportamiento óptimo en medios no acuosos (Bilal e Iqbal, 2019). A la fecha, la estrategia más utilizada para inmovilizar enzimas es el uso de materiales sólidos preexistentes. Por tanto, se han recomendado muchos polímeros y sus derivados, incluidos el alginato, la celulosa, el dextrano, la agarosa, el agar-agar, la carragenina, la gelatina, la goma guar, la pectina, el quitosano y otros (Bautista-Baños *et al.*, 2016; Bilal e Iqbal, 2019).

Los métodos de síntesis que más se mencionan para la inmovilización de enzimas se pueden clasificar como físicos y químicos. En los métodos físicos, las enzimas se unen al soporte con enlaces de hidrógeno o por atrapamiento en la matriz del polímero, en tanto que en los métodos químicos las enzimas están estrechamente unidas en el soporte por enlaces covalentes (Bilal e Iqbal, 2019). Cuando

there still some practical problems to solve during enzyme immobilization, such as low load capacity on solid supports, low recovery rate, and the loss of enzymatic activity by the inhibitors (Wang and Jiang, 2019).

It is crucial to know the right immobilization technique, followed by selecting the support matrix to achieve the optimal enzyme immobilization. It is necessary to check out that the enzyme support matrix is robust and biocompatible with recoverable characteristics (Bilal and Iqbal, 2019). For this purpose, the natural polymeric matrices have been mostly studied due to their desired characteristics such as non-toxicity, biocompatibility, biodegradability, flexibility, sustainability, and the available number of reactive sites (Bilal and Iqbal, 2019; Wang and Jiang, 2019).

Chitosan is a widely used polymer, with all these characteristics, which makes it attractive for the food industry, pharmaceuticals, electrochemicals, biosensors, textiles, and coatings (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b). Several macro and nano-scale materials have been prepared from lysozyme and chitosan, whose use has been proposed to inhibit or retard the microbial growth. Among these materials, solution mixtures, hydrogels, fibers and nanofibers, and nano and microparticles, have been studied (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2018). The most-reported matrix to achieve lysozyme immobilization is chitosan, carried out by electrostatic interaction between the positive charges of chitosan and the negative charge of tripolyphosphate (TPP) (Yu *et al.*, 2018). However, the incorporation of other counter ions such as sodium alginate, carrageenan, and glutaraldehyde has allowed the synthesis of these materials, without losing its biological activity (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018c).

Another highlighting aspect is that, due to the complexity of the enzymes' isolation and

se utilizan estos métodos, la inmovilización de la enzima se lleva a cabo por medio de absorción en materiales insolubles, atrapamiento en redes de gel de polímeros, encapsulamiento, entrecruzamiento utilizando agentes bifuncionales, unión covalente a un vehículo insoluble y formación de agregados de enzimas por medio de entrecruzamiento. Por lo general, la inmovilización de la enzima proporciona una mejor accesibilidad y estabilidad adicional en los procesos de desnaturalización. Las enzimas inmovilizadas han mostrado mayor estabilidad térmica y operacional al pH, las condiciones de temperatura extremas y los solventes orgánicos (Bilal e Iqbal, 2019). Sin embargo, existen todavía problemas prácticos que tienen que resolverse durante la inmovilización de la enzima, como la poca capacidad de carga en soportes sólidos, la baja tasa de recuperación y la pérdida de actividad enzimática causada por los inhibidores (Wang y Jiang, 2019).

Es fundamental conocer la técnica correcta de inmovilización para, posteriormente, seleccionar la matriz de soporte y lograr la óptima inmovilización de la enzima. Es necesario verificar que la matriz de soporte de la enzima sea robusta y biocompatible con las características recuperables (Bilal e Iqbal, 2019). Con este propósito, se han hecho extensos estudios sobre las matrices poliméricas naturales debido a sus características deseables, como no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, flexibilidad, sustentabilidad y el número de sitios reactivos disponibles (Bilal e Iqbal, 2019; Wang y Jiang, 2019).

El quitosano es un polímero ampliamente utilizado, que cumple con todas estas características que lo hacen atractivo para la industria alimentaria, productos farmacéuticos, electroquímicos, biosensores, textiles y recubrimientos (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b). Se han preparado varios materiales a base de lisozimas y quitosano, a macro- y nano escala, cuyo uso se ha propuesto para inhibir o retardar el crecimiento microbiano.

purification from natural sources, these materials are commonly synthesized with commercial lysozymes from chicken egg-white, reducing their application to the biological activity (Table 2). Some reports suggest that lysozymes isolated

Entre estos materiales, se han estudiado mezclas de soluciones, hidrogeles, fibras y nanofibras, y nano- y micropartículas (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018b; Yu *et al.*, 2018). La matriz que más se ha reportado por lograr la inmovilización

**Table 2. Technological applications and biological activity of lysozyme.**  
**Cuadro 2. Aplicaciones tecnológicas y actividad biológica de la lisozima.**

| Source of lysozyme                | Immobilization   | Characteristics  | Technological application and biological activity   | References                            |
|-----------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|
| Commercial from chicken egg white | CS-TPP nanoparticles by ionic complexation                                   | 20000 U mg <sup>-1</sup> , D: 50-280 nm, EE (%): 47.3, PIEA (%): 85                                | Possible antimicrobial material, evaluation not reported  | Deng <i>et al.</i> , 2006             |
| Commercial from chicken egg white | Nanofibers by electrospinning: deposition of the components by layers        | 25,000 U mg <sup>-1</sup><br>Z: +26.4 mV   | Evaluated as antimicrobial packaging. <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i> were inhibited 60-80%                             | Huang <i>et al.</i> , 2012            |
| Commercial from chicken egg white | CS-TPP nanoparticles by ionic complexation                                   | ~100,000 U mg <sup>-1</sup> , D: 159 ± 24 nm, Z: +41.6 ± 1.1 mV, EE (%): 10 ± 0.2                  | Antimicrobial agent or possible drug. Evaluated against <i>S. epidermidis</i>   | Piras <i>et al.</i> , 2014            |
| Purified from egg white           | CS beads crosslinked with glutaraldehyde                                     | N/D  | Control <i>Oenococcus oeni</i> during the winemaking process  | Liburdi <i>et al.</i> , 2016          |
| Commercial from chicken egg white | CS-TPP nanoparticles by ionic complexation                                   | D: 297.9 nm, Z: + 39 mV, EE (%): 29.1  | Activity against <i>Bacillus subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>Serratia marcescens</i> and <i>E. coli</i>                | Matouskova <i>et al.</i> , 2016       |
| Commercial from chicken egg white | CS-TPP nanoparticles by ionic complexation                                   | D: 488.8 ± 10.22 nm, Z: +21.10 ± 0.84 mV, PDI: 0.71 ± 0.17, EE (%): 80%                            | Antibacterial material against <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>  | Wu <i>et al.</i> , 2017               |
| Commercial from chicken egg white | CS and sodium alginate hydrogels   | 5000 U mg <sup>-1</sup> , spherical shape, Z: -55 a -30 mV, SI: 45.66 ± 7.62, RRC(%): 87.72 ± 3.96 | Controlled release material to control foodborne microorganisms. Complete inhibition of <i>E. coli</i> and <i>S. aureus</i> | Wu <i>et al.</i> , 2018b              |
| Commercial from chicken egg white | CS-carrageenan-lysozyme nanoparticles by ionic complexation                  | 40000 U mg <sup>-1</sup> , D: 250 ± 8.1 nm, Z: +21.6 ± 0.8 mV, EE (%): 70 ± 1.7                    | Antifungal activity against <i>Aspergillus parasiticus</i>  | Hernández-Téllez <i>et al.</i> , 2018 |
| Commercial from chicken egg white | CS nanoparticles by ionic complexation with sodium alginate and calcium ions | 4000 U mg <sup>-1</sup> , D: 901.8 ± 75.50 nm, Z: +2.58 ± 0.87 mV, EE (%): 92.79 ± 0.53            | Antimicrobial material proposed for the food industry   | Wu <i>et al.</i> , 2018c              |

<sup>a</sup>CS: Chitosan; <sup>b</sup>D: hydrodynamic diameter (nm); <sup>c</sup>PIEA: post-immobilization enzyme activity; <sup>d</sup>Z: Z potential/charge; <sup>e</sup>EE: encapsulation efficiency; <sup>f</sup>T: film thickness; <sup>g</sup>SI: Swelling index; <sup>h</sup>RRC: relative release capacity; <sup>i</sup>TPP: tripolyphosphate; <sup>j</sup>ND: not determined. / <sup>a</sup>CS: Quitosano; <sup>b</sup>D: diámetro hidrodinámico (nm); <sup>c</sup>PIEA: actividad de la enzima después de la inmovilización; <sup>d</sup>Z: Z potencial/carga; <sup>e</sup>EE: eficiencia de encapsulación; <sup>f</sup>T: grosor de la película; <sup>g</sup>SI: Índice de dilatación; <sup>h</sup>RRC: capacidad relativa de liberación; <sup>i</sup>TPP: tripolifosfato; <sup>j</sup>ND: no determinado.



from plants, even if they are type-c or type-i, can affect a broad spectrum of phytopathogenic fungi, especially crop pathogenic species, where the enzyme was isolated (Wang *et al.*, 2005; Manikandan *et al.*, 2015). Although the research on chitosan and lysozyme has expanded in recent years, the functional materials developed from them have currently opened a new line of research worldwide.

**Conclusions and perspectives.** Lysozymes are present in a variety of living organisms, and notably, they play an important role in the immunological system, digestion, and nutrition. To date, it is well known that lysozymes and lysozyme-like enzymes can inhibit bacterial growth and affect fungi and yeasts. The reported action mechanisms for inhibiting fungi and bacteria include aggregation on the cell surface and, subsequently, the activity of muramidase and/or isopeptidase, which compromise important proteins and polysaccharides present in the cell wall. However, the mechanism to inhibit the fungal and yeast polysaccharides is still unclear. Although the type-c lysozyme is the most common enzyme used for antimicrobial purposes, other types are exhibiting this activity; thus, all types of lysozymes and lysozyme-like enzymes should be carefully studied, particularly those from plants and insects, since they can affect not only bacteria but also phytopathogenic fungi and yeast. Based on the literature review, it has been proposed to develop micro and nanomaterials formulated with these antimicrobial enzymes and polymeric matrices and the latter with polycationic polymers such as chitosan. Since it is expected that this combination could be capable of acting synergically for food preservation, crop protection, and pharmaceutical formulations, moreover, it is crucial to study the implications of its application at the laboratory and at higher-levels, specifically, on those materials directed to the control of phytopathogenic fungi.

de la enzima es el quitosano; la inmovilización se realizado por medio de la interacción electrostática entre las cargas positivas del quitosano y la carga negativa del tripolifosfato (TPP) (Yu *et al.*, 2018). Sin embargo, la incorporación de otros contraiones, como el alginato de sodio, el carragenano y el glutaraldehído, ha permitido la síntesis de estos materiales, sin que pierdan su actividad biológica (Hernández-Téllez *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018c).

Otro aspecto que cabe destacar es que, debido a la complejidad del aislamiento y la purificación de las enzimas de fuentes naturales, estos materiales suelen ser sintetizados con lisozimas comerciales de clara de huevo de pollo, reduciendo su aplicación en la actividad biológica (Cuadro 2). Algunos reportes sugieren que las lisozimas aisladas de plantas, ya sea si son de tipo-c o de tipo-i, pueden afectar una amplia diversidad de hongos, especialmente especies fitopatógenas, donde las enzimas fue aislada (Wang *et al.*, 2005; Manikandan *et al.*, 2015). Aunque en los últimos años se ha hecho mucho más investigación sobre el quitosano y la lisozima, hoy en día, los materiales funcionales generados a base de éstos han abierto una nueva línea de investigación en todo el mundo.

**Conclusiones y perspectivas.** Las lisozimas están presentes en una gran variedad de organismos vivientes y, de manera notable, desempeñan una función importante en el sistema inmunológico, la digestión y la nutrición. Hoy en día se sabe que las lisozimas y las enzimas tipo lisozima pueden inhibir el crecimiento bacteriano y afectar el desarrollo de hongos y levaduras. Los mecanismos de acción para inhibir el desarrollo de hongos y bacterias que se han reportado incluyen agregación en la superficie de la célula y, posteriormente, la actividad de la muramidasa y/o isopeptidasa, que afecta importantes proteínas y polisacáridos presentes en la pared celular. Sin embargo, todavía no se sabe muy bien de qué manera el mecanismo inhibe los polisacáridos

## LITERATURE CITED

- Bautista-Baños S, Romanazzi G and Jiménez-Aparicio A. 2016. Chitosan in the preservation of agricultural commodities. 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier Academic Press. New York, USA. 384 pp. ISBN 9780128027356. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03033-X>
- Bilal M and Iqbal HMN. 2019. Naturally-derived biopolymers: potential platforms for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules* 130(1): 462–482. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.152>
- Cao D, Wu H, Li Q, Sun Y, Liu T, Fei J, Zhao Y, Wu S, Hu X and Li N. 2015. Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS one* 10(2): e0118626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118626>
- Chen T, Ren C, Wang Y, Luo P, Jiang X, Huang W and Hu C. 2016. Molecular cloning, inducible expression and antibacterial analysis of a novel i-type lysozyme (lyz-i2) in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 54(1): 197–203. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.04.008>
- Deng Q, Zhou C and Luo B. 2006. Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology* 44(5): 336–342. <https://doi.org/10.1080/13880200600746246>
- Fiołka MJ, Ptaszyńska AA and Czarniawski W. 2005. Antibacterial and antifungal lysozyme-type activity in *Cameraria ohridella* pupae. *Journal of Invertebrate Pathology* 90(1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.015>
- Gálvez-Iriqui AC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Calderón-Santoyo M, Argüelles-Monal WM and Plascencia-Jatomea M. 2019. Synthesis of chitosan biocomposites loaded with pyrrole-2-carboxylic acid and assessment of their antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103:2985–3000. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09670-w>
- Gow NAR, Latge JP and Munro CA. 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. Pp: 267–291. In: Heitman JGN, Howlett B, Crous P and Stukenbrock EJT (Eds.). *The Fungal Kingdom*. Vol. 5. ASM Press. Washington, DC., USA. 1160p. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>
- Han T, Nwe N, Furuike T, Tokura S and Tamura H. 2012. Methods of N-acetylated chitosan scaffolds and its *In-vitro* biodegradation by lysozyme. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 5(1): 15–23. <https://doi.org/10.4236/jbise.2012.51003>
- Hardin J, Bertoni GP and Kleinsmith LJ. 2016. Enzymes: The Catalysts of Life. Pp:142-146. In: Hardin J and Bertoni G (Eds.). *Becker's World of the Cell*. 9th ed. Pearson Higher Ed. USA. 920p.
- Held J and van Smaalen S. 2014. The active site of hen egg-white lysozyme: flexibility and chemical bonding. *Acta Crystallographica Section D* 70(4): 1136–1146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S1399004714001928>
- Hernández-Téllez CN, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Rosas-Burgos EC, Lizardi-Mendoza J, de los hongos y la levadura. Aunque la lisozima de tipo-c es la que más se utiliza con propósitos antimicrobianos, otros tipos de lisozima manifiestan esta actividad. Por esta razón, es necesario estudiar cuidadosamente todos los tipos de lisozimas y las enzimas tipo lisozima, en particular las de plantas e insectos, ya que pueden afectar no solo a las bacterias sino también a los hongos patógenos y a levaduras. Con base en una revisión de literatura, se ha propuesto la producción de micro- y nanomateriales formulados con estas enzimas antimicrobianas y matrices poliméricas, y estas últimas con polímeros policatiónicos como el quitosano. Dado que se espera que esta combinación pueda actuar de manera signéfica en la preservación de alimentos, la protección de cultivos y formulaciones farmacéuticas, es además indispensable estudiar las implicaciones de su aplicación en el laboratorio y a niveles más altos, específicamente, en materiales destinados al control de hongos fitopatógenos.
- ~~~~~ End of the English version ~~~~~
- Torres-Arreola W and Plascencia-Jatomea M. 2018. Chitosan/ carrageenan/lysozyme particles: Synthesis, characterization and antifungal activity against *Aspergillus parasiticus*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17(3): 897-912. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n3/Hernandez>
- Hernández-Téllez CN, Rodríguez-Córdova FJ, Rosas-Burgos EC, Cortez-Rocha MO, Burgos-Hernández A, Lizardi-Mendoza J and Plascencia-Jatomea M. 2017. Activity of chitosan-lysozyme nanoparticles on the growth, membrane integrity, and  $\beta$ -1,3-glucanase production by *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech* 7(5): 279. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0913-4>
- Huang W, Xu H, Xue Y, Huang R, Deng H and Pan S. 2012. Layer-by-layer immobilization of lysozyme-chitosan-organic rectorite composites on electrospun nanofibrous mats for pork preservation. *Food Research International* 48(2): 784–791. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.06.026>
- Jana M, Ghosh A, Santra A, Kar RK, Misra AK and Bhunia A. 2017. Synthesis of novel muramic acid derivatives and their interaction with lysozyme: Action of lysozyme revisited. *Journal of Colloid and Interface Science* 498: 395–404. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.03.060>

- Kim M, Park M and Jeong Y. 2012. Purification and characterization of lysozyme from Filipino Venus, *Ruditapes philippinarum*. Food Science and Biotechnology 21(5): 1463–1468. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0193-z>
- Liburdi K, Benucci I, Palumbo F and Esti M. 2016. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. Food Control 63: 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.015>
- Lopera D, Aristizabal BH, Restrepo A, Cano LE and González A. 2008. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungi fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 50(3): 169–175. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000300008>
- Manikandan M, Balasubramaniam R and Chun SC. 2015. A single-step purification of Cauliflower lysozyme and its dual role against bacterial and fungal plant pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology 177(2): 556–566. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1747-3>
- Matouskova P, Marova I, Bokrova J and Benesova P. 2016. Effect of encapsulation on antimicrobial activity of herbal extracts with lysozyme. Food technology and biotechnology 54(3): 304. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.03.16.4413>
- Monteiro JM, Pereira AR, Reichmann NT, Saraiva BM, Fernandes PB, Veiga H and Pinho M. G. 2018. Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. Nature 554(7693): 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature25506>
- Oh YH and Park NG. 2018. Isolation of an invertebrate-type lysozyme from the body wall of spoon worm, *Urechis unicinctus*. Journal of Life Science 28(3): 300–306. <https://doi.org/10.5352/JLS.2018.28.3.300>
- Phillips D. 1967. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. Pp: 483–495. In: Symposium on Three-Dimensional Structure of Macromolecules of Biological Origin on October 19, 1966. Vol. 57(3). National Academy of Sciences. Durham, North Carolina, USA. 550p. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335535/?page=10>
- Piras AM, Maisetta G, Sandreschi S, Esin S, Gazzarri M, Batoni G and Chiellini F. 2014. Preparation, physical-chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme. International Journal of Biological Macromolecules 67: 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.016>
- Sheng L, Wang J, Huang M, Xu Q and Ma M. 2016. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. International Journal of Biological Macromolecules 92: 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.068>
- Sawasdipuksa N, Lei Z, Sumner LW, Niyomploy P and Sangvanich P. 2011. A lysozyme with antifungal activity from *Pithecellobium dulce* seeds. Food Technology and Biotechnology 49(4): 489–494. [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id\\_clanak\\_jezik=111619](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=111619)
- Sebaa S, Hizette N, Boucherit-Otmani Z and Courtois P. 2017. Dose-dependent effect of lysozyme upon *Candida albicans* biofilm. Molecular Medicine Reports 15(3): 1135–1142. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6148>
- Sowa-Jasiłek A, Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Wydrych J, Skrzypiec K, Mak P and Cytryńska M. 2016. *Galleria mellonella* lysozyme induces apoptotic changes in *Candida albicans* cells. Microbiological Research 193: 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.10.003>
- Stick RV, Williams SJ, Stick RV and Williams SJ. 2009. Enzymatic cleavage of glycosides: mechanism, inhibition and synthetic applications. Pp: 253–284. In: Stick RV and Williams S (Eds.). Carbohydrates: the essential molecules of life. Elsevier Science. 2nd Ed. 496pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-240-52118-3.00007-7>
- Strader S. 2018. Human Lysozyme. University of Virginia. [https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch06\\_Strader\\_S\\_Lysozyme\\_\(Human\)-\\_/index.html](https://collab.its.virginia.edu/access/content/group/f85bed6c-45d2-4b18-b868-6a2353586804/2/Ch06_Strader_S_Lysozyme_(Human)-_/index.html). (Consulta, 23 Julio 2020).
- Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Kumar VA and Biswas R. 2013. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. Microbiological Research 168(7): 396–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.005>
- Taylor EJ, Skjøt M, Skov LK, Klausen M, De Maria L, Gippert GP, Turkenburg JP, Davies GJ and Wilson KS. 2019. The C-type lysozyme from the upper gastrointestinal tract of *Opisthocomus hoatzin*, the stinkbird. International Journal of Molecular Science 20(22): 5531. <https://doi.org/10.3390/ijms20225531>
- Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS and Guebitz GM. 2013. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. Biotechnology Journal 8(1): 97–109. <https://doi.org/10.1002/biot.201200313>
- Wang D and Jiang W. 2019. Preparation of chitosan-based nanoparticles for enzyme immobilization. International Journal of Biological Macromolecule 126: 1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.243>
- Wang S, Ng TB, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P and Ye X. 2005. First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. Biochemical and Biophysical Research Communications 327(3): 820–827. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.077>
- Wang ZZ, Zhan LQ and Chen X. 2018. Two types of lysozymes from the whitefly *Bemisia tabaci*: Molecular characterization and functional diversification. Developmental and Comparative Immunology 81: 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.012>
- Woods CN, Hooper DN, Ooi EH, Tan L-W and Carney AS. 2011. Human lysozyme has fungicidal activity against nasal fungi. American Journal of Rhinology & Allergy 25(4): 205–208. <https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3631>
- Wu T, Ge Y, Li Y, Xiang Y, Jiang Y and Hu Y. 2018a. Quality enhancement of large yellow croaker treated with edible coatings based on chitosan and lysozyme. International Journal of Biological Macromolecules 120: 1072–1079. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.188>
- Wu T, Huang J, Jiang Y, Hu Y, Ye X, Liu D and Chen J. 2018b. Formation of hydrogels based on chitosan/alginate for the delivery of lysozyme and their antibacterial activity. Food Chemistry 240: 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.052>
- Wu T, Jiang Q, Wu D, Hu Y, Chen S, Ding T and Chen J. 2019. What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. Food Chemistry 274: 698–709. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>

- Wu T, Li Y, Shen N, Yuan C and Hu Y. 2018c. Preparation and characterization of calcium alginate-chitosan complexes loaded with lysozyme. *Journal of Food Engineering* 233: 109-116. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.03.020>
- Wu T, Wu C, Fu S, Wang L, Yuan C, Chen S and Hu Y. 2017. Integration of lysozyme into chitosan nanoparticles for improving antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 155: 192–200. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.08.076>
- Yu WZ, Zhang Y, Liu X, Xiang Y, Li Z and Wu S. 2018. Synergistic antibacterial activity of multi components in lysozyme/chitosan/silver/hydroxyapatite hybrid coating. *Materials & Design* 139: 351–362. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2017.11.018>
- Yu YS, Lee JY, Woo JW, Kim JS, Bae YH, Cho SJ and Park SC. 2019. Identification and expression pattern of a new digestive invertebrate-type lysozyme from the earthworm. *Genes & Genomics* 41(3): 367–371. <https://doi.org/10.1007/s13258-018-0776-z>
- Zhou J, Zhao S, Fang WH, Zhou JF, Zhang JX, Ma H and Li XC. 2017. Newly identified invertebrate-type lysozyme (Splys-i) in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting muramidase-deficient antimicrobial activity. *Developmental & Comparative Immunology* 74: 154–166. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2017.04.017>

# Fast method applied in previous evaluation of resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

## Método rápido aplicado en evaluación previa de resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

**Rómulo García-Velasco**, Universidad Autónoma del Estado de México, Centro Universitario Tenancingo, Carretera Tenancingo-Villa Guerrero Km 1.5, Tenancingo, Estado de México, CP 52400, México; **Nayanci Portal-González**, **Ramón Santos-Bermúdez**, Universidad Técnica “Luis Vargas Torres” de Esmeraldas, Campus Mútiles, San Mateo, Esmeraldas, CP 080150, Ecuador; **Ermis Yanes-Paz**, **José C. Lorenzo-Feijoo**, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez, Carretera a Morón Km 9, Ciego de Ávila, CP 69450, Cuba; **Barbarita Companioni-González\***, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro, No. 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, CP 25315, México. \*Autor para correspondencia: bcompanioni2007@gmail.com.

**Recibido:** 01 de Abril, 2020.

**Aceptado:** 08 de Junio, 2020.

García-Velasco R, Portal-González N, Santos-Bermúdez R, Yanes-Paz E, Lorenzo-Feijoo JC and Companioni-González B. 2020. Fast method applied in previous evaluation of resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 384-397.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.2004-1

Primera publicación DOI: 17 de Julio, 2020.

First DOI publication: July 17, 2020.

**Resumen.** En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia de cultivares de banano a la marchitez por *Fusarium*. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar el método para la diferenciación rápida a la enfermedad mediante la utilización del filtrado del cultivo de *Fusarium oxysporum* f.

**Abstract.** In previous works, a method to differentiate at leaf level the resistance of banana cultivars to *Fusarium* wilt was developed. The present study was carried out to evaluate such method by using fungus culture filtrates from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 VCG [01210] and race 2 VCG [0124/125] strains. Fungus culture filtrates were obtained during *in vitro* growth of the pathogen and the response of *Musa* spp cultivars to fungus culture filtrates was determined. The 15- and 29-days-old host-specific culture filtrates from both races 1 and race 2 strains were able to differentiate more than 93% of individuals with a known response to the pathogen *in vivo*. We demonstrated that resistance or susceptibility to banana *Fusarium* wilt could be differentiated with the use of culture filtrates from diverse population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and a reproducible bioassay on banana

sp. *cubense* raza 1 GCV [01210] y raza 2 GCV [0124/125]. Se procedió a la obtención de filtrados del cultivo del hongo durante el crecimiento *in vitro* del patógeno. Se determinó la respuesta de cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de filtrados del hongo para ambas razas. Los filtrados del cultivo del hongo de 15 y 29 días obtenidos a partir de las cepas de las razas 1 y 2, lograron diferenciar más del 93% de los individuos con una respuesta conocida al patógeno *in vivo*. Los resultados obtenidos demostraron que la resistencia o susceptibilidad del banano a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* puede diferenciarse a nivel foliar con el uso de filtrados del cultivo del hongo para diferentes poblaciones del patógeno; lo cual podría ser aplicable en los programas de mejoramiento genético de musáceas tanto convencional como biotecnológicas.

**Palabras clave:** selección de resistencia, filtrados del hongo, enfermedad, *Musa* spp.

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) están entre los cultivos más importantes en los países del trópico y el subtropical. Estos ocupan el cuarto lugar en importancia a escala mundial después del arroz, el trigo y el maíz (FAO, 2017). Sin embargo, la producción de estos cultivos se encuentra amenazada por el ataque de enfermedades como el Mal de Panamá o marchitez por *Fusarium*. Esta enfermedad causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa* (Ploetz, 2015). El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por ello, en los últimos años se ha considerado al mejoramiento genético para la resistencia como la solución más adecuada. Toda técnica del mejoramiento necesita de un procedimiento para la selección

detached leaves. Such results could be applicable in both conventional and biotechnological *Musaceae* breeding program.

**Key words:** resistance selection, fungus filtrates, disease, *Musa* spp.

Bananas and banana trees (*Musa* spp.) are among the most important crops in the countries of the tropics and subtropics. Worldwide, they are the fourth most important, after rice, wheat and maize (FAO, 2017). However, their production is threatened by diseases such as the Panama disease or the *Fusarium* wilt. This disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), is one of the most destructive and economically important in the genus *Musa* (Ploetz, 2015). The control of this disease with agrochemicals is costly and causes serious damages to the environment. Due to this, in recent years, breeding for resistance has been considered the most adequate solution. Every breeding technique requires a procedure for the positive selection of genotypes with the best traits (Buddenhagen, 2009). In earlier investigations, a method was developed to differentiate the resistance of banana tree cultivars at FOC race 1, at a foliar level, with the use of filtrates of the fungus culture (Companiononi *et al.*, 2003). However, the results for their introduction into the breeding programs in the crop on a massive scale need to be validated for different races of the fungus (isolations belonging to the group of plant compatibility (VCG) [01210] race 1; and the isolation belonging to VCG [0124/125] race 2. The present work was carried out with the aim of evaluating the method for the rapid differentiation of the Panama disease using the filtrate of the FOC culture FOC race 1 VCG [01210] and race 2 VCG [0124/125].

positiva de los genotipos con cualidades superiores (Buddenhagen, 2009). En trabajos previos se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia de cultivares de banano a FOC raza 1 mediante la utilización de filtrados del cultivo del hongo (Companioni *et al.*, 2003). No obstante, los resultados para su introducción masiva en los programas de mejoramiento genético en el cultivo requieren ser validados para diferentes razas del hongo (aislado perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa (GCV) [01210] raza 1; y el aislado perteneciente al GCV [0124/125] raza 2. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el método para la diferenciación rápida del Mal de Panamá mediante la utilización del filtrado del cultivo de FOC raza 1 GCV [01210] y raza 2 GCV [0124/125].

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, Cuba.

**Material vegetal.** Se utilizaron muestras foliares de plantas de banano de ocho a nueve meses de plantadas en el Banco de Germoplasma de Banano del Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales de Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. Todos los cultivares de banano utilizados fueron clasificados previamente en resistentes o susceptibles a FOC raza 1 y 2, por Pérez *et al.* (2004).

**Cepas fúngicas.** FOC raza 1 GCV [01210]; y raza 2 GCV [0124/125], procedentes del cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), La Habana, Cuba.

**Análisis estadístico.** En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario *Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versión 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997)*.

Research was carried out in the Plant-Pathogen Interaction Laboratory of the Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez” University, Cuba.

**Plant material.** We used foliar samples of banana trees eight to nine months after being planted in the Banana Germplasm Bank of the National Institute of Research in Tropical Foods of Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. All banana cultivars used were previously classified as resistant or susceptible to FOC race 1 and 2, by Pérez *et al.* (2004).

**Fungal strains.** FOC race 1 VCG [01210]; and race 2 VCG [0124/125], from the strain collection of the Plant Health Research Institute (INISAV), Havana, Cuba.

**Statistical analysis.** The statistical processing of data required the use of the *Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows, version 8, Copyright SPSS Inc., 1989-1997)*.

In the first part of the investigation, fungus culture filtrates were obtained during the *in vitro* growth of FOC race 1 VCG [01210]; and race 2 VCG [0124/125]. For this purpose, the optimum moment for the harvest of the fungus culture filtrate of races 1 and 2 was determined on a daily basis for 30 days. The following determinations were carried out: absorbance of the fungus culture filtrate (A), fresh mass of the fungus culture (g) and the phytotoxic activity of the fungus culture filtrates.

**Filtrations of the fungus culture (FC).** In order to obtain the culture in a liquid medium of the FOC strains corresponding to races 1 and 2 of the fungus, we took mycelium discs, 8 mm in diameter near the periphery of the culture grown in Petri dishes with a Potato Dextrose Agar culture medium. We added 100 mL of Czapek culture medium, modified according to Companioni *et al.* (2004) with a pH of

En la primera parte de la experimentación se procedió a la obtención de filtrados del cultivo del hongo durante el crecimiento *in vitro* de FOC raza 1 GCV [01210]; y raza 2 GCV [0124/125]. Para ello se determinó el momento óptimo para la cosecha del filtrado del cultivo del hongo de las razas 1 y 2 de forma diaria hasta los 30 días. Se realizaron las siguientes determinaciones: absorbancia del filtrado de cultivo del hongo (A), masa fresca del cultivo del hongo (g) y la actividad fitotóxica de los filtrados de cultivo del hongo.

**Filtrados del cultivo del hongo (FC).** Para obtener el cultivo en medio líquido de las cepas de FOC correspondientes a la raza 1 y 2 del hongo; se tomaron discos de micelio de 8 mm de diámetro próximos a la periferia de la colonia crecida en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa. Se añadió 100 mL de medio de cultivo Caldo Czapek modificado según Companioni *et al.* (2004) con un pH 5.5, en erlenmeyers de 250 mL de capacidad. Cada erlenmeyer se inoculó con un disco de micelio, y se incubó a  $28\pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidad luminosa, y con un fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Los FC del hongo se cosecharon de forma diaria hasta los 30 días, para ambas razas del hongo. En cada uno de los tiempos de evaluación se colectaron tres erlenmeyers con un volumen de 100 mL de medio de cultivo inoculado. El medio de cultivo líquido se filtró en cada uno de los tiempos evaluados a través de cuatro capas de gasa y luego por papel de filtro Whatman No. 1. Posteriormente, se determinó la masa fresca del cultivo del hongo para determinar el crecimiento del microorganismo. Antes de la determinación de la absorbancia; y la actividad fitotóxica de los FC del hongo, el FC se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Sigma-201M para eliminar los restos de micelio y conidios. El sobrenadante se pasó a través de filtros con poros

5.5, in 250 mL Erlenmeyer flasks. Each Erlenmeyer was inoculated with a mycelium disk and incubated at  $28\pm 2$  °C,  $56 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of light density and with a photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness. The fungal FCs were harvested on a daily basis for 30 days for both fungal races. In each one of the evaluation times, three Erlenmeyer flasks were collected with a volume of 100 mL of inoculated culture medium. The liquid culture medium was filtered in each of the times evaluated through four layers of fat, and then through Whatman No. 1 filter paper. The fresh mass of the fungal culture was then determined in order to determine the growth of the microorganism. Before determining the absorbance and the phytotoxic activity of the fungus FC, the FC was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes, using a Sigma-201M centrifuge to eliminate all the remaining mycelia and conidia. The supernatant was poured through filters with pores, 0.22 mm in diameter (Sartorius, NG, Göttingen, Germany).

**Absorbance of the fungal FC.** The fungal FCs obtained for both pathogen races were analyzed for absorbance in the UV region of the spectrum. For this, 1 mL aliquots of the fungal FC were diluted 1/25 in sterile distilled water, and the absorbance was measured from 250 to 300 nm in a UV-Vis spectrophotometer (LKB-Pharmacia).

**Phytotoxic activity of the fungal FC.** This was determined with the bioassay on banana detached leaves according to Companioni *et al.* (2003) in each time evaluated (1 to 30 days). Mid-aged leaves were collected, according to their position on the plant (leaves 3, 4, 5) of the cultivar Gros Michel (group AAA, susceptible to race 1); and Bluggoe (group ABB, susceptible to race 2). They were washed for 20 minutes with a commercial detergent, rinsed with sterile distilled water, and dried using Whatman No. 1 filter paper. Holes



de 0.22 mm de diámetro (Sartorius, NG, Göttingen, Alemania).

**Absorbancia del FC del hongo.** A los FC del hongo obtenidos para ambas razas del patógeno, se les realizó el análisis de la absorbancia en la región UV del espectro. Para ello alícuotas de 1 mL del FC del hongo se diluyeron 1/25 en agua destilada estéril; y se midió la absorbancia desde 250 a 300 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (LKB-Pharmacia).

**Actividad fitotóxica del FC del hongo.** Se determinó mediante el bioensayo de punteadura según Companioni *et al.* (2003) en cada tiempo evaluado (1 hasta 30 días). Se colectaron hojas de mediana edad según la posición en la planta (hojas 3, 4, 5) del cultivar Gros Michel (grupo AAA, susceptible a raza 1); y Bluggoe (grupo ABB, susceptible a raza 2). Estas se lavaron durante 20 minutos con detergente comercial, se enjuagaron con agua destilada estéril; y se secaron con papel de filtro Whatman No. 1. Se realizaron punteaduras con una aguja estéril sobre el lado adaxial del limbo de la hoja con 3 cm de separación entre ellas. Después del daño, se agregaron 5 µL del FC del hongo colectado en cada tiempo evaluado. Las hojas se incubaron a 28±2 °C, 56 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidad luminosa, fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y 70% de humedad relativa por 48 horas. Transcurridas las 48 horas se evaluó la actividad fitotóxica de los FC del hongo, a través de la expresión sintomatológica de necrosis formada alrededor del punto de aplicación del FC del hongo, expresada como área de la lesión elíptica (mm<sup>2</sup>).

El medio de cultivo Caldo Czapek, no inoculado con el hongo e incubado como se describió, se utilizó como tratamiento testigo para todos los experimentos evaluados en este trabajo. En este experimento, cada tratamiento incluyó tres hojas de plantas diferentes (18 heridas/hoja). Posteriormente,

were made with a sterilized needle on the adaxial side of the limbo of the leaf with a 3 cm separation between them. After the damage, 5 µL of the fungal FC of the fungus gathered in each time evaluated, were added. The leaves were incubated at 28±2 °C, 56 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> of light intensity, a photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness and a relative humidity of 70% for 48 hours. After this time, the phytotoxic activity of the fungal FCs was evaluated, through the symptomatological expression of necrosis formed around the point of application of the fungal FC, expressed as the area of the elliptical lesion (mm<sup>2</sup>).

The Czapek medium, not inoculated and incubated as described, was used as a control treatment for all the experiments evaluated in this work. In this experiment, each treatment included three leaves from different plants (18 lesions/leaf). Later, we determined the response of *Musa* spp. Cultivars to the application of the fungal FC of races 1 and 2, evaluated by the bioassay on banana detached leaves following Companioni *et al.* (2003). Fifteen banana cultivars with different levels of resistance to the *in vivo* pathogen were compared, following Pérez *et al.* (2004). The FC of race 1 of FOC was harvested after 15 days; and race 2, 29 days after inoculation in the Czapek medium.

Based on the absorbance values (250-300 nm) of the FC of the fungus obtained during the *in vitro* growth of the strain of FOC race 1, there are three crucial moments of excretion of metabolites into the culture medium, which correspond to days 15-16, 21-23 and 29-30 days of cultivation respectively (Figure 1). The highest level of absorbance was registered 15 days after planting, with 0.340. However, in the FOC race 2 culture filtrates, the highest absorbance levels were found on days 29 and 30 of cultivation (0.755 and 0.724 respectively), which resulted higher than those reached by FOC race 1 on day 15 of cultivation

se determinó la respuesta de cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de FC del hongo de la raza 1 y 2, evaluada por el bioensayo de punteadura en hojas de banano según Companioni *et al.* (2003). Se compararon quince cultivares de bananos con diferentes niveles de resistencia frente al patógeno *in vivo* según Pérez *et al.* (2004). El FC de la raza 1 de FOC se cosechó a los 15 días; y la raza 2 a los 29 días después de la inoculación en el medio de cultivo Caldo Czapek.

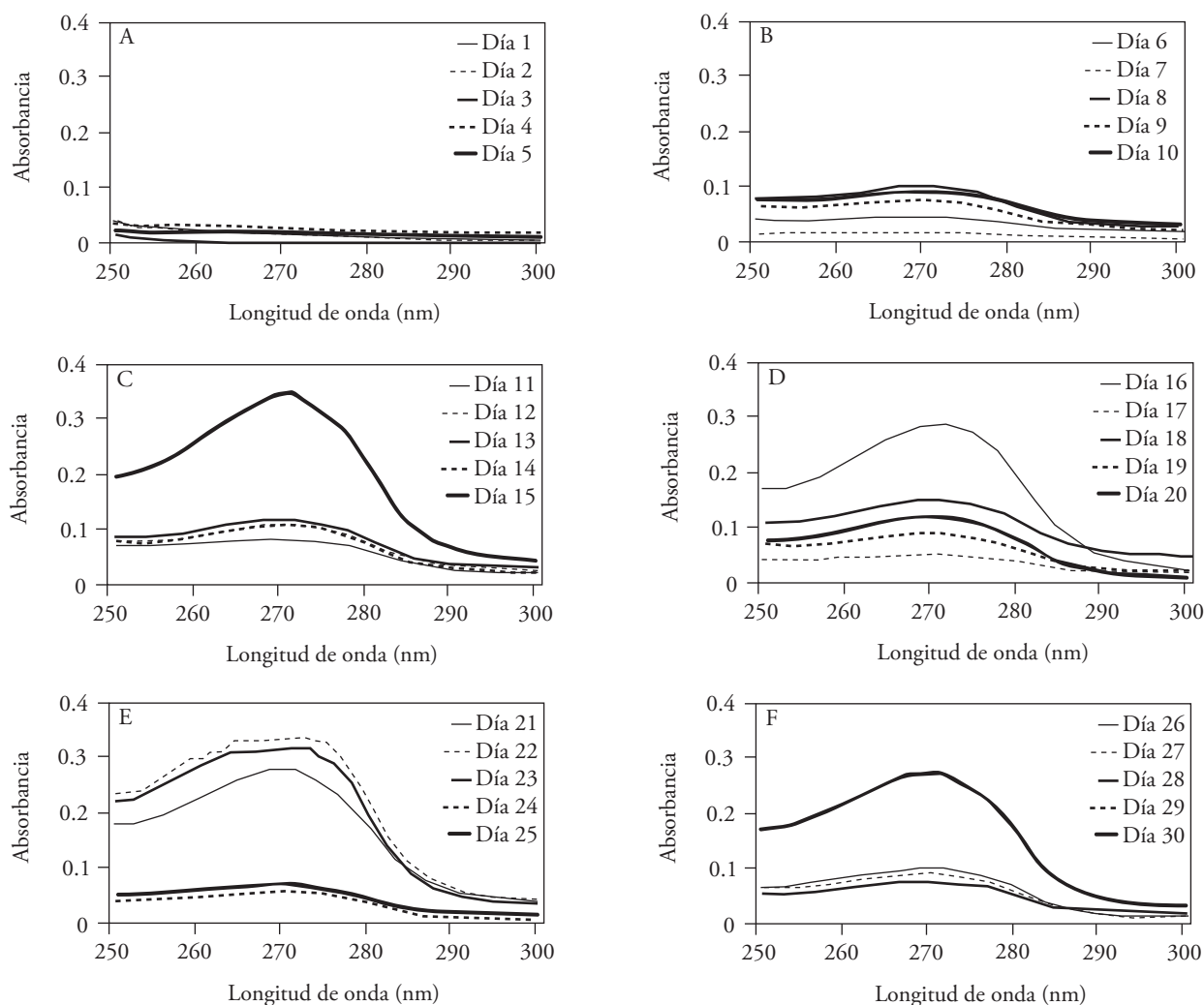
Sustentado en los valores de absorbancia (250-300 nm) de los FC del hongo obtenidos durante el crecimiento *in vitro* de la cepa de FOC raza 1, se aprecian tres momentos fundamentales de excreción de metabolitos al medio de cultivo, correspondientes a los 15-16, 21-23 y 29-30 días de cultivo respectivamente (Figura 1). El máximo de absorbancia se registró a los 15 días de cultivo con 0.340. Sin embargo, en los filtrados de cultivo de FOC raza 2 se detectaron los mayores valores de absorbancia a los 29 y 30 días de cultivo (0.755 y 0.724 respectivamente), que resultaron superiores a los alcanzados por FOC raza 1 a los 15 días de cultivo (Figura 2). Las especies del género *Fusarium* producen una amplia variedad de metabolitos secundarios (Sieber *et al.*, 2014). También es bien conocido que la expresión del metabolismo microbiano no está necesariamente asociada al máximo incremento de la masa del micelio sino a diferentes momentos en el crecimiento de los microorganismos; en dependencia de sus fuentes nutricionales y las condiciones de su cultivo *in vitro* (Etzerodt *et al.*, 2016)

Las condiciones de cultivo para ambas cepas de FOC posibilitó la excreción al medio, de metabolitos extracelulares producidos por el patógeno en diferentes momentos de su crecimiento *in vitro*. Los cuales pudieran estar asociado con la patogenicidad y/o la virulencia de estas cepas patogénicas

(Figure 2). The species of the genus *Fusarium* produce a wide variety of secondary metabolites (Sieber *et al.*, 2014). It is also well-known that the expression of the microbial metabolism is not necessarily related to the maximum increase of the myceliar mass, but rather to different moments in the growth of the microorganisms, depending on its sources of nourishment and the conditions of its *in vitro* cultivation (Etzerodt *et al.*, 2016).

The cultivation conditions for both FOC strains helped the excretion into the medium of extracellular metabolites produced by the pathogen in different moments of its growth *in vitro*, which could be related to the pathogenicity and/or the virulence of these pathogenic strains.

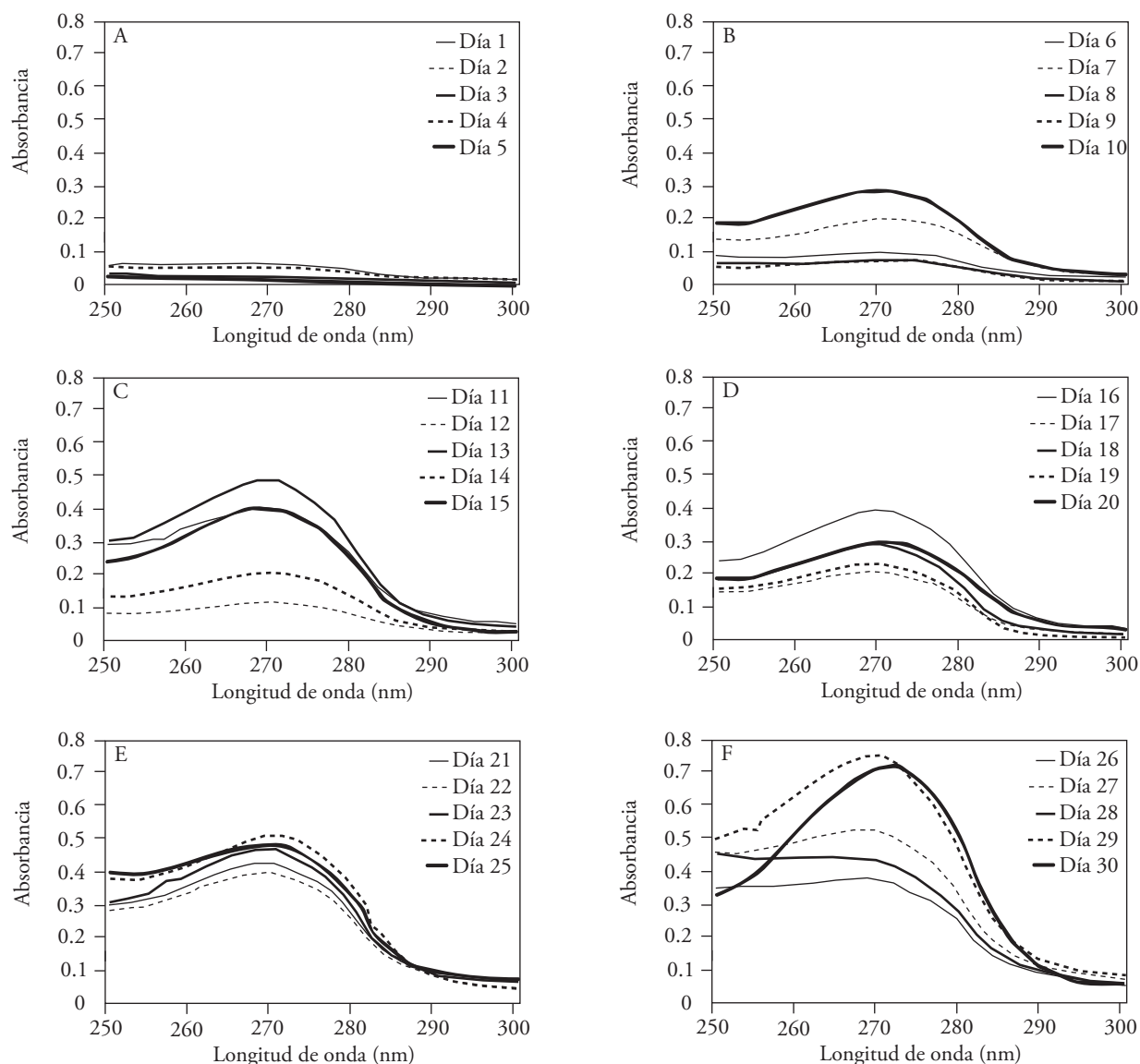
When the FOC race 1 [VCG 01210] was cultivated in a liquid medium, no rapid increase in the growth of the evaluated microorganism was found on the fresh mass for the first 18. This result may be related to a slow adaptation of the fungal strain to the culture medium, as well as to other conditions established for their growth and development. After day 18, the pathogen grows exponentially, and a maximum of 12.2 g was recorded for its fresh mass 22 days after inoculation (Figure 3A). However, related to the excretion of extracellular metabolites by the pathogen, the effect of the FC of the fungus on the responses of the foliar tissues of susceptible plants displayed notorious differences in diverse fungal cultivation times (Figure 3C). In general terms, although several moments can be observed with light phytotoxic activity of the FC, the highest levels were found on cultivation days 15-16, 21-23 and 29-30. The highest levels of phytotoxic activity match the increases in the absorbance of the culture filtrate and therefore, the synthesis of extracellular microbial metabolites. In general terms, the FC obtained showed specificity in their way of action. The highest levels of phytotoxicity



**Figura 1. Excreción al medio de cultivo de metabolitos durante el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 GCV [01210] en Caldo Czapek modificado.**  
**Figure 1. Excretion to the metabolite culture medium during the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 VCG [01210] in a modified Czapek medium.**

Cuando FOC raza 1 [GCV 01210] se cultivó en medio líquido, no se apreció un incremento rápido del crecimiento del microorganismo evaluado en masa fresca en los primeros 18 días. Este resultado puede ser asociado a una lenta adaptación de la cepa fúngica al medio de cultivo; y a otras condiciones establecidas para su crecimiento y desarrollo. A partir del día 18 el patógeno crece exponencialmente, y se registró un máximo de 12.2 g en su masa

evaluated, such as the area of the lesion on the susceptible genotype, were obtained when the FC cultivated on days 15-16 during the growth of FOC race 1 in the Czapek medium. According to Brakhage (2013), the production of microbial metabolites takes place in different phases of the growth curve of microorganisms, broadly linked to a particular phase for each one of them, yet highly influenced by the conditions of cultivation. On the



**Figura 2.** Excreción al medio de cultivo de metabolitos durante el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 2 GCV [0124/125] en Caldo Czapek modificado.

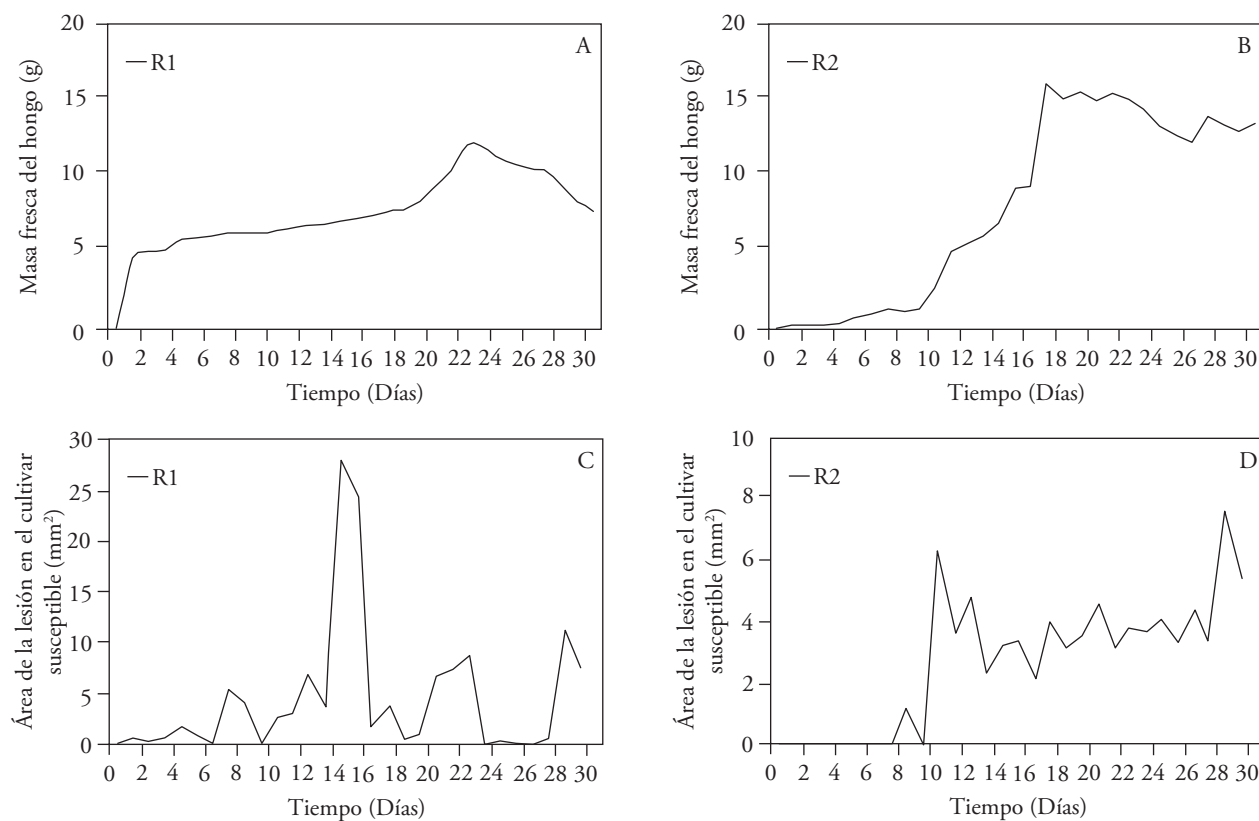
**Figure 2.** Excretion to the metabolite culture medium during the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 2 VCG [0124/125] in a modified Czapek medium.

fresca a los 22 días posteriores a la inoculación (Figura 3A). Sin embargo, asociado con la excreción de metabolitos extracelulares por el patógeno, el efecto de los FC del hongo en las respuestas de los tejidos foliares de plantas susceptibles exhibió notorias diferencias en diversos tiempos de cultivo

other hand, Zhang *et al.* (2015) showed that the microbial phytotoxins are metabolic products of the pathogen, characterized as pathogenicity and/or virulence factors. Based on the results obtained in the present investigation, these metabolical products are synthesized by the pathogen in a

del hongo (Figura 3C). De modo general, aunque pueden apreciarse varios momentos con ligera actividad fitotóxica del FC, los mayores niveles se detectaron a los 15-16, 21-23 y 29-30 días de cultivo. Los mayores niveles de actividad fitotóxica se corresponden con los incrementos en la absorbancia del filtrado de cultivo y por ende la síntesis de metabolitos microbianos extracelulares. En sentido general, los FC obtenidos mostraron especificidad en su modo de acción. Los mayores niveles de fitotoxicidad evaluados como área de la lesión sobre el genotipo susceptible, se lograron cuando el FC que se cosechó a 15-16 días durante el crecimiento

certain growth phase. The growth curve of the race 2 fungus displays increases in the fresh mass of the microorganism starting on day 9 after cultivation, reaching maximum values 18 days after inoculating in the culture medium (16.1 g) (Figure 3B). This displays a greater adaptation and assimilation of the components of the culture medium under the conditions established for its growth *in vitro* in relation to the strain of FOC race 1. Meanwhile, FOC race 2 is able to constantly produce phytotoxic molecules 10 days after it begins growing under the same conditions established for both strains (Figure 3D). However, although the evaluation of the



**Figura 3.** Actividad fitotóxica de filtrados de cultivo cosechados diariamente durante el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y 2. Masa fresca del patógeno (A y B), y área de la lesión en cultivares de banana susceptibles a la enfermedad *in vivo* (C y D).

**Figure 3.** Phytotoxic activity of filtrates of crops planted on a daily basis during the *in vitro* growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* races 1 and 2. Fresh mass of the pathogen (A and B), and area of the lesion in banana tree cultivars susceptible to the disease *in vivo* (C and D).

de FOC raza 1 en el medio de cultivo Caldo Czapek. Según Brakhage (2013), la producción de los metabolitos microbianos ocurre en diferentes fases de la curva de crecimiento de los microorganismos, estrechamente relacionada a una fase en particular para cada uno de ellos; pero muy influenciada por las condiciones de cultivo. Por otro lado, Zhang *et al.* (2015) demostraron que las fitotoxinas microbianas son productos metabólicos del patógeno, caracterizados como factores de patogenicidad y/o de virulencia. Basado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, estos productos metabólicos son sintetizados por el patógeno en determinada fase de crecimiento. La curva de crecimiento del hongo raza 2 muestra incrementos de la masa fresca del microorganismo a partir de los nueve días de cultivo, alcanzando valores máximos a los 18 días posteriores a la inoculación en el medio de cultivo (16.1 g) (Figura 3B). Lo cual evidencia una mayor adaptación y asimilación de los componentes del medio de cultivo bajo las condiciones establecidas para su crecimiento *in vitro* en relación a la cepa de la raza 1 de FOC. Mientras que FOC raza 2 es capaz de producir moléculas fitotóxicas de forma continua a partir de los 10 días de su crecimiento bajo las mismas condiciones establecidas para ambas cepas (Figura 3D). Sin embargo, aunque la evaluación de la actividad fitotóxica muestra la excreción de metabolitos fitotóxicos al medio de cultivo de forma continua, pudiera existir un proceso de conversión de los compuestos inicialmente sintetizados a otros que aún conservan la mostrada actividad fitotóxica. En el cultivar Bluggoe (susceptible) se observan daños, medidos como área de la lesión, de forma continua con los FC de 11 a 30 días de cultivo del hongo. Pero, a los 29 días del cultivo del patógeno en medio líquido se apreció un mayor daño sobre los tejidos de las plantas susceptibles. Varios investigadores en múltiples interacciones planta-patógeno han descrito la

phytotoxic activity shows the constant excretion of phytotoxic metabolites into the culture medium, there may be a process of conversion of the initially synthesized components into others that still maintain the displayed phytotoxic activity. The Bluggoe cultivar (susceptible) displays damages, measured as area of the lesion, in a continuous manner with the FCs of 11 to 30 days of cultivation of the fungus. Nevertheless, 29 days after the cultivation of the pathogen in the liquid medium, a greater damage was observed on the tissues of susceptible plants. Several researchers, on multiple plant-pathogen interactions, have described the extraction of culture filtrates with phytotoxic activities for their use as precocious selection agents for resistance. In addition, schemes have been developed for the isolation and purification of the metabolites involved in the selective response of plants (Ramírez *et al.*, 2015). The precocious selection of resistance in plants faced with different '*formae specialis*' of *Fusarium oxysporum* has been a crucial objective in conventional and biotechnological breeding. Raw extracts and pure metabolites of FOC cultivations have been used in the selection of resistant plants (Companiononi *et al.*, 2003; Saraswathil *et al.*, 2016).

The cultivars observed to be the most susceptible to the FC of race 1 were Manzano Criollo, Gros Michel, Pisang Lilin and Yangambi km 5, with no statistical differences between them, followed by the del cultivar Paka. All FHIA cultivars evaluated (01, 02, 03, 04, 18 and 21) were observed to be resistant to the phytotoxic action of the FC race 1 VCG [01210], without statistical differences in their respective responses. Cultivars Burro Criollo, Pelipita, Pisang jari guaya and Bluggoe also proved to be resistant, with a similar response to those of the FHIA (Table 1).

Pérez *et al.* (2004) determined, among other studies, the reaction of different cultivars towards

obtención de filtrados de cultivo con actividad fitotóxica para su uso como agentes de selección precoz de resistencia. Además, se han desarrollado esquemas para el aislamiento y purificación de los metabolitos involucrados en la respuesta selectiva de las plantas (Ramírez *et al.*, 2015). La selección precoz de resistencia en plantas frente a diferentes ‘*formae specialis*’ de *Fusarium oxysporum* ha sido un objetivo primordial en el mejoramiento genético convencional y biotecnológico. Extractos crudos y metabolitos puros de cultivos de FOC se han usado en la selección de plantas resistentes (Companioni *et al.*, 2003; Saraswathil *et al.*, 2016).

Los cultivares que se mostraron más susceptibles al FC de la raza 1 fueron Manzano Criollo, Gros Michel, Pisang Lilin y Yangambi km 5, sin diferencias estadísticas entre ellos, seguido del cultivar Paka. Todos los cultivares FHIA evaluados (01, 02, 03, 04, 18 y 21) se mostraron resistentes a la acción fitotóxica del FC raza 1 GCV [01210], sin diferencias estadísticas en sus respectivas respuestas. También se mostraron resistentes los cultivares Burro Criollo, Pelipita, Pisang jari guaya y Bluggoe, con respuesta similar a la de los FHIA (Cuadro 1).

Pérez *et al.* (2004) determinaron, entre otros estudios, la reacción de diferentes cultivares frente a las poblaciones de FOC de Cuba, y la frecuencia de plantas enfermas. Sus resultados muestran que la raza 1 afecta con mayor frecuencia los cultivares Gros Michel, Yangambi km 5, Paka y Manzano. Mientras que menores afectaciones mostraron Pisang Lilin, Pisang jari buaya, FHIA03 y FHIA-18. En los resultados descritos en este trabajo, el bioensayo del FC del hongo raza 1 en hojas del cultivar Pisang Lilin mostró una reacción de susceptibilidad, en contraposición a la respuesta de tolerancia determinada previamente en condiciones de campo por Pérez *et al.* (2004). Por su parte, el FC de 29 días de FOC raza 2 causó los mayores daños a los

the FOC populations in Cuba, and the frequency of diseased plants. Their results show that race 1 most frequently affects the cultivars Gros Michel, Yangambi km 5, Paka and Manzano Criollo, while Pisang Lilin, Pisang jari buaya, FHIA03 and FHIA-18 showed the least effects. In the results described in this work, the bioassay of the FC of the race 1 fungus on Pisang Lilin cultivar leaves displayed a reaction of susceptibility, as opposed to the response of tolerance, determined previously under field conditions by Pérez *et al.* (2004). On the other hand, the 29-day FCs of FOC race 2 caused the greatest damage on cultivars Burro Criollo, Pisang jari guaya, FHIA-03 and Bluggoe, while in cultivars Manzano Criollo, Gros Michel, Pelipita, Pisang Lilin, Paka and Yangambi Km 5, they displayed a similar resistance response to the evaluated FHIA. The bioassay of the cultivar Pisang jari buaya revealed a susceptibility response, unlike the tolerance displayed in the mentioned field evaluations. In this sense, the problem concerning the resistance tests under *in vivo* is the task of ensuring a homogenous distribution of the inoculant of the pathogen in all plants to be evaluated. Some plants may have received an excessive amount of the inoculant, while the others may not receive enough inoculant to develop the disease (Mert and Karakaya, 2003). Additionally, there are concerns over the effect of the environment on inoculated plants studied in the field (Ribeiro *et al.*, 2011). On the other hand, it is not always possible to characterize the FOC populations using pathogenicity tests, due to the interactions of the plant with the environment. There is proven evidence of the differential response of plants under different environmental conditions to established differential groups (Li *et al.*, 2013). The FCs of 15 and 29 days obtained from FOC strains of races 1 and 2, were able to differentiate over 93% of the individuals with a known response to

**Cuadro 1. Respuesta de los cultivares de *Musa* spp., a la aplicación de filtrados del cultivo del hongo de la raza 1 y 2, evaluado mediante el bioensayo de punteadura en hojas de banano; y en evaluaciones previas de campo frente al microorganismo *in vivo*.**

**Table 1. Responses of the *Musa* spp. cultivars to the application of filtrates of the fungus culture of races 1 and 2, evaluated with the bioassay on banana detached leaves and in earlier field evaluations faced with the microorganism *in vivo*.**

| Cultivares             | Área de la lesión (mm <sup>2</sup> ) |                                       |
|------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
|                        | FOC raza1 GCV [01210]<br>(Día 15)    | FOC raza 2 GCV [0124/125]<br>(Día 29) |
| Manzano Criollo (AAB)  | *** 53.6 a                           | * 2.3 b                               |
| Gros Michel (AAA)      | *** 55.4 a                           | * 2.8 b                               |
| Yangambi Km 5 (AAA)    | *** 55.3 a                           | ** 4.1 b                              |
| Paka (AA)              | *** 52.4 a                           | * 3.5 b                               |
| Pisang Lilin (AA)      | ** 54.4 a                            | * 3.4 b                               |
| Pisang jari guaya (AA) | ** 4.1 b                             | ** 52.8 a                             |
| Burro Criollo (ABB)    | * 3.2 b                              | *** 54.0 a                            |
| Bluggoe (ABB)          | * 2.1 b                              | *** 53.7 a                            |
| Pelipita (ABB)         | * 3.4 b                              | * 2.6 b                               |
| FHIA-01 (AAAB)         | * 3.6 b                              | * 2.3 b                               |
| FHIA-02 (AAAB)         | * 2.5 b                              | * 2.6 b                               |
| FHIA-03 (AABB)         | ** 2.8 b                             | *** 53.5 a                            |
| FHIA-04 (AAAB)         | * 3.4 b                              | * 3.2 b                               |
| FHIA-18 (AAAB)         | ** 3.2 b                             | * 4.1 b                               |
| FHIA-21 (AAAB)         | * 4.0 b                              | ** 4.8 b                              |

Medias con letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (Análisis de varianza univariante, ANOVA de un factor, ANOVA y HSD de Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Respuesta de los cultivares en evaluaciones en campo según Pérez *et al.*, 2004): \*Resistente, \*\*Tolerante, \*\*\*Susceptible / Averages with same letters indicate no statistically significant differences (One-factor univariant analysis of variance, ANOVA, Tukey ANOVA and HSD,  $p \leq 0.05$ ). Responses of the cultivars in field evaluations according to Pérez *et al.*, 2004): \*Resistant, \*\*Tolerant, \*\*\*Susceptible.

cultivares Burro Criollo, Pisang jari guaya, FHIA-03 y Bluggoe. Mientras que los cultivares Manzano Criollo, Gros Michel, Pelipita, Pisang Lilin, Paka y Yangambi Km 5, mostraron una respuesta de resistencia similar a los FHIA evaluados. El bioensayo del cultivar Pisang jari buaya reveló una respuesta de susceptibilidad, diferente a la tolerancia mostrada en las mencionadas evaluaciones de campo. En tal sentido, el problema que concierne las pruebas de resistencia en condiciones *in vivo* es la tarea de garantizar una distribución homogénea del inóculo del patógeno en todas las plantas a evaluar. Algunas plantas pueden haber recibido una cantidad

the pathogen *in vivo*. The remaining 7% consisted, in both cases, of an intermediate response to the disease under natural conditions. It is important to point out that, in order to establish a method to evaluate the resistance to diseases, it must be better than the traditional one in terms of work, space and time, aspects which are considered in this method, tested for both races of the pathogen.

The results obtained in this work show that the method to differentiate susceptibility or resistance to the Panama disease according to Companioni *et al.* (2003) can be performed in a quick and non-destructive way with the use of the FC of the fungus



excesiva del inóculo, mientras que las otras pueden no recibir suficiente inóculo para desarrollar la enfermedad (Mert y Karakaya, 2003). Además, existe preocupación por el efecto del ambiente en las plantas inoculadas estudiadas en campo (Ribeiro *et al.*, 2011). Por otra parte, no siempre es posible caracterizar las poblaciones de FOC mediante pruebas de patogenicidad debido a las interacciones de la planta con el ambiente. Existen demostradas evidencias acerca de la respuesta diferencial de las plantas bajo condiciones ambientales diferentes para grupos diferenciales ya establecidos (Li *et al.*, 2013). Los FC de 15 y 29 días obtenidos a partir de las cepas FOC de las razas 1 y 2, lograron diferenciar más del 93% de los individuos con una respuesta conocida al patógeno *in vivo*. El 7% restante consistió en ambos casos de una respuesta intermedia a la enfermedad en condiciones naturales. Es importante señalar que para establecer un método de evaluación de la resistencia a las enfermedades es necesario que el mismo sea superior al tradicional en trabajo, espacio y tiempo aspectos que son tenidos en cuenta en este método ensayado para ambas razas del patógeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método para la diferenciación de la susceptibilidad o resistencia al Mal de Panamá según Companioni *et al.* (2003) puede realizarse de forma rápida; y no destructiva con el uso de FC del hongo tratados en las hojas para diferentes poblaciones del patógeno, lo cual podría ser aplicable para los programas de mejoramiento genético de musáceas, tanto convencional como biotecnológicas. Por otro lado, constituyen los primeros resultados enfocados a la validación del método que rompe el esquema biológico natural del ciclo de la enfermedad. Además, propician las bases para futuros proyectos relacionados con la identificación de los metabolitos fitotóxicos, y de la especificidad de presuntos genes de avirulencia del patógeno. Lo

treated in on leaves for different populations of the pathogen, which may be applicable to the breeding programs of *Musaceae*, both conventional and biotechnological. On the other hand, they are the first set of results focused on the validation of the method that break the natural biological scheme of the natural cycle of the disease. In addition, they lay the foundations for future projects related with the identification of phytotoxic metabolites, and of the specificity of alleged avirulence genes of the pathogen, which will help determine the role played by the metabolites involved in the response of *Musa* spp. to wilt by *Fusarium*.

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

cual permitirá determinar el papel de los metabolitos involucrados en la respuesta de *Musa* spp. al marchitamiento por *Fusarium*.

## LITERATURA CITADA

- Brakhage AA. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11:21-32. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2916>
- Buddenhagen IW. 2009. Understanding strain diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and history of introduction of 'tropical race 4' to better manage banana production. *Acta Horticulturae* 828:193-204. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.828.19>
- Companioni B, Arzola M, Rodríguez Y, Mosqueda M, Pérez MC, Borrás O, Lorenzo JC and Santos R. 2003. Use of *in vitro* culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 filtrates for rapid and non-destructive differentiation of field-grown banana resistant from susceptible clones. *Euphytica* 130:341-347. <https://doi.org/10.1023/A:1023027604627>
- Companioni B, Mora N, Arzola M, Ventura J, Pérez MC, Santos R and Lorenzo JC. 2004. Improved technique for rapid and non-destructive *in vitro* differentiation between resistant and susceptible banana clones *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Biotechnology Letters* 26 (3):213-216. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000013717.72794.ba>
- Etzerodt T, Gislum R, Laursen BB, Heinrichson K, Gregersen PL, Jørgensen LN and Fomsgaard IS. 2016. Correlation of

- deoxynivalenol accumulation in *Fusarium*-infected winter and spring wheat cultivars with secondary metabolites at different growth stages. *Journal Agricultural Food Chemistry* 64 (22):4545–4555. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01162>
- FAO. 2017. Global programme on banana *Fusarium* wilt disease: Protecting banana production from the disease with focus on tropical race 4 (TR4). FAO, Rome, ITA. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i7921e.pdf>
- Li CY, Mostert G, Zuo CW, Beukes I, Yang QS, Sheng O, Kuang RB, Wei YR, Hu CH, Rose L, Karangwa P, Yang J, Deng GM, Liu SW, Gao J, Viljoen A and Yi GJ. 2013. Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in China. *Fungal Genomics and Biology* 3:2-6. <https://doi.org/10.4172/2165-8056.1000111>
- Mert Z and Karakaya A. 2003. Determination of the suitable inoculum concentration for *Rhynchosporium secalis* seedlings assays. *Journal Phytopathology* 151:699-701. <https://doi.org/10.1046/j.0931-1785.2003.00770.x>
- Pérez L, Batlle A, Fonseca J and Montenegro V. 2004. Reaction of FHIA hybrids and landraces cultivars to *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Abstracts of "The International Congress on Banana: harnessing research to improve the livelihoods". Malasia, July, 6-9, 152p. Disponible en línea: [http://file:///C:/Users/Asus/Downloads/IN050500\\_eng.pdf](http://file:///C:/Users/Asus/Downloads/IN050500_eng.pdf)
- Ploetz RC. 2015. *Fusarium* wilt of banana. *Phytopathology* 105:1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>
- Ramírez MA, Iglesias LG, Luna M and Castro AA. 2015. *In vitro* phytotoxicity of culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* in *Vanilla planifolia* Jacks. *Scientia Horticulturae* 197:573–578. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.019>
- Ribeiro LR, Amorim AP, Cordeiro ZJM, Silva S and Dita MA. 2011. Discrimination of banana genotypes for *Fusarium* wilt resistance in the greenhouse. *Acta Horticulturae* 897 (52):381-386. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.897.52>
- Saraswathi MS, Kannan G, Uma S, Thangavelu R and Backiyarani S. 2016. Improvement of banana cv. Rasthali (Silk, AAB) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (VCG 0124/5) through induced mutagenesis: Determination of LD50 specific to mutagen, explants, toxins and *in vitro* and *in vivo* screening for *Fusarium* wilt resistance. *Indian Journal of Experimental Biology* 54 (5): 345-353. Disponible en línea: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319054/>
- Sieber CMK, Lee W, Wong P, Münsterkötter M, Mewes HW, Schmeitzl C, Varga E, Berthiller F, Adam G and Güldenr U. 2014. The *Fusarium graminearum* genome reveals more secondary metabolite gene clusters and hints of horizontal gene transfer. *PLoS ONE* 9 (10): e110311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110311>
- Zhang X, Wu Q, Cui S, Ren J, Qian W, Yang Y, He S, Chu J, Sun X, Yan C, Yu X and An C. 2015. Hijacking of the jasmonate pathway by the mycotoxin fumonisin B1 (FB1) to initiate programmed cell death in *Arabidopsis* is modulated by RGLG3 and RGLG4. *Journal of Experimental Botany* 66 (9):2709–2721. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv068>

# Symbiotic bacteria associated to *Prosthechea citrina*, a Mexican endemic orchid

## Bacterias simbióticas asociadas a *Prosthechea citrina*, una orquídea endémica de México

Tomasita Santiago-Gerónimo, Departamento de Parasitología Agrícola<sup>1</sup>, Departamento de Fitotecnia<sup>2</sup>, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, CP. 56230; Héctor Lozoya-Saldaña<sup>2\*</sup>, María Lourdes Rodríguez-Mejía<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia: picti87@gmail.com.

Recibido: 02 de Abril, 2020.

Aceptado: 26 de Julio, 2020.

Santiago-Gerónimo T, Lozoya-Saldaña H and Rodríguez-Mejía ML. 2020. Symbiotic bacteria associated to *Prosthechea citrina*, a Mexican endemic orchid. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 398-407.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-2

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 03, 2020.

**Resumen.** En el proceso de cultivo *in vitro* de tejidos de plantas, se presentan microorganismos potencialmente fitopatógenos y/o aparentemente contaminantes, que eventualmente ocasionan pérdidas de material vegetal. La presente investigación tuvo como objetivo identificar a bacterias endófitas asociadas a *Prosthechea citrina*, una orquídea endémica de México, mediante el aislamiento, cultivo *in vitro* y secuenciación del gen 16S del ARN ribosomal de las cepas bacterianas. Se identificaron a *Aeromonas hydrophila* y *Enterobacter* sp. como simbioses, no patógenos, del bulbo y de base de hoja y a *A. hydrophila* en la parte media y el ápice foliar. Se evaluaron cuatro antibióticos para su

**Abstract.** Along the process of *in vitro* plant tissue culture, potential plant pathogenic and/or apparent contaminant microorganisms occur, which eventually cause loss of plant material. The objective of this research was to identify endophytic bacteria in *Prosthechea citrina*, an endemic Mexican orchid, by isolating, *in vitro* culturing, and sequencing the 16S gen from ribosomal RNA of the bacterial isolates. *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacter* sp. were identified as symbionts, non-pathogenic, from the bulb and the lower part of the leaf, and *A. hydrophila* in the middle and top of the leaf. Four antibiotics were evaluated for their *in vitro* control using the disc-plate method, quantifying the colony diameter growth. The highest statistically significant inhibition halos were obtained with Oxytetracycline for *A. hydrophila*, and with ampicillin for *Enterobacter* sp. The presence of endophytic bacteria is demonstrated, with tissue specificity location, as well as the corresponding inhibitory antibiotic.

**Key words:** Symbioses, endophytic bacteria, antibiotics.

control *in vitro* mediante el método de disco-placa, cuantificando el diámetro de crecimiento de la colonia. El mayor halo de inhibición, con significancia estadística, se obtuvo con oxitetraciclina para *A. hydrophila* y con ampicilina para *Enterobacter* sp. Se demuestra la presencia de bacterias endófitas, con especificidad de ubicación en el tejido, así como el antibiótico correspondiente que las inhibe.

**Palabras clave:** Simbiosis, bacterias endófitas, antibióticos.

La familia Orchidaceae constituye uno de los grupos de plantas más diversos. En su aprovechamiento sobresale el uso ornamental, aromatizante, medicinal, artesanal y comestible. En el proceso de cultivo *in vitro* se presentan microorganismos endófitos, contaminantes del medio de cultivo. Estos se encuentran comúnmente de forma natural en el interior de las plantas, induciendo efectos diversos, como estimulación en la germinación de las semillas y/o en el crecimiento de la planta (Tsavkelova, 2011; Wilkinson *et al.*, 1989) pero pueden ser devastadores cuando los tejidos vegetales se cultivan *in vitro*. La búsqueda de nuevas alternativas para la prevención y/o erradicación de los contaminantes resulta una labor importante (Cruz *et al.*, 2006).

Los explantes de tejido vegetal pueden llevar contaminantes en su superficie y/o en su interior. Aquellos que los llevan sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de erradicar, lo que impide cumplir con uno de los requisitos básicos para el éxito de la micropropagación de cualquier especie vegetal, que es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminantes (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2000). No obstante, los microorganismos pudieran jugar un papel importante como antagonistas de agentes

The Orchidaceae family is one of the most diverse plant groups. Some of its most outstanding uses are ornamental, aromatic, medicinal, for craftwork and edible. In the *in vitro* planting process, there are endophytic microorganisms, which contaminate the culture medium. They are commonly found naturally inside the plants, inducing diverse effects, such as the stimulation of seed germination and/or in plant growth (Tsavkelova, 2011; Wilkinson *et al.*, 1989), yet they can be devastating when the plant tissues are planted *in vitro*. The search for new alternatives to prevent and/or eradicate the contaminants is an important task (Cruz *et al.*, 2006).

The plant tissue explants may carry contaminants in their surface and/or insides. Those which are carried on the surface can be eliminated by disinfection, but those found inside the plant are difficult to eradicate, which makes it difficult to meet the basic requirements for the success of micropropagation of any plant species, which is to keep crops free of contaminant microorganisms (Ramírez-Villalobos *et al.*, 2000). However, the microorganisms may play an important role as antagonists of pathogenic agents in plants (Ocegeda-Reyes *et al.*, 2020), although the results of *in vitro* trials may not necessarily reflect what takes place *in vivo* (Whitaker and Bakker, 2019).

The presence of microorganisms during the *in vitro* planting of plant tissues takes place, mostly, when the donating plant grows directly on the field and is exposed to pests, diseases, dust and other agents (Ramírez-Villalobos and Salazar 1997). This phenomenon is also caused by the anatomical characteristics of each species, such as the presence of trichomes on leaves and stems, which stop disinfectants from penetrating. The elimination of these microorganisms may be due to the use of inadequate aseptic techniques in the laboratory (Alvarado, 1998).

fitopatógenos (Ocegeda-Reyes *et al.*, 2020), aunque no necesariamente los resultados de los ensayos *in vitro* reflejan lo que sucede *in vivo* (Whitaker and Bakker, 2019).

La presencia de microorganismos durante el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ocurre sobre todo cuando la planta donante crece directamente en el campo y está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes (Ramírez-Villalobos y Salazar 1997). También este fenómeno ocurre debido a las características anatómicas propias de la especie, tales como la presencia de tricomas en las hojas y tallos, que impiden la penetración de los desinfectantes. La eliminación de estos microorganismos puede deberse al empleo de técnicas inadecuadas de asepsia en el laboratorio (Alvarado, 1998).

Las bacterias endófitas son a menudo difíciles de detectar porque permanecen dentro del tejido del hospedante, y por no ser fitopatógenas pueden permanecer inadvertidas, con reducidas tasas de multiplicación y enraizamiento de las plantas, pudiendo inclusive morir. La presencia de microorganismos en el medio de cultivo se debe también a la deficiente desinfección o esterilización, que puede mejorarse con la manipulación apropiada de los equipos (Red y Tanprasert, 1995). Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivos identificar bacterias endófitas presentes en *Prosthechea citrina* y evaluar antibióticos para su eliminación.

Se colectaron plantas jóvenes de *Prosthechea citrina*, antes de floración, en dos localidades de un bosque de pino-encino con coordenadas 17° 20' 012" N, 96° 30' 654" O y 17° 19' 890" N, 96° 30' 774" O, para los sitios 1 y 2, respectivamente, a 2104 m, en Ixtlán de Juárez, sierra norte de Oaxaca. La desinfección se inició con un enjuague con agua destilada. A los bulbos se les retiraron las brácteas membranosas, y bajo condiciones asépticas, se

Endophytic bacteria are usually difficult to detect, since they remain inside the tissue of the host, and because they are not phytopathogenic, they may go unnoticed, with low rates of multiplication and rooting of plants, and may even lead to their deaths. The presence of microorganisms in the culture medium is also due to the inefficient disinfection or sterilization, which can be improved with the adequate handling of equipment (Red and Tanprasert, 1995). Based on the above, this investigation had the aims of identifying endophytic bacteria present in *Prosthechea citrina*, as well as to evaluate antibiotics for their elimination.

Young *Prosthechea citrina* plants were gathered before flowering in two locations of a pine-oak forest, with the coordinates 17° 20' 012" N, 96° 30' 654" W and 17° 19' 890" N, 96° 30' 774" W, for sites 1 and 2, respectively, at 2104 masl, in Ixtlán de Juárez, in the Norther Sierra of Oaxaca. The disinfection began by rinsing with distilled water. The membranous bracts were removed from the bulbs, which were then rinsed, under aseptic conditions, with 70% alcohol for one minute, followed by three rinses with sterile distilled water. They were finally submerged in a 1.5% sodium hypochlorite solution for 30 min and rinsed again, three times, with sterile distilled water.

After the disinfection, each plant was dissected into pseudobulb, base, midsection and leaf apices, in order to identify possible specific plant organs in which microorganisms could be located. To carry out the isolation, an inoculation loop was rubbed on the internal plat tissue, and planted, using cross-streaking, on plates with an LB medium (Luria Bertani: casein peptone 10 g L<sup>-1</sup>, yeast extract 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> and bacteriological agar 15 g L<sup>-1</sup>) (Bertani, 1951), and incubated at 37 °C for 48 h. After this period, the remaining bacterial cultures were purified.

realizó un enjuague con alcohol al 70% durante un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 30 min y se volvieron a enjuagar tres veces con agua destilada estéril.

Después de la desinfestación, se diseccionó a cada planta en pseudobulbo, base, parte media y ápice de las hojas, a fin de identificar posible especificidad de órgano de la planta en donde se pudieran encontrar los microorganismos. Para su aislamiento se frotó un asa bacteriológica en el tejido vegetal interno y se sembró, por estría cruzada, sobre placas con medio LB, Luria Bertani: (peptona de caseína 10 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup> y agar bacteriológico 15 g L<sup>-1</sup>) (Bertani, 1951) y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Después de este período se procedió a la purificación de las colonias bacterianas resultantes.

Para la identificación no molecular se realizaron pruebas bioquímicas con base en la guía de Schaad *et al.* (2001). Con la finalidad de separar a las bacterias Gram positivas y Gram negativas se realizó la prueba Ryu (Schaad *et al.*, 2001). En un portaobjetos se colocó una gota de hidróxido de potasio al 3% y se mezcló con una colonia bacteriana, si la mezcla formaba hilo correspondían a bacterias Gram negativas, y si la mezcla no formaba hilo eran Gram positivas. Respecto a la morfología celular, se colocó en un portaobjetos una gota de agua destilada estéril y se mezcló con una pequeña cantidad de bacterias, se fijó la bacteria flameando el portaobjetos y una vez evaporada el agua se le añadió una gota de cristal violeta al 0.1 N y se observó al microscopio óptico a diferentes ampliaciones. Para determinar movilidad, después de mezclar una muestra de bacterias en una gota de agua, se colocó cuidadosamente el cubreobjetos, para ser observados al microscopio óptico. Para determinar la producción de endosporas, en un tubo

For the non-molecular identification, biochemical tests were carried out following the guidelines by Schaad *et al.* (2001). In order to separate the Gram positive and negative bacteria, we performed the Ryu test (Schaad *et al.*, 2001). A drop of 3% potassium hydroxide was placed on a microscope slide and mixed with a bacterial culture. If the mixture formed a thread, there were Gram-negative bacteria, and if the mixture formed no threads, they were Gram-positive. Regarding cell morphology, a drop of sterile distilled water was placed on a microscope slide and mixed with small amounts of bacteria, the bacteria were fixed by burning the slide, and after the water evaporated, a drop of methyl violet at 0.1 N was added and observed under an optical microscope at different magnifications. To determine mobility, after mixing a bacteria sample in a drop of water, a slide was carefully placed on top and observed under an optical microscope. To determine the production of endospores, a bacterial culture was suspended in a test tube with sterile distilled water and placed in a water bath for 30 min. Next an aliquot of the suspension was taken and planted in a Petri dish with LB medium, in order to detect if the bacteria formed endospores. To determine if the bacteria had a strict or facultative aerobic metabolism, the Hugh and Leifson medium (1953) was used. The bacterium was inoculated by puncturing and incubated under conditions of aerobiosis (without sterile mineral oil) and anaerobiosis (with sterile mineral oil). For the oxidase test, the bacteria were exposed to the reagent N,n,n,n-tetramethyl-p-phenyldiamine (or TMFD) or N,N-Dimethyl-p-phenyldiamine (or DMFD), which change color indicating that the bacteria is aerobic, or transparent if it is anaerobic. A catalase test was also performed, mixing a bacterial suspension with hydrogen peroxide to observe whether the catalase would break it. If so, oxygen bubbles would form, indicating that the bacterium is aerobic.

de ensayo con agua destilada estéril se suspendió una colonia bacteriana y se puso en baño maría durante 30 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de la suspensión y fue sembrada en una caja de Petri con medio LB, con la finalidad de detectar si la bacteria formaba endosporas. Para determinar si las bacterias tenían un metabolismo aeróbico estricto o aeróbico facultativo se utilizó el medio de Hugh y Leifson (1953). La bacteria se inoculó por picadura con un asa de siembra, y se incubó en condiciones de aerobiosis (sin aceite mineral estéril) y de anaerobiosis (con aceite mineral estéril). Para la prueba de oxidasa, se expuso a las bacterias al reactivo N,n,n,n-tetrametil-p-fenilendiamina (o TMFD) o N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (o DMFD), cuya coloración cambia, lo que indica que la bacteria es aeróbica, o transparente si es anaeróbica. También se hizo la prueba de la catalasa, mezclando una suspensión de bacterias con peróxido de hidrógeno para ver si la catalasa lo rompía. De ser así, se forman burbujas de oxígeno, lo que indica que la bacteria es aeróbica.

La identificación molecular se inició con la secuenciación del ADN ribosomal 16 S, que se obtuvo siguiendo lo reportado por Chye *et al.* (2013). La extracción del ADN bacteriano se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del juego de extracción mini ADN easy plants, de Qiagen®, Hilden, Alemania, La cuantificación del ADN se realizó partiendo del supuesto que una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de ADN de doble cadena (Rickwood y Hames, 1990). La calidad del ADN fue inferida mediante el cálculo de la relación espectrofotométrica A260/A280 (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). El programa de PCR fue: predesnaturalización a 94 °C por 1 min, desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, y 30 s a 72 °C y el periodo de terminación 72 °C por 10 min (Matson *et al.*, 2015). Los

Molecular identification began with the sequencing of 16 S ribosomal DNA, which was obtained following Chye *et al.* (2013). The extraction of bacterial DNA was carried out by following the instructions by the manufacturer of the DNA easy Plant Mini Kit, Qiagen®, Hilden, Germany. The DNA quantification was carried out assuming that one absorbance unit at 260 nm is equal to 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  of double-chain DNA (Rickwood and Hames, 1990). The quality of the DNA was inferred by calculating the spectrophotometric ratio A260/A280 (Genesys 10 UV Scanning, Thermo scientific, Waltham, Massachusetts). The PCR program consisted of predenaturalization at 94 °C for 1 min, denaturalization at 94 °C for 30 s, aligning of forty 10 sec cycles at 95 °C, 30 s at 55 °C, and 30 s at 72 °C and the termination period at 72 °C for 10 min (Matson *et al.*, 2015). The PCR products were sequenced in the MacroGen® laboratory (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seoul 08511, South Korea). The sequences obtained from the region of gene 16S of the ribosomal RNA in this study were compared with sequences of reference organisms, using the BLAST database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, U.S.A.). The complementary of each sequence was obtained with the program CHROMAS. Later, using the program DNASTAR, the consensus sequence was obtained, and the sequences were finally run in the algorithm BLASTN of the NCBI, to determine the degree of homology they held in comparison with the sequences deposited in the database published in the GenBank.

In order to identify what can control the isolated bacteria strains, four antibiotics were evaluated using the disk-plate method: rifampicin (20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), oxytetracycline (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ampicillin (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and tetracyclin (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The diameters of the bacterial inhibition halos were measured after a growth period of 24 and 48 h. These data

productos de PCR se secuenciaron en el laboratorio MacroGen® (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seopul 08511 República de Corea del Sur). Las secuencias obtenidas de la región del gen 16S del ARN ribosomal en este estudio se compararon con secuencias de organismos de referencia, a través de la base de datos BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos). A las secuencias resultantes se les obtuvo la complementaria con el programa CHROMAS. Posteriormente, con el programa DNASTAR se obtuvo la secuencia consenso y finalmente las secuencias fueron corridas en el algoritmo BLASTN del NCBI, para determinar el grado de homología que guardaban con respecto a las secuencias depositadas en la base de datos publicada en el GenBank.

Con el fin de identificar algún antibiótico que pudiera controlar las cepas bacterianas aisladas, se evaluaron cuatro antibióticos: rifampicina ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), oxitetraciclina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), ampicilina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y tetraciclina ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), por el método de disco-placa. Se cuantificó el diámetro de los halos de inhibición bacteriana a las 24 y 48 h de crecimiento. Estos datos fueron tratados mediante un análisis de varianza de medias en un diseño completamente al azar de los cuatro tratamientos con igual número de repeticiones, considerándose como unidad experimental a un disco-placa (ANAVA, SAS). Los testigos, sin antibiótico, no se consideraron para el análisis estadístico porque fungieron únicamente como marcos de referencia de los crecimientos, al no presentar halos de inhibición en ninguno de los dos períodos de incubación.

Se obtuvieron aislamientos de diferentes partes de la planta con el fin de identificar posibles especificidades de tejido de colonización. Se encontraron siete tipos coloniales de bacterias, que se identificaron preliminarmente con letras (Cuadro 1), que fueron sometidas a las pruebas bioquímicas y a la secuenciación del gen ARNr 16S (Cuadro 2). Las

were treated using an analysis of variance, in a totally random design, of the four treatments with equal number of repetitions, considering one disk-plate as an experimental unit (ANAVA, SAS). The controls, without antibiotics, were not considered for the statistical analysis, since they served only as a reference of the growths, since they presented no inhibition halos in any of the incubation periods.

Isolations were obtained from different parts of the plant in order to identify possible tissue colonization specificities. Seven types of colonial bacteria were found, which were preliminarily identified using letters (Table 1) and underwent biochemical tests and sequencing for gene ARNr 16S (Table 2). The biochemical tests showed no differences between the isolations included in the tables; they were all Gram negative, bacilli with movement, with no production of endospores and positive for fermentation, oxidation and catalase tests (data not included), therefore they all seem to belong to one same species. However, the colonies of isolations A, B, C, D and E presented a yellowish-brown color, they were convex, bright and with a smooth surface and a foul smell, unlike the other two isolations (F and G), which helped identify the first as *Aeromonas hydrophila*. The colonies of isolations F and G displayed a beige color, they were convex, opaque in color and with an odorless, wavy edge, which was identified as belonging to the genus *Enterobacter* (Hugh and Leifson, 1953; Ramos *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 2001). This is backed with the comparison of the homology of sequences of rRNA 16S with the GenBank database, since it indicated that isolations A, B, C, D and E corresponded to the species of *Aeromonas hydrophila* and colonies F and G, to *Enterobacter* sp (Table 2). After molecular identification was confirmed, the colonization tissue specificity was observed, since both genera and most of the isolations were obtained from the bulb and the base



**Cuadro 1. Especies bacterianas obtenidas en distintas partes de cada planta.**  
**Table 1. Bacterial species obtained in different parts of each plant.**

|                        | Sitio 1 <sup>y</sup>        |            | Sitio 2 <sup>y</sup> |            |
|------------------------|-----------------------------|------------|----------------------|------------|
|                        | Planta 1                    | Planta 2   | Planta 1             | Planta 2   |
| Bulbo                  | A <sup>z</sup> , B, C, F, G | B, D, F, G | A, C, D, G           | B, C, F, G |
| Base de la hoja        | C, D, F, G                  | A, B, G    | A, C, E, G           | A, D, E, F |
| Parte media de la hoja | B, E,                       | A, E,      | A, B                 | A          |
| Ápice de la hoja       | A, E,                       | C, D       | B, C, D              | A, E       |

(<sup>y</sup>) Ver coordenadas en Materiales y Métodos. / See coordinates in Materials and Methods.

(<sup>z</sup>) n=5 cajas Petri conservadas por aislamiento. A a E, *Aeromonas hydrophila*; F y G, *Enterobacter* sp. / n=5 Petri dishes conserved per isolation. A to E, *Aeromonas hydrophila*; F and G, *Enterobacter* sp.

**Cuadro 2. Homologías de las secuencias de los aislamientos comparadas con la base de datos del GenBank.**

**Table 2. Homologies of the sequences of the isolates compared to the GenBank data base.**

| Aislamiento | Identidad Gen Bank                       | Número de acceso | Tamaño del fragmento pb (%) | % de identidad |
|-------------|------------------------------------------|------------------|-----------------------------|----------------|
| A           | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>ATCC 7966 | NR_074841.1      | 99                          | 100            |
| B           | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>ATCC 7966 | NR_074841.1      | 99                          | 99             |
| C           | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>ATCC 7966 | NR_074841.1      | 99                          | 100            |
| D           | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>ATCC 7966 | NR_074841.1      | 99                          | 99             |
| E           | <i>Aeromonas hydrophila</i><br>ATCC 7966 | NR_074841.1      | 99                          | 100            |
| F           | <i>Enterobacter</i> sp. B15              | KF010362.1       | 100                         | 99             |
| G           | <i>Enterobacter</i> sp. B15              | KF010362.1       | 100                         | 99             |

pruebas bioquímicas no arrojaron diferencias entre los aislamientos incluidos en los cuadros; todas fueron Gram negativas, bacilos con movimiento, sin producción de endosporas y positivos para las pruebas de fermentación, oxidación y catalasa (datos no incluidos) por lo que aparentemente todos corresponderían a una misma especie. No obstante, las colonias de los aislamientos A, B, C, D y E, presentaron una coloración café amarillenta, convexas, brillantes y superficie lisa, con un olor fétido, diferente a los otros dos aislamientos (F y G),

of the leaf, whereas *Enterobacter* was not isolated from the middle and apical parts of the plants (Table 1). The identification was adjusted with the shapes of the colonies. That is to say that the growths of cultures A, B, C, D and E are similar to each other, belonging to *A. hydrophila*, yet different to F and G, which are also similar to each other and belong to *Enterobacter*.

Regarding the action of the antibiotics, oxytetracycline induced the highest inhibition mean in *A. hydrophila*, statistically different to the other

lo que condujo a identificar a las primeras como *Aeromonas hydrophila*. Las colonias de los aislamientos F y G mostraron una coloración beige, convexa, opaca y borde ondulado sin olor, que se identificó como del género *Enterobacter* (Hugh y Leifson, 1953; Ramos *et al.*, 2007; Schaad *et al.*, 2001). Lo anterior se respalda con la comparación de la homología de secuencias de ARNr 16S con la base de datos del GenBank, pues indicó que los aislamientos A, B, C, D y E correspondieron a la especie de *Aeromonas hydrophila* y las colonias F y G a *Enterobacter* sp (Cuadro 2). Una vez confirmada la identificación molecular, se observó la especificidad de tejido de colonización, pues los dos géneros y la mayoría de los aislamientos se obtuvieron del bulbo y de la base de la hoja, mientras que *Enterobacter* no se aisló de las partes medias y apicales de las plantas (Cuadro 1). La identificación se ajusta con las formas de las colonias. Esto es, que los crecimientos de los cultivos A, B, C, D y E son similares entre sí, correspondiendo a *A. hydrophila*, pero diferentes a F y G, que también son similares entre ellos y que corresponden a *Enterobacter*.

Respecto a la acción de los antibióticos, la oxitetraciclina indujo la media más alta de inhibición en *A. hydrophila*, estadísticamente diferente a los demás tratamientos, seguido de tetraciclina, tanto a las 24 como a las 48 h de exposición. La rifampicina y la ampicilina ejercieron inhibición limitada al crecimiento de *A. hydrophila*. En general, resalta que para los cuatro antibióticos se observó una reducción en los halos de inhibición de las 24 a las 48 h. Esto es, las colonias continuaron su crecimiento a pesar de la presencia de los antibióticos. Para *Enterobacter* sp., las medias más altas de inhibición se obtuvieron con la ampicilina, significativamente diferente a los demás, seguido de la tetraciclina, oxitetraciclina y en último lugar a la rifampicina. De igual manera que con *A. hydrophila*, los halos de inhibición redujeron de diámetro de las 24 a las 48 h (Cuadro 3).

treatments, followed by tetracycline, at both 24 and 48 h of exposure. Rifampin and ampicillin exerted a limited inhibition on the growth of *A. hydrophila*. In general, it is worth highlighting that a reduction was observed in the halos for all four antibiotics between 24 and 48 h. That is, the cultures continued growing despite the presence of the antibiotics. For *Enterobacter* sp., the highest means for inhibition were obtained with ampicillin, significantly different to the others, followed by tetracycline, oxytetracycline, and finally, rifampin. As with *A. hydrophila*, the inhibition halos decreased in diameter between 24 and 48 h (Table 3).

Reports on *Aeromonas hydrophila* as endophytic plant bacteria (Aytac and Gorris, 1994; Chye *et al.*, 2013; Ginestrea *et al.*, 2005; Pérez-Cordero *et al.*, 2014) are limited. In this investigation *A. hydrophila* is reported for the first time as associated to wild orchid *Prosthechea citrina*, without being pathogenic, since it was isolated from firm tissue, without lesions or decomposition. This association has been explained as a relationship in which *A. hydrophila* is able to solubilize phosphates (Muleta *et al.*, 2013) and/or exert biological control against phytopathogens (Gohel *et al.*, 2006). The genus *Enterobacter* has already been reported as associated to orchids and, as in this study, with tissue specificity (Fernández *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2007). We conclude that two species of endophytic bacteria were found, with tissue specificity and which can be controlled with the use of antibiotics.

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

Son limitados los reportes de *Aeromonas hydrophila* como bacterias endófitas de las plantas (Aytac y Gorris, 1994; Chye *et al.*, 2013; Ginestrea *et al.*, 2005; Pérez-Cordero *et al.*, 2014). En la

**Cuadro 3. Comparación de medias del diámetro de los halos de inhibición (mm) del crecimiento de las bacterias expuestas a diferentes antibióticos y tiempos de exposición.**  
**Table 3. Comparison of means of the diameter of the inhibition halos (mm) of the growth of bacteria exposed to different antibiotics and exposure times.**

| Bacterias                   | Antibiótico     | 24 horas |                     | 48 horas |                     |
|-----------------------------|-----------------|----------|---------------------|----------|---------------------|
|                             |                 | Media    | <sup>a</sup> Grupos | Media    | <sup>a</sup> Grupos |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Rifampicina     | 3.9908   | b                   | 0.7958   | c                   |
|                             | Oxitetraciclina | 8.1958   | a                   | 3.6175   | a                   |
|                             | Ampicilina      | 2.0967   | c                   | 0.9092   | c                   |
|                             | Tetraciclina    | 4.0633   | b                   | 2.9058   | b                   |
| <i>Enterobacter</i> sp.     | Rifampicina     | 0.0      | d                   | 0.0      | c                   |
|                             | Oxitetraciclina | 1.2842   | c                   | 0.8600   | b c                 |
|                             | Ampicilina      | 4.4633   | a                   | 3.0142   | a                   |
|                             | Tetraciclina    | 3.2558   | b                   | 1.2725   | b                   |

<sup>a</sup>Cifras con la misma letra son estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ ). / Figures with the same letter are statistically equal ( $p \leq 0.05$ ).

presente investigación se reporta por primera vez a *A. hydrophila* asociada a la orquídea silvestre *Prosthechea citrina*, sin ser patógena, pues se aisló de tejido firme, sin lesiones ni descomposición. Esta asociación se ha explicado como una relación en donde *A. hydrophila* tiene la capacidad de solubilizar fosfatos (Muleta *et al.*, 2013) y/o ejercer control biológico contra fitopatógenos (Gohel *et al.*, 2006). El género *Enterobacter* ya ha sido reportado como asociado a las orquídeas y al igual que en este estudio, con especificidad de tejidos (Fernández *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2007). Se concluye que se encontraron dos especies de bacterias endófitas con especificidad de tejidos y que se pueden controlar con antibióticos.

## LITERATURA CITADA

- Alvarado Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce JN. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. pp 81-84.
- Aytac SA and Gorris LG. 1994. Survival of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under moderate vacuum. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10: 670-672. <https://doi.org/10.1007/bf00327956>
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 62(3): 293-300. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC386127/?page=1>
- Chye Y, Yin Y, Rohani R, Weber JF and Bhole S. 2013. Diversity of endophytic bacteria in Malaysian plants as revealed by 16S rRNA encoding gene sequence-based method of bacterial identification. Journal Young Pharmacology 5(3):95-97. <https://doi.org/10.1016/j.jyp.2013.07.001>
- Cruz M, Acosta M, Leiva M, Alvarado Y y Lazcano M. 2006. Evaluación del efecto carbendazim-β-ciclodextrina para el control de hongos filamentosos contaminantes del cultivo *in vitro* de plantas. Biotecnología vegetal 2(2):73-76. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/137/566>
- Fernández GRJ, Pedrinho EAN, Castellane TCL and Lemos EGM. 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. Revista Brasileira de Ciências do Solo 35(3): 729-737 <https://doi.org/10.1590/s0100-06832011000300008>
- 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: 96-99.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini D and Chhatpar, HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. African Journal of Biotechnology 5: 54-72.
- Hugh R and Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram- bacteria. Journal of Bacteriology 66:24-26. <https://doi.org/10.1128/jb.66.1.24-26.1953>

- Muleta D, Aseffa F, Borjesson E and Granhall U. 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forest of southwestern Ethiopia. Journal the Saudi Society of Agricultural Sciences 12(1): 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.jsas.2012.07.002>
- Ocegueda-Reyes MD, Casas-Solís J, Virgen-Calleros G, González-Eguiarte DR and López-Alcocer E. 2020. Isolation, identification and characterization of antagonistic rhizobacteria to *Sclerotium cepivorum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 146-159. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-2>
- Pérez-Cordero A, Tuberquia-Sierra A y Amell-Jiménez D. 2014. Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos. Agronomía Mesoamericana 25(2): 213-223. <https://doi.org/10.15517/am.v25i2.15425>
- Ramírez-Villalobos M, Santos A y Risea R. 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava*. Revista de la Facultad de Agronomía 17(3): 217-225. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26353>
- Ramírez-Villalobos M y Salazar E. 1997. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista de la Facultad de Agronomía. 14:497-506.
- Ramos ZE, Salgado TJ y Hernández AT. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). Lankesteriana 7(1-2): 322-325. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19556>
- Reed BM and Tanprasert P. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1(3): 137-142. [https://www.researchgate.net/publication/222714440\\_Detection\\_and\\_control\\_of\\_bacterial\\_contaminants\\_of\\_plant\\_tissue\\_cultures\\_A\\_review\\_of\\_recent\\_literature](https://www.researchgate.net/publication/222714440_Detection_and_control_of_bacterial_contaminants_of_plant_tissue_cultures_A_review_of_recent_literature)
- Schaad NW, Johnes JB and Chun W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. APS, St. Paul, Minn., USA. 373 pp.
- Tsavkelova E. 2011. Bacteria Associated with Orchid Roots. En: Maheshwari DK (Ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Pp 221-258. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-642-20332-9_11)
- Whitaker BK and Bakker MG. 2019. Bacterial endophyte antagonism toward a fungal pathogen *in vitro* does not predict protection in live plant tissue. FEMS Microbiology Ecology 95(2):1-11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy237>
- Wilkinson KG, Dixson KW and Sivasithamparam K. 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids. New Phytologist 112(3): 429-435 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00334.x>

# Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection

## Microscopía electrónica de barrido y análisis enzimático en *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*

Sheila Jazmín Reyes-Zambrano\*, Carlos Alberto Lecona-Guzmán, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Nancy Santana-Buzzy<sup>1</sup>, Ignacio Islas-Flores<sup>1</sup>, Miguel Tzec-Simá<sup>1</sup>, Felipe Alonso Barredo-Pool<sup>2</sup>, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas<sup>1</sup>, Unidad de Biotecnología<sup>2</sup>, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México; Nancy Ruiz-Lau, CONACYT-Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; Martín Eduardo Ávila-Miranda, Laboratorios de Fitopatología, DEPI del Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tlajomulco de Zuñiga, Jalisco, México. \*Autor para correspondencia: shey26reyeszam@gmail.com

Recibido: 17 de Mayo, 2020.

Aceptado: 26 de Julio, 2020.

Reyes-Zambrano SJ, Lecona-Guzmán CA, Gutiérrez-Miceli FA, Santana-Buzzy N, Islas-Flores I, Tzec-Simá M, Barredo-Pool FA, Ruiz-Lau N and Ávila-Miranda ME. 2020. Scanning electron microscopy and enzymatic analysis in *Agave americana* during *Fusarium oxysporum* infection. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 408-419.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-3

Primera publicación DOI: 05 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 05, 2020.

**Resumen.** La quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa desempeñan una función importante en la reacción de defensa contra patógenos fúngicos. En *Agave americana* existe poca información sobre el comportamiento de estas proteínas en respuesta a la infección de *Fusarium oxysporum*. En este estudio, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) en raíces de *A. americana* infectadas

**Abstract.** Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase play an important role in the defense reaction against fungal pathogens. In *Agave americana* there is limited information on the behavior of these proteins in response to the *Fusarium oxysporum* attack. In this study, a scanning electron microscopy (SEM) analysis was performed using roots of *A. americana* infected with *F. oxysporum*, and the activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase in roots of *A. americana* was evaluated to 0, 7, 15 and 30 days after inoculation with *F. oxysporum*. SEM revealed that 15 days after inoculation (DAI) is enough for the fungus to infect the roots of *A. americana*. It was observed that the activity of chitinase in infected plants increased significantly at 15 DAI with respect to non-infected plants, while the activity of  $\beta$ -1,3 glucanase did not show a significant statistical difference with control plants. These results suggest that, in response to *F. oxysporum* infection, the activation of the chitinase-type PRs proteins is induced in *A. americana*.

con *F. oxysporum* y se evaluó la actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa en raíces de *A. americana* a 0, 7, 15 y 30 días después de inoculación con *F. oxysporum*. MEB reveló que 15 días después de la inoculación (DDI) son suficientes para que el hongo infecte las raíces de *A. americana*. La actividad de quitinasa en plantas infectadas incrementó significativamente a los 15 DDI con respecto a las plantas no infectadas, mientras que la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa no presentó diferencia estadística significativa con plantas testigo. Los resultados sugieren que, en respuesta a la infección por *F. oxysporum*, *A. americana* activa proteínas PRs de tipo quitinasas.

**Palabras clave:** actividad enzimática,  $\beta$ -1,3-glucanasa, quitinasa, marchitez del agave.

Las plantas se encuentran constantemente defendiéndose de los fitopatógenos mediante una amplia gama de respuestas que les permite de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección (Prusky *et al.*, 2013). La familia de proteínas PRs son un grupo de proteínas vegetales que se considera juegan un papel importante en la resistencia a las enfermedades causadas por diversos patógenos en plantas, incluyendo, hongos, virus, bacterias y oomicetos (Mahendranathan *et al.*, 2016). Este grupo de proteínas tiene una amplia distribución en el reino vegetal; en las plantas sanas, las proteínas PRs se encuentran en cantidades mínimas, pero su expresión aumenta significativamente durante y/o después del ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004). Entre las proteínas PRs, la quitinasa (PR3) y la  $\beta$ -1,3-glucanasa (PR2), son dos grupos de enzimas hidrolíticas que abundan en diferentes especies de plantas, después de la infección por diferentes hongos fitopatógenos. Estas desempeñan un papel principal en la reacción de

**Key words:** enzyme activity,  $\beta$ -1,3-glucanase, chitinase, agave wilting.

Plants are continually defending themselves from phytopathogens by developing a wide range of responses that let them recognize, stop, and counteract infections in time (Prusky *et al.*, 2013). The family of PRs proteins consists of a group of vegetal proteins that are thought to play an important role in resistance to diseases caused by diverse pathogens in plants, including fungi, viruses, bacteria, and oomycetes (Mahendranathan *et al.*, 2016). This group of proteins is widely distributed in the plant kingdom; in healthy plants, PRs are found in minimum amounts, but their expression is significantly increased during and/or after a pathogen attack (Durrant and Dong, 2004). Among the PRs proteins, chitinase (PR3) and  $\beta$ -1,3-glucanase (PR2) are two groups of hydrolytic enzymes that increase their concentration in different plant species after phytopathogenic fungal infection. These enzymes play an important role in the defense reaction against pathogens by degrading the cell wall of the pathogen, because chitin and  $\beta$ -1,3-glucan are important structural components of pathogens cell wall. The  $\beta$ -1,3-glucanase seem to be coordinately expressed along with the chitinases after fungal infections in plants (Durrant and Dong, 2004).

One of the most serious phytosanitary problems that the *Agave* genus faces is the wilt and dry bud rot disease, which is mainly associated with the fungus *F. oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2020). This pathogen attacks *Agave* plants regardless of their development stage. The infection starts as whitening of the basal leaves, followed by wilt, necrosis, and rot inside the bud, which eventually causes the plant to die (Flores *et al.*, 2009; López-Bautista *et al.*, 2020). However, the

defensa contra dichos patógenos, pues actúan degradando la pared celular del patógeno, debido a que la quitina y el  $\beta$ -1,3-glucano son componentes estructurales importantes de las paredes celulares de dichos organismos. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas parecen expresarse coordinadamente junto con las quitinasas después de la infección por hongos en plantas (Durrant y Dong, 2004).

En el género *Agave*, la enfermedad de marchitez y pudrición seca del cogollo es uno de los problemas fitosanitarios más graves que enfrenta, esta enfermedad ésta asociado principalmente con el hongo *F. oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2020). Este patógeno ataca a las plantas de *Agave* sin importar su etapa de desarrollo; inicia con un aclaramiento en las hojas basales, seguido de marchitez, necrosis y pudrición en el interior del cogollo, generando finalmente la muerte de la planta (Flores *et al.*, 2009; López-Bautista *et al.*, 2020). Sin embargo, en *Agave* spp. se desconoce la actividad enzimática de defensa que se promueven durante la infección por *F. oxysporum*, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad de proteínas relacionadas a la patogénesis, tales como  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa en plantas de *A. americana* infectadas con *F. oxysporum*, así como observar el crecimiento intracelular del patógeno en la raíz por microscopía electrónica de barrido.

La cepa de *F. oxysporum* que se utilizó en este estudio, se obtuvo de tejido de la base del tallo de una planta de *A. americana* de aproximadamente tres años de haber sido trasplantada, que presentaba síntomas de marchitez, aunado a clorosis y enrollamiento foliar. Esta planta se localizó en una plantación comercial en el municipio de Comitán, Chiapas, México (16° 17' 30" N, 92° 10' 1" O). Para su aislamiento, se cortaron segmentos de tallo de aproximadamente 0.25 cm por lado, de la zona de la corona, que se desinfectaron sumergiéndolos durante 2 min en una mezcla de hipoclorito de

enzymatic defense activity that is promoted during the infection caused by *F. oxysporum* in *Agave* spp. is unknown, the objective of this study was to evaluate the activity of the proteins associated with the pathogenicity, such as  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase on *A. americana* plants infected with *F. oxysporum*, as well as to observe the pathogen intracellular growth in agave roots using the scanning electron microscopy technique.

The *F. oxysporum* isolate that was used in this study was obtained from tissue of the stem base of an *A. americana* plant approximately three years after being transplanted; the plant had wilt symptoms, as well as chlorosis, and leaf rolling. The plant was found in a commercial agave plantation in the Comitán municipality, Chiapas, Mexico (16° 17' 30" N, 92° 10' 1" W). For isolation, cuts approximately 0.25 cm in size per side of stem segments from the crown area were made and then disinfected by submerging them for 2 min in a mixture of sodium hypochlorite (6%), ethyl alcohol (100%) and sterile distilled water at 1:1:8 ratio. The fragments were rinsed twice with sterile distilled water, and then sown in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium supplemented with 0.12 g L<sup>-1</sup> of streptomycin and 0.25 g L<sup>-1</sup> of chloramphenicol. Once morphologically identified, according to the characteristics reported for *F. oxysporum* (Leslie and Summerel, 2006), a monosporic culture of the fungus was obtained, sown again in PDA culture medium, and covered with a sterilized sweet cellophane film so mycelium can grow and be easily removed. The mycelium was used to obtain DNA and amplify the ITS1-5.8S-ITS4 fragment using end-point PCR and the primers ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' and ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990). The strain was reactivated in PDA by incubation at 28±2 °C for 15 days, and after that period, a mycelial square 1 cm<sup>2</sup> in size was

sodio (6%), alcohol etílico (100%) y agua destilada estéril en proporción 1:1:8. Posteriormente, estos fragmentos se enjuagaron en dos ocasiones con agua destilada estéril. Los fragmentos se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) suplementado con 0.12 g L<sup>-1</sup> de estreptomina y 0.25 g L<sup>-1</sup> de cloranfenicol. Una vez identificado morfológicamente de acuerdo a las características reportadas a *F. oxysporum* (Leslie y Summerell, 2006), se obtuvo un cultivo monospórico, se sembró nuevamente en medio PDA, con una película de celofán dulce esterilizado cubriendo el medio, con el fin de generar micelio y separarlo fácilmente. El micelio se utilizó para obtener ADN y amplificar el fragmento ITS1-5.8S-ITS4 por PCR punto final utilizando los iniciadores ITS1 5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.*, 1990). La cepa se reactivó en PDA incubándolo a 28 ± 2 °C durante 15 días, transcurrido este tiempo, se inoculó un cuadro micelial de 1 cm<sup>2</sup> en 250 mL de caldo papa dextrosa (24 g L<sup>-1</sup>). El matraz se mantuvo en agitación constante a 120 rpm durante 10 días para obtener la suspensión de esporas. La concentración de conidios se determinó con una cámara de Neubauer.

Por otro lado, la inoculación se realizó en plantas de *A. americana* obtenidas *in vitro* de seis meses de edad, las cuales fueron aclimatadas previamente por tres meses en condiciones de invernadero. Las plantas se trasplantaron a macetas de plástico de 10 cm, usando una mezcla de peat moss y agrolita (1:1) previamente esterilizado a una temperatura de 121 °C y 15 lb de presión por una hora y se mantuvieron por 60 días en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 °C. El inóculo consistió de una suspensión de conidios de *F. oxysporum* (2 x 10<sup>8</sup> conidios mL<sup>-1</sup>), el cual fue aplicado en las raíces de las plantas trasplantadas, donde previamente se les realizó una herida de aproximadamente 0.5 cm.

inoculated in 250 mL of dextrose-potato broth (24 g L<sup>-1</sup>). The flask was kept in constant agitation at 120 rpm for 10 days to obtain a spore suspension. The concentration of conidia was determined using a Neubauer chamber.

On the other hand, inoculation was made in six-month old *A. americana* plants obtained *in vitro* that were previously acclimated under greenhouse conditions for three months. The plants were transplanted to 10 cm plastic pots filled with a mixture of peat moss and agrolite (1:1), previously sterilized at 121 °C temperature and 15 lb. pressure for one hour, and then kept for 60 days in a growth chamber at 25 °C temperature. The inoculum consisted of a *F. oxysporum* conidia suspension (2 x 10<sup>8</sup> conidia mL<sup>-1</sup>) that was applied to the root of the transplanted plants, where a wound of approximately 0.5 cm in size was previously made. Once this procedure was concluded, the plants were incubated in a growth chamber at 28 °C controlled temperature and 60-90% relative humidity. Sixty plants were inoculated (three replications with 20 plants in each replicate) and 20 plants without inoculation (control).

To observe the *F. oxysporum* infection process in *A. americana* plants, root samples of five infected plants were collected at 7, 15 and 30 days after inoculation (DAI), and roots of five non-inoculated plants were also taken. The samples were processed according to the protocol described by Ruíz-May *et al.* (2011) with slight modifications. The samples were fixed with glutaraldehyde (2.5% v/v) in a phosphate buffer (0.2 M; pH 7.2) for 72 h. Then, the samples were rinsed with a phosphate buffer (0.2 M; pH 7.2), gradually dehydrated with ethanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% and 100%) and dried with liquid CO<sub>2</sub> (Balzers CPD 020 Critical Point Dryer; Bal-Tec, Schalksmuhle, Germany). Samples approximately 0.5 mm in size were mounted on metal pieces with carbon conductive adhesive



Posterior a esto, las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento con una temperatura controlada a 28 °C y humedad relativa de 60-90%. Se inocularon 60 plantas (tres repeticiones de 20 plantas) y 20 plantas sin inocular (control).

Para observar el proceso de infección de *F. oxysporum* en plantas de *A. americana*, se recolectaron muestras de raíces de cinco plantas infectadas, a los 7, 15 y 30 días después de la inoculación (DDI); así mismo, se tomaron raíces de cinco plantas sin inocular. Las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo descrito por Ruíz-May *et al.* (2011) con ligeras modificaciones. Las muestras se fijaron durante 72 h con glutaraldehído (2.5% v/v) en un tampón fosfato (0.2 M; pH 7.2). La fijación fue seguida por un enjuague con tampón fosfato (0.2 M; pH 7.2), enseguida se deshidrataron gradualmente con etanol (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%) y se secaron con CO<sub>2</sub> líquido (Balzers CPD 020 Critical Point Dryer; Bal-Tec, Schalksmuhle, Alemania). Posteriormente, las muestras de aproximadamente 0.5 mm se montaron en trozos metálicos con cinta adhesiva conductora de carbono, recubiertas por pulverización catódica con oro coloidal y se observaron a 10-20 kV utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM 940A (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Muestras de raíces de cinco plantas infectadas por *F. oxysporum* y de cinco plantas control se recolectaron a los 0, 7, 15 y 30 DDI, este procedimiento se repitió tres veces. El extracto enzimático se obtuvo siguiendo la metodología de Pan *et al.* (1991), con ligeras modificaciones. Brevemente, se homogenizaron 0.3 g de raíces liofilizadas de *A. americana* con nitrógeno líquido, con 1.5 mL de amortiguador de extracción (acetato de sodio 0.05 M, pH 5.0, adicionado con 250 mM sacarosa, 50 mM de NaCl 1mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1 mM (PMS), se agregó 0.15 g de polivinil polipirrolidona (PVPP), el homogenado se centrifugó a 13,000 rpm

tape coated by sputtering with colloidal gold and observed at 10-20 kV using a Zeiss DSM 940A scanning electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Root samples of five plants infected by *F. oxysporum* and five control plants were collected at 0, 7, 15 and 30 DAI; this procedure was done three times. The enzyme extract was obtained using the methodology described by Pan *et al.* (1991) with slight modifications. Briefly, 0.3 g of *A. americana* lyophilized roots were homogenized using liquid nitrogen, with 1.5 mL of extraction buffer (sodium acetate 0.05 M, pH 5.0, to which 250 mM of saccharose, 50 mM of NaCl, 1mM of  $\beta$ -mercaptoethanol and 1 mM (PMS) were added) to which 0.15 g of polyvinyl polypyrrolidone (PVPP) were added. The homogenate was centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at room temperature, and finally, the supernatant was stored at -20 °C to be used in the enzyme essays. The protein contents of the enzyme extracts were determined by the method of Bradford (1976).

The chitinase or  $\beta$ -1,3 glucanase activity was determined using enzymatic extracts of the roots collected at 0, 7, 15 and 30 DAI with *F. oxysporum*, as well as from the control plants. The chitinase essay was done according to the methodology of Ferrari *et al.* (2014) with slight modifications. For the reaction mixture with the enzyme extracts, 50  $\mu$ L of 0.05% glycol-chitin as substrate and 448  $\mu$ L of 0.5 mM acetate buffer (pH 5.0) were used; tubes were incubated in a water bath at 40 °C for 30 min, and, once this procedure concluded, the tubes were cooled and a potassium ferrocyanide solution (C<sub>6</sub>FeK<sub>4</sub>N<sub>6</sub>) was added. The tubes were kept at 95 °C for 15 min; after this time, the tubes were cooled, then the absorbance was determined at 420 nm. The pattern curve was obtained with N-acetylglucosamine. The chitinase activity was expressed as units of  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein.

por 30 min a temperatura ambiente, finalmente el sobrenadante se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso en los ensayos enzimáticos. El contenido proteico de los extractos enzimáticos se determinó por el método de Bradford (1976).

La actividad de quitinasa o de  $\beta$ -1,3 glucanasa se determinó en los extractos enzimáticos de las raíces colectadas a los 0, 7, 15 y 30 DDI con *F. oxysporum*, así como de plantas control. El ensayo de quitinasa se realizó de acuerdo a la metodología de Ferrari *et al.* (2014) con ligeras modificaciones. Para la mezcla de reacción con extracto enzimático se utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de glicol-quitina al 0.05% como sustrato y 448  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetato 0.5 mM (pH 5.0), con una incubación a baño maría de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 min, transcurrido el tiempo se enfriaron los tubos y se les agregó una solución de ferrocianuro de potasio ( $\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$ ). Los tubos se colocaron a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, transcurrido el tiempo, los tubos se dejaron enfriar y se determinó su absorbancia a 420 nm. La curva patrón se realizó con N-acetilglucosamina. La actividad de quitinasa se expresó en unidades de  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  de proteína.

La actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa se determinó por el método de Honorato *et al.* (2015). La reacción se inició mediante la adición de alícuotas de 7  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático en una mezcla de 986  $\mu\text{L}$  de amortiguador de acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) y 7  $\mu\text{L}$  del sustrato laminarina (0.15%). La mezcla de reacción se incubó en baño de agua durante 10 min a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después del período de incubación, la cantidad de azúcares reductores se determinó agregando 333  $\mu\text{L}$  de ácido dinitrosalicílico (DNS) a la mezcla y luego se incubó la mezcla resultante en baño maría durante 10 min a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La reacción se detuvo enfriando las muestras en hielo durante 5 min. Las absorbancias de las muestras se midieron a una longitud de onda de 540 nm. La actividad de glucanasa se expresó en unidades de  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  de proteína.

The  $\beta$ -1,3 glucanase activity was determined by the method of Honorato *et al.* (2015). The reaction started by adding 7  $\mu\text{L}$  aliquots of the enzyme extract in a mixture of 986  $\mu\text{L}$  of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and 7  $\mu\text{L}$  of laminarin substrate (0.15%). The reaction mixture was incubated in a water bath at  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. After the incubation period, the amount of the reducing sugars was determined by adding 333  $\mu\text{L}$  of dinitrosalicylic acid (DNS) to the mixture and the resulting mixture was incubated in a water bath at  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The reaction was interrupted by cooling the samples on ice for 5 min. The absorbances of the samples were measured at 540 nm wavelength. The glucanase activity was expressed in units of  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  of protein.

The data obtained was analyzed using an analysis of variance (ANOVA) in order to determine if there were significant differences between the treatments evaluated, followed by a comparison of means using Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The statistical analysis of the data was conducted using the STATGRAPHICS® Centurion XVI.II software (Statgraphic, 2010).

The isolate was molecularly confirmed as *Fusarium oxysporum*, according to the database of the GenBank, and named ITTG\_Foxy\_C6, which is part of the strain pool of the Technological Institute of Tuxtla Gutiérrez, with accession number in the GenBank (MT791313).

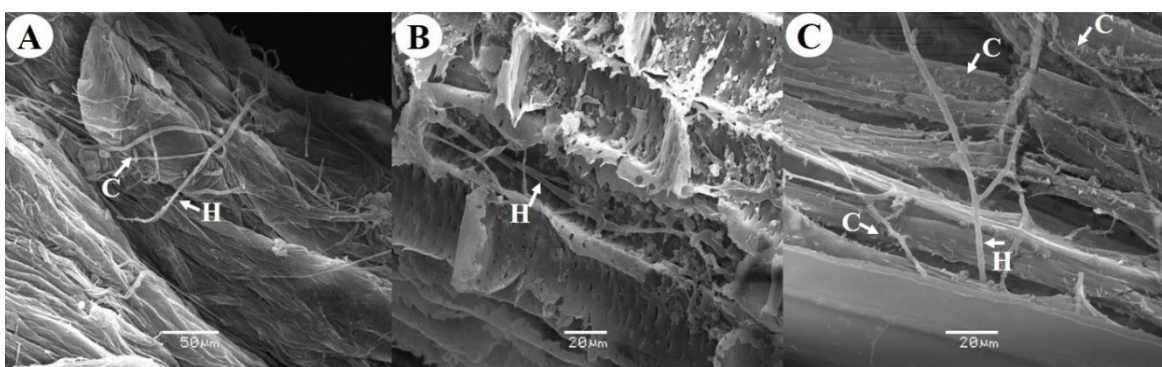
The colonization of roots by *F. oxysporum* was observed using scanning electron microscopy in the different sampling days (Figure 1). Although the longitudinal cuts made to the roots at 7 DAI did not indicate the presence of the fungus, mycelium and spores were observed on the root surface, which suggested that the fungus had not yet entered the root. Czymbek *et al.* (2007) and Padilla-Ramos *et al.* (2018) mentioned that, during the attachment of spores to the root surface, the fungus forms a dense network of hyphae (mycelium) and releases secretions and/or effectors that allow penetration.

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, seguido por una comparación de medias usando la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software STATGRAPHICS® Centurion XVI.II (Statgraphic, 2010).

El aislamiento se corroboró molecularmente como *Fusarium oxysporum* de acuerdo a la base de datos de GenBank y se denominó ITTG\_Foxy\_C6, el cual forma parte del cepario del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con número de accesión en GenBank (MT791313).

La colonización de las raíces por *F. oxysporum* se observó mediante microscopía electrónica de barrido en los diferentes días de muestreo (Figura 1). A los 7 DDI se realizaron cortes longitudinales de las raíces y no se observó la presencia del hongo, sin embargo, en la superficie de la raíz se observó micelio y esporas, lo cual sugiere que el hongo aún no había entrado en la raíz. Czymmek *et al.* (2007) y Padilla-Ramos *et al.* (2018) mencionan que, durante la adhesión de las esporas a la superficie de la

In addition, electronic microscopy has shown the absence of appressoria or specialized penetration hyphae of *F. oxysporum*, as well as the formation of hyphae that penetrate the wall of epidermal cells and the formation of a septum at the entry point (Perez-Nadales and Di Pietro, 2011). *F. oxysporum* hyphae were observed, in longitudinal cuts of roots at 15 DAI, which means that the fungus was able to overcome the defenses of the plant, invading and growing within the root across the inter- and intracellular spaces, and reaching the xylem vases using the holes generated by the fungus. At 30 DAI, the fungus completely colonized the inside of the root, this is, as the mycelium grows, it expands and produces microconidia, which are carried upward within the xylem vessels by way of a stream of raw sap (mineral salts and water) (Figure 1). When the fungus invades and proliferates within the plant roots, the conductive vessels are obstructed causing a water imbalance and the leaves start to develop yellowing symptoms, followed by wilt (Wang *et al.*, 2015). Under optimal conditions, *F. oxysporum* requires 30 days to complete its infection process in *A. americana* roots.



**Figura 1.** Fotografías de microscopía electrónica de barrido de raíces de *Agave americana* infectadas con *Fusarium oxysporum* A) Superficie de raíz a los 7 DDI, B) Corte longitudinal de raíz a los 15 DDI, C) Corte longitudinal de raíz a los 30 DDI. C: Conidios, H: Hifas.

**Figure 1.** Scanning electron microscopy photographs of *Agave americana* roots infected with *Fusarium oxysporum* A) Root surface at 7 DAI, B) Longitudinal cut of root at 15 DAI, C) Longitudinal cut of root at 30 DAI. C: Conidia, H: Hyphae.

raíz, se forma una densa red de hifas (micelio) así como secreciones y/o efectores por parte del hongo que permiten iniciar la penetración. Además, mediante microscopía electrónica se ha demostrado la ausencia de apresorios o hifas especializadas de penetración en *F. oxysporum*, así como la formación de hifas que penetran la pared de las células epidérmicas y la formación de un septo en el punto de penetración (Perez-Nadales y Di Pietro, 2011). En cortes longitudinales de raíces de 15 DDI, se observaron hifas de *F. oxysporum*, esto significa que el hongo logró superar las defensas de la planta, invadiendo y creciendo dentro de la raíz por los espacios inter e intracelulares alcanzando los vasos del xilema a través de orificios generados por el hongo. A los 30 DDI, el hongo colonizó completamente el interior de la raíz, a medida que el micelio crece, se ramifica y produce microconidios, los cuales suben por los vasos del xilema gracias a la corriente de savia bruta (sales minerales y agua) (Figura 1). La invasión y proliferación del hongo dentro de las raíces provoca una obstrucción de los vasos conductores, lo cual origina un desequilibrio hídrico, en consecuencia, las hojas empiezan con síntomas de amarillamiento y posteriormente marchitez (Wang *et al.*, 2015). En condiciones óptimas *F. oxysporum* requiere de 30 días para llevar a cabo su proceso de infección en raíces de *A. americana*.

Previo a esta investigación, en *A. americana* no se tenían reportes de la confirmación de la marchitez ocasionada por *F. oxysporum* mediante microscopía electrónica de barrido en especies de *Agave*. Sin embargo, sí hay trabajos similares en diferentes cultivos como en chile criollo tipo serrano CM334 (*Capsicum annum*) donde se determinó el avance de la necrosis a los 3, 23 y 30 después de la infección causada por el hongo, reportándose su avance hasta el tallo de la planta; registrando la presencia de micelio, microconidios y macroconidios en todos los segmentos evaluados (Sanzón *et al.*, 2012). En

Before this study there were no reports about the use of scanning electron microscopy to confirm that *A. americana* wilt in *Agave* species is caused by *F. oxysporum*. However, similar studies have been conducted for different crops such as serrano type CM334 criollo chili (*Capsicum annum*), where the advance of necrosis was determined at 3, 23 and 30 days after infection caused by the fungus, which advanced up to the plant stem. The symptoms reported were the presence of mycelium, microconidia, and macroconidia in all the evaluated segments (Sanzón *et al.*, 2012). In chickpea crops (*Cicer arietinum*), *F. oxysporum* colonized the inside of the root in only three days (Joshi *et al.*, 2012). Although the symptomatology observed on *A. americana* plants is attributed to *F. oxysporum*, more thorough analyses must be conducted since López-Bautista *et al.* (2020), recently demonstrated that wilt and/or dry rot symptoms in *Agave tequilana* are associated with five *Fusarium* species, which through a phylogenetic study were classified in three complexes: *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) and *F. fujikuroi* (FFSC), being *F. oxysporum* (FOSC) the predominant complex with 56% of representation at the regional level. Therefore, the agave wilt and dry bud rot symptoms are considered as a syndrome caused by different *Fusarium* species with differential parasitic suitability at the intra- and interspecies level (López-Bautista *et al.*, 2020).

The specific activity of the chitinase during the period analyzed showed a significant increase ( $63.43 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$ ) at 15 DAI compared to those of the non-infected plants ( $27.24 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g protein}$ ). The increase of the activity could be explained by the fact that some PRs proteins are expressed at basal levels, but their expression increases in response to a pathogen attack and the subsequent activation of the systematic acquired resistance (SAR) (Durrant and Dong, 2004).

el caso del cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum*) se observó que *F. oxysporum* colonizó el interior de la raíz en solo tres días (Joshi *et al.*, 2012). Aunque la sintomatología observada en plantas de *A. americana* es atribuida a *F. oxysporum* es conveniente realizar análisis más exhaustivos, ya que recientemente López-Bautista *et al.* (2020), demostraron la asociación de cinco de especies de *Fusarium*, asociados con síntomas de marchitez y/o pudrición seca en *Agave tequilana*, las cuales mediante un estudio filogenético se clasificaron en tres complejos: *F. oxysporum* (FOSC), *F. solani* (FSSC) y *F. fujikuroi* (FFSC), con predominación de *F. oxysporum* (FOSC) con 56% de representatividad regional. Por lo anterior, síntomas de marchitez y pudrición seca del cogollo del agave se consideran un síndrome causados por diferentes especies de *Fusarium* con adaptabilidad parasítica diferencial a nivel intra e interespecie (López-Bautista *et al.*, 2020).

La actividad específica de quitinasa durante el tiempo analizado mostró un aumento significativo (63.43  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}$  proteína) a los 15 DDI con respecto a las plantas no infectadas (27.24  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}$  proteína), dicho incremento en la actividad puede deberse a que algunas proteínas PRs se expresan en niveles basales de forma constitutiva, pero su expresión aumenta en respuesta a un ataque de patógeno y a la posterior activación de la respuesta sistemática adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004). Además, la inducción de proteínas PRs es una forma de limitar la entrada o propagación del patógeno al interior de la planta (Gupta *et al.*, 2013). En presencia de hongos fitopatógenos, las plantas producen enzimas como la  $\beta$ -1,3-glucanasa y la quitinasa (Santos *et al.*, 2004) para desintegrar los componentes de la pared celular de hongos hasta sus unidades estructurales básicas, glucanos y quitina. Se observó diferencia estadística significativa en la actividad de quitinasa a los 30 DDI

Furthermore, the induction of PRs proteins is a way to control the pathogen from entering and spreading within the plant (Gupta *et al.*, 2013). In the presence of phytopathogenic fungi, plants produce enzymes such as  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase (Santos *et al.*, 2004) to disintegrate the components of the fungi cell wall up to their basic structural units, glucans, and chitin. A significant statistical difference was observed on the chitinase activity at 30 DAI in the infected and non-infected plants (Figure 2) with lower activity on the infected plants (21.1  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}$  protein). On the other hand, the activity of  $\beta$ -1,3 glucanase was lower on the infected plants (30.484  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}$  protein) than on the non-infected plants (32.167  $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}$  protein). However, at 15 DAI, there was a slight increase of activity on the infected plants (Figure 3).

The increase in chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activity induced by different fungi has been reported in different plant species such as tomato (*Solanum lycopersicum*), melon (*Cucumis melo*) and lemon (*Citrus x limon*) (Ramammoorthy *et al.*, 2002; Baldé *et al.*, 2006; Fanta *et al.*, 2003). Our results suggest that the activity of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase on *A. americana* plants acts as a defense mechanism against infection by *F. oxysporum* at 15 DAI. However, increasing the activity of the PRs proteins activity is probably not enough to keep the fungus from colonizing the roots, as shown in Figure 1.

The scanning electron microscopy analysis confirmed the infection caused by *F. oxysporum* in *A. americana* roots at 15 DAI. A molecular analysis confirmed the identity of the fungus. These results suggest that in *A. americana* plants, the induction of the defense mechanism is mediated by the activation of chitinase, which is involved in the plant defense during *F. oxysporum* infection. However, the increment of this enzyme activity

en plantas infectadas y no infectadas (Figura 2) con menor actividad en las plantas infectadas ( $21.1 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$ ). Por otro lado, la actividad de la  $\beta$ -1,3 glucanasa fue menor en plantas infectadas ( $30.484 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$ ) en comparación con las no infectadas ( $32.167 \mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g proteína}$ ). Sin embargo, a los 15 DDI se observó un ligero incremento de su actividad en plantas infectadas (Figura 3).

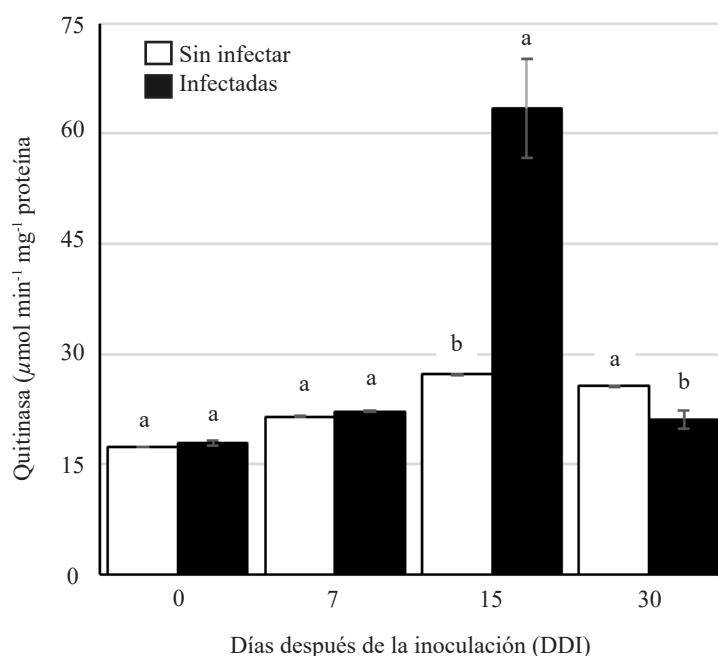
El aumento de la actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa por diferentes hongos se ha reportado en diversas especies de plantas tales como, jitomate (*Solanum lycopersicum*), melón (*Cucumis melo*) y limón (*Citrus x limon*) (Ramamoorthy *et al.*, 2002; Baldé *et al.*, 2006; Fanta *et al.*, 2003). Nuestros resultados sugieren que, en plantas de *A. americana*, la actividad de quitinasa y  $\beta$ -1,3 glucanasa actúan como mecanismo de defensa ante la infección

is not enough to avoid the fungus colonization in roots of these species. This study provides the first insights into the enzyme activity of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase as possible defense mechanisms in *Agave americana*.

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

por *F. oxysporum* a los 15 DDI. Sin embargo, este incremento en las actividades de las proteínas PRs probablemente no es suficiente para impedir la colonización del hongo en las raíces como se muestra en la Figura 1.

El análisis de microscopía electrónica de barrido confirmó la infección de *F. oxysporum* en raíces de *A. americana* a los 15 días después de su inoculación. La identidad el hongo fue confirmado



**Figura 2.** Actividad de quitinasa (PR3) en raíces de *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

**Figure 2.** Chitinase activity (PR3) on *Agave americana* roots during *Fusarium oxysporum* infection. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

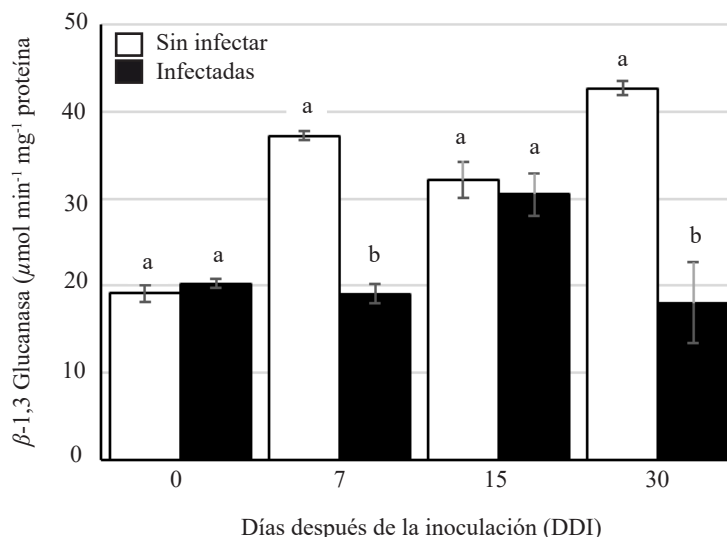


Figura 3. Actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasa (PR2) en raíces de *Agave americana* durante la infección con *Fusarium oxysporum*. Letras diferentes representan diferencia estadística significativa (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

Figure 3.  $\beta$ -1,3 glucanase activity (PR2) on *Agave americana* roots during *Fusarium oxysporum* infection. Different letters indicate statistically significant differences (ANOVA)  $p \leq 0.05$ .

molecularmente. Estos resultados sugieren que en plantas de *A. americana* se induce el mecanismo de defensa mediado por la activación de quitinasa, la cual está implicada en la defensa durante la infección de *F. oxysporum*; sin embargo, el incremento de esta enzima no es suficiente para impedir la colonización de raíces en esta especie. Estos resultados son los primeros aportes sobre la actividad enzimática de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa como posibles mecanismos de defensa en el *Agave americana*.

## LITERATURA CITADA

- Baldé JA, Francisco R, Queiroz A, Regalado AP, Ricardo CP and Veloso MM. 2006. Immunolocalization of a class III chitinase in two muskmelon cultivars reacting differently to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Journal of Plant Physiology 163(1): 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.02.004>
- Bradford MN. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park SY and Kang S. 2007. *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the Arabidopsis root vascular system by *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology 44: 1011-1023. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.01.012>
- Durrant WE and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 42:(1) 185-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Fanta N, Ortega X and Pérez LM. 2003. The development of *Alternaria alternata* is prevented by chitinases and b-1,3-glucanases from *Citrus limon* seedlings. Biological Research 36: 411-420. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602003000300012>
- Ferrari AR, Gaber Y and Fraaije MW. 2014. A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulase activity detection. Biotechnology for Biofuels 7(1): 37. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-37>
- Flores LHE, Ireta JM, Pérez DJF, Ruíz CJA, Álvarez MC and Byerly KFM. 2009. Identificación de zonas de riesgo fitopatológico y opciones de prevención y/o control en el *Agave tequilana* weber variedad azul en Jalisco. Informe de investigación. INIFAP. CIRPAC. CECEAJAL. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. 34 p.
- Gupta P, Ravi I and Sharma V. 2013. Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. Journal of Plant Interactions 8(2): 155-161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>

- Honorato JJ, Zambolim L, Aucique-Pérez CE, Resende RS and Rodrigues FA. 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123: 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.016>
- Joshi NS, Rao KS and Subramanian RB. 2012. Anatomical and biochemical aspects of interaction between roots of chickpea and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 2. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 45(15): 1773-1789. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.674709>
- Leslie JF., Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Hoboken, Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470278376.fmatter>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 79-106. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-4>
- Mahendranathan C, Adikaram NKB and Jayasingam T. 2016. Enhancement of natural disease resistance of *Capsicum annum* L. against anthracnose disease through selected postharvest treatments. *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Australasian Soil-borne Symposium*, Lincoln University, New Zealand. 14-17
- Padilla-Ramos R, Salas-Muñoz S, Velásquez-Valle R and Reveles-Torres LR. 2018. A novel molecular approach in the study of parasite-host interaction. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 95-114. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1808-6>
- Pan SQ, Ye XS and Kue J. 1991. A technique for detection of chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. *Phytopathology* 81(9): 970-974. <https://doi.org/10.1094/phyto-81-970>
- Perez-Nadales E and Di Pietro A. 2011. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 23(3):1171-1185. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.07509>
- Prusky D, Alkan N, Mengiste T and Fluhr R. 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annual Review of Phytopathology* 51:155-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>
- Rammamoorthy V, Raguchander T and Samiyappan, R. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Soil* 239(1):55-68. <https://www.jstor.org/stable/24120999>
- Ruiz-May E, De la Peña C, Galaz-Avalos RM, Lei Z, Watson BS, Sumner LW and Loyola-Vargas VM. 2011. ATP biosynthesis deficiency revealed by proteomics approach is correlated with oxidative burst in *Catharanthus roseus* (L.) G. hairy roots treated with methyl jasmonate. *Plant and Cell Physiology* 52:1401-1421. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr086>
- Santos IS, Machado OLT, Da Cunha M and Gomes VM. 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalization. *Plant Science* 167(6):1203-1210. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.021>
- Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI, Zavaleta ME, Mora AMA and Guevara OL. 2012. Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30: 66-71
- Statgraphics Centurion XVI.II. 2010. StatPoint Technologies, Inc.
- Wang M, Sun Y, Sun G, Liu X, Zhai L, Shen Q and Guo S. 2015. Water balance altered in cucumber plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*. *Scientific Reports* 5:7722. <https://doi.org/10.1038/srep07722>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications* Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ and Innis MA (Eds). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>



# Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*

## Identificación del *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) en variedades comerciales de *Euphorbia pulcherrima*

Omar Jacobo-Villegas, María Teresa Colinas-León\*, Héctor Lozoya-Saldaña, Departamento de Fitotecnia<sup>1</sup>, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal<sup>2</sup>, Departamento de Parasitología Agrícola<sup>3</sup>, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México; Irán Alia-Tejacal, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca, Morelos, México; Moisés Camacho-Tapia<sup>2</sup>, Santos Gerardo Leyva-Mir<sup>3</sup>; Juan Manuel Tovar-Pedraza, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán. Km 5.5 Carretera Culiacán-Eldorado, Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. Mónica Pérez-Nicolás<sup>1</sup>. \*Autor para correspondencia: lozcol@gmail.com.

Recibido: 08 de Junio, 2020.

Aceptado: 02 de Agosto, 2020.

Jacobo-Villegas O, Colinas-León MT, Lozoya-Saldaña H, Alia-Tejacal I, Camacho-Tapia M, Leyva-Mir SG, Tovar-Pedraza JM and Pérez-Nicolás M. 2020. Identification of *Poinsettia mosaic virus* (Tymovirus) in commercial varieties of *Euphorbia pulcherrima*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 420-433.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2006-3

Primera publicación DOI: 20 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 20, 2020.

**Resumen.** En México, el *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) infecta dos variedades comerciales de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*); sin embargo, se desconoce la presencia del virus en otras variedades comercializadas en el país. Los objetivos de esta investigación fueron la identificación del PnMV en 20 variedades comerciales de nochebuena

**Abstract.** In Mexico, the *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) infects two commercial varieties of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), however, the presence of the virus in other varieties commercialized in the country is unknown. The objectives of this research were the identification of PnMV in 20 commercial varieties of poinsettia and evaluation of two buffer solutions in the mechanical transmission of PnMV to differential species. Virus identification was performed with serological and molecular tests. Four differential species (*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *Chenopodium amaranticolor*) were inoculated with PnMV. PnMV was identified by DAS-ELISA in the 20 commercial varieties, in 13 of them the presence was confirmed by RT-PCR. Warts and systemic chlorosis (phosphate solution + DIECA, pH 8.6) occurred in *N. benthamiana*. PnMV was detected in 100% of the commercial

y evaluación de dos soluciones amortiguadoras en la transmisión mecánica del PnMV a especies diferenciales. La identificación del virus se realizó con pruebas serológicas y moleculares. Se inocularon cuatro especies diferenciales (*Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Chenopodium amaranticolor*) con PnMV. Se identificó a PnMV mediante DAS-ELISA en las 20 variedades comerciales, en 13 de ellas se corroboró la presencia por RT-PCR. En *N. benthamiana* se observaron ve­rrugas y clorosis sistémica (solución de fosfatos + DIECA, pH 8.6). Se detectó el PnMV en 100% de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas con la técnica serológica DAS-ELISA, aunque solo el 35% mostró síntomas característicos de la infección viral. *N. benthamiana* presentó síntomas putativos a la infección por el virus, pero no se corroboró molecularmente.

**Palabras clave:** PnMV, virus-nochebuena, RT-PCR.

Las variedades comerciales de nochebuena son las plantas de maceta más vendidas en el mundo (Canul *et al.*, 2012). En el 2018 en Estados Unidos de América el valor de la producción del cultivo de nochebuena fue superior a los 148 millones de dólares (USDA, 2019). En este mismo año en México se produjeron 19 millones de plantas, con un valor de producción de 718 millones de pesos (SADER, 2019). El cultivo de nochebuena se encuentra amenazada por plagas y enfermedades, donde los virus tienen mayor importancia (Bertaccini *et al.*, 1996). Las variedades de nochebuena son hospedantes del *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) (Ma *et al.*, 2004) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), este último como el principal patógeno viral del cultivo y con distribución mundial (Clarke *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2010).

varieties of poinsettia evaluated with the DAS-ELISA serological technique, although only 35% of them showed the characteristic symptoms of viral infection. *N. benthamiana* presented putative symptoms to virus infection but was not molecularly corroborated.

**Key words:** PnMV, poinsettia-virus, RT-PCR.

The commercial varieties of poinsettia are the bestselling pot plants worldwide (Canul *et al.*, 2012). In 2018, the value of poinsettia production in the United States of America reached more than 148 million dollars (USDA, 2019). In the same year, 19 million plants were produced in Mexico, valued at 718 million Mexican pesos (SADER, 2019). Poinsettia cropping is threatened by pests and diseases, and those caused by viruses are the most important (Bertaccini *et al.*, 1996). Poinsettia varieties are hosts of *Poinsettia latent virus* (PnLV) (aus dem Siepen *et al.*, 2005), *Euphorbia leaf curl virus* (EuLCV) (Ma *et al.*, 2004) and *Poinsettia mosaic virus* (PnMV), of which *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) is the most important and widely distributed poinsettia viral pathogen in the world (Clarke *et al.*, 2006; Okano *et al.*, 2010).

Commercial poinsettia varieties infected with PnMV usually show leaf mosaic symptoms and mottling, as well as foliar deformation that includes the bracts, but some plants can be asymptomatic (Fulton and Fulton, 1980; Lebas *et al.*, 2007). When infections are severe, the PnMV interferes with the process of bract pigmentation, poinsettias' main attractive feature, and puts the production of the crop at risk (Brunt *et al.*, 1996). In Mexico, PnMV infects wild poinsettia plants, backyard plants, and the 'Freedom' and 'Red Prestige' commercial varieties (Jacobo *et al.*, 2015; Ocampo *et al.*, 2013). However, the presence of PnMV has not been detected on other varieties cultivated in

Las variedades comerciales de nochebuena infectadas con el PnMV presentan comúnmente síntomas de mosaico y moteado en las hojas, así como deformación foliar incluyendo brácteas, algunas plantas pueden ser asintomáticas (Fulton y Fulton, 1980; Lebas *et al.*, 2007). En infecciones severas el PnMV interfiere en el proceso de pigmentación de las brácteas, atractivo principal de la nochebuena, poniendo en riesgo la producción del cultivo (Brunt *et al.*, 1996). En México, el PnMV infecta plantas de nochebuena silvestre, de traspatio y las variedades comerciales ‘Freedom’ y ‘Red Prestige’ (Jacobo *et al.*, 2015; Ocampo *et al.*, 2013); no obstante, se desconoce la presencia de este virus en otras variedades que se comercializan en el país. Una de las limitantes en el estudio biológico del PnMV es el bajo porcentaje de éxito en la transmisión mecánica del virus en especies diferenciales (0-10%) (Guy *et al.*, 1985). Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron la identificación del PnMV en 20 variedades comerciales de nochebuena y evaluación de dos soluciones amortiguadoras en la transmisión mecánica del PnMV en especies diferenciales. Las hipótesis fueron que las variedades de nochebuena que se comercializan en México se encuentran infectadas con el PnMV, y que al menos una solución amortiguadora es adecuada para transmitir mecánicamente el PnMV a especies diferenciales.

En diciembre de 2016-2018, se adquirieron plantas asintomáticas (A) y con síntomas (S) putativos a virus de 20 variedades comerciales de nochebuena (100% pigmentadas), en un vivero ubicado en Texcoco, Estado de México. Las ventajas de adquirir los materiales en esta temporada invernal son la diferenciación total de brácteas y presencia de hojas desarrolladas en las plantas, lo que facilita la observación de los síntomas virales. El material vegetal (esquejes enraizados) provenía de las empresas florícolas Floraplant® y Vivero

the country. One of the limitations in the biological study of PnMV is the low success rate of the mechanical transmission of the virus to differential species (0-10%) (Guy *et al.*, 1985). Based on the above, the objectives of this research were to identify the PnMV in 20 commercial poinsettia varieties and evaluate two buffer solutions in the mechanical transmission of PnMV to differential species. The hypotheses formulated were that the poinsettia varieties commercialized in Mexico are infected with PnMV and that at least one buffer solution is adequate for transmitting PnMV by mechanical means to differential species.

In December 2016-2018, asymptomatic plants (A) and plants with putative virus symptoms (S) of 20 commercial poinsettia varieties (100% pigmented) were obtained from a greenhouse located in Texcoco, State of Mexico. The advantages of obtaining materials in the winter season are the total differentiation of bracts and the presence of developed leaves on the plants, which makes it easier to observe the viral symptoms. The plant material (rooted cuttings) came from the flower companies Floraplant® and Vivero Internacional de México® that import plant material mainly from the United States.

The total number of pot plants that were obtained of each variety depended on the availability of the plant material. The varieties and the number of plants each year were: 2016: ‘Silverstar Marble’ (three plants, A), ‘Silverstar Red’ (two plants, A), ‘Sparkling Punch’ (one plant, S), ‘Ice Punch’ (three plants, A), ‘Marblestar’ (two plants, A), ‘Cortez Electric Fire’ (one plant, A), ‘Carousel Dark Red’ (one plant, A) and ‘Primero White’ (six plants, A); 2017: ‘Cortez Red’ (two plants, S), ‘Enduring Marble’ (two plants, S), ‘Freedom Pink’ (two plants, A), ‘Monet Early’ (two plants, A), ‘Polar Bear’ (two plants, S), ‘Premier Pink’ (two plants, A), ‘Viking Cinnamon’ (two plants, A), ‘Winter

internacional de México<sup>®</sup>, empresas que importan el material vegetal de Estados Unidos de América principalmente.

El número total de plantas en maceta adquiridas de cada variedad estuvo condicionado por la disponibilidad del material vegetal. Las variedades y número de plantas adquiridas en cada año fueron: 2016: ‘Silverstar Marble’ (tres plantas, A), ‘Silverstar Red’ (dos plantas, A), ‘Sparkling Punch’ (una planta, S), ‘Ice Punch’ (tres plantas, A), ‘Marblestar’ (dos plantas, A), ‘Cortez Electric Fire’ (una planta, A), ‘Carousel Dark Red’ (una planta, A) y ‘Primero White’ (seis plantas, A); 2017: ‘Cortez Red’ (dos plantas, S), ‘Enduring Marble’ (dos plantas, S), ‘Freedom Pink’ (dos plantas, A), ‘Monet Early’ (dos plantas, A), ‘Polar Bear’ (dos plantas, S), ‘Premier Pink’ (dos plantas, A), ‘Viking Cinnamon’ (dos plantas, A), ‘Winter Rose Early Red’ (dos plantas, S) y ‘Winter Rose White’ (dos plantas, A); 2018: ‘Amaris Hot Pink’ (11 plantas, S), ‘Primero Red Glitter’ (seis plantas, S) y ‘Orange Spice’ (seis plantas, A). Las plantas se establecieron en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la UACH. Se mantuvieron a temperaturas de 22 °C en el día y 15 °C en la noche, con un fotoperiodo de 11-12 h, y se manejaron agrónomicamente como lo indica Cabrera *et al.* (2006). Se tomaron muestras de hojas jóvenes, brácteas y tallos de todas las variedades y se mantuvieron refrigeradas a -20 °C para su posterior análisis.

Las pruebas serológicas se realizaron en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, en diciembre de 2019. Se realizó el diagnóstico con el método DAS-ELISA utilizando anticuerpos policlonales para la detección del PnMV, adquiridos con la empresa Agdia<sup>®</sup> (número de catálogo SRA 90700/0500). En cada variedad de nochebuena se realizó el análisis por duplicado (dos muestras por planta de cada variedad), de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Las muestras consistieron en 0.5 g

Rose Early Red’ (two plants, S) and ‘Winter Rose White’ (two plants, A); 2018: ‘Amaris Hot Pink’ (11 plants, S), ‘Primero Red Glitter’ (six plants, S) and ‘Orange Spice’ (six plants, A). The plants were established in the Floriculture greenhouse of the Plant Breeding Department of Chapingo Autonomous University (UACH, its acronym in Spanish), kept at 22 °C temperature during the day and 15 °C at night, with a photoperiod of 11-12 h, and agronomically managed as indicated by Cabrera *et al.* (2006). Samples of young leaves, bracts, and stems of all the varieties were taken and kept in refrigeration at -20 °C until they were analyzed.

The serological tests were conducted at the National Research Laboratory and Agri-Food and Forestry Service, in December 2019. The diagnosis was made using the DAS-ELISA method with polyclonal antibodies to detect PnMV; the polyclonal antibodies were purchased from Agdia<sup>®</sup> (catalog number SRA 90700/0500). The analysis of each poinsettia variety was conducted in duplicate (two samples per plant of each variety), according to the manufacturer’s protocol. The samples consisted of 0.5 g of young leaves which were individually macerated in sterile mortars using liquid nitrogen. The samples placed on sensitized plates with the enzymatic conjugate were incubated at 4 °C for 12 h. The ‘Red Prestige’ commercial variety, provided by the UACH’s Agricultural Virology Laboratory, was used as the positive control, and a wild poinsettia plant collected in Tehuilotepic, Guerrero, as the negative control.

The absorbance values were measured at 405 nm using a Varioskan Flash Thermo Scientific<sup>®</sup> microplate reader 60 min after incubation. According to Ruiz *et al.* (2009), samples with values higher than three times the means of the negative control were considered positive.

The molecular tests were conducted at the Agricultural Virology Laboratory of UACH’s

de hojas jóvenes, maceradas individualmente en morteros estériles utilizando nitrógeno líquido. Las muestras depositadas en las placas sensibilizadas con el conjugado enzimático se incubaron a 4 °C durante 12 h. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' (proporcionada por el Laboratorio de Virología Agrícola de la UACH.) y como control negativo una planta de nochebuena silvestre (recolectada en Tehuilotepic, Guerrero).

Los valores de absorbancia se midieron a 405 nm en un lector de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific® a los 60 min de incubación. De acuerdo con Ruiz *et al.* (2009) se consideraron positivas las muestras con valores mayores a tres veces la media del testigo negativo.

Las pruebas moleculares se llevaron a cabo en el Laboratorio de Virología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la UACH. La extracción del ARN total se realizó con el reactivo PureLink™ Plant ARN Reagent (número de catálogo 12322012) de la empresa Thermo Fisher Scientific®, de acuerdo con el protocolo señalado por el fabricante. De cada variedad de nochebuena se tomaron muestras de 0.1 g de tejido vegetal en hojas jóvenes, tallos y/o brácteas, se maceraron individualmente con nitrógeno líquido en morteros estériles, cada macerado se depositó en tubos de microcentrífuga (1.5 mL) adicionando 500 µL de la solución de lisis. Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g durante 2 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se mezclaron con 100 µL de cloruro de sodio 5 M y 300 µL de cloroformo, se centrifugaron durante 10 min y se recuperó la parte superficial, y se adicionaron 1.5 volúmenes de isopropanol (en relación al recuperado) y se incubaron a -4 °C durante 12 h. Posteriormente, se centrifugaron nuevamente durante 10 min, la limpieza del ARN se realizó con etanol al 70%, finalmente la pastilla del ARN se diluyó en agua libre de nucleasas (Promega®) y se almacenó a -20 °C.

Department of Agricultural Parasitology. The extraction of total RNA was carried out using the PureLink™ Plant RNA Reagent (catalog number 12322012) from the Thermo Fisher Scientific® company, according to the manufacturer's protocol. From each poinsettia variety, samples of 0.1 g of plant tissue from young leaves, stems and/or bracts were taken and individually macerated with liquid nitrogen in sterile mortars, and then each macerate was placed in a microcentrifuge tube (1.5 mL) to which 500 µL of lysis solution were added. The samples were centrifuged at 12,000 x g for 2 min at 4 °C, the supernatant was recovered and mixed with 100 µL of 5 M sodium chloride and 300 µL of chloroform, and centrifuged for 10 min; the superficial part was recovered, and 1.5 volumes of isopropanol were added (relative to what was recovered) and incubated at -4 °C for 12 h. Then, the samples were centrifuged again for 10 min; RNA cleanup was performed with 70% ethanol; and, finally, the RNA tablet was diluted in water free of nucleases (Promega®) and stored at -20 °C.

The concentration of the total RNA was determined in a NanoDrop ThermoFisher Scientific® spectrophotometer, while RNA integrity was verified in 1% p/v agarose gel electrophoresis (120V/60 min) and visualized in a Quantum Studio® photodocumenter. To determine RNA viability, one fragment of the 18S ribosomal gene was amplified using the primers 18S-F (5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3') and 18S-R (5'-ACCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'), which amplify a 300 pb fragment, according to the RT-PCR conditions indicated by Zamboni *et al.* (2008).

To detect PnMV on the poinsettia varieties, a fragment of the virus capsid protein was amplified with the specific primers PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGTTCTTCT-3') and PnMV-R (5'-GAGCCGGCGACTCCAT CCA-3'),

Se determinó la concentración del ARN total en un espectrofotómetro NanoDrop ThermoFisher Scientific®, y se corroboró su integridad con electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v (120V/60 min), visualizado en un fotodocumentador Quantum Studio®. Para determinar la viabilidad del ARN se amplificó un fragmento del gen ribosomal 18S, con los iniciadores 18S-F (5'-ACGGATCGCACGGCCTTCGTG-3') y 18S-R (5'-ACCA-GACTTGCCCTCCAATGG-3'), que amplifican un fragmento de 300 pb, de acuerdo con las condiciones de RT-PCR señaladas por Zamboni *et al.* (2008).

Para la detección del PnMV en las variedades de nochebuena, se amplificó un fragmento de la proteína de la cápside del virus, con los iniciadores específicos PnMV-F (5'-GTGCCAGCCGCGG-TTCTTCT-3') y PnMV-R (5'-GAGCCGGCGA-CTCCATCCA-3') que amplifican un fragmento de 700 pb y se llevó bajo las condiciones de RT-PCR señaladas por Ocampo *et al.* (2013). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% p/v (120V/60 min). Los iniciadores utilizados en las pruebas moleculares (18S-F, 18S-R, PnMV-F y PnMV-R) se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Como control positivo se utilizó la variedad comercial 'Red Prestige' y como control negativo una planta de *Nicotiana clevelandii*, en ambos casos se utilizó tejido foliar para el análisis.

Los productos de RT-PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen en Corea y se compararon con las registradas en el GenBank para el PnMV, usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Por otro lado, se realizó inoculación mecánica del PnMV en plantas diferenciales de *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Chenopodium amaranticolor*; a los 60 días después de la emergencia de las plantas. El inóculo se obtuvo

which amplify a 700 pb fragment. This procedure was carried out under the RT-PCR conditions indicated by Ocampo *et al.* (2013). The RT-PCR amplified fragments were analyzed using 2% p/v agarose gel electrophoresis (120V/60 min). The primers used in the molecular tests (18S-F, 18S-R, PnMV-F and PnMV-R) were synthesized at the UNAM's Institute of Biology in Cuernavaca, Morelos. The 'Red Prestige' commercial variety was used as the positive control., and one plant of *Nicotiana clevelandii* as the negative control; foliar tissue was used for the analysis in both cases.

The RT-PCR fragments were sent to Macrogen, in Korea, for sequencing, and then compared to those recorded for PnMV in the GenBank using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

On the other hand, PnMV was mechanically inoculated in differential plants of *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *Chenopodium amaranticolor* 60 days after plant emergence. The inoculum was obtained from the PnMV positive commercial varieties that were analyzed using RT-PCR, except 'Amaris Hot Pink', and for this reason, there were 12 inoculum sources. Two buffer solutions were used: Phosphates buffer + DIECA (diethyldithiocarbamic acid) with pH 8.6, and Na phosphates (mono and dibasic) with pH 7.8, in order to increase the success rate of the virus transmission due to its low transmission rate in differential species (Chung *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 1985). To prepare the viral solutions and inoculate differential plants, the methodology described by Jacobo *et al.* (2015) was used. Young leaves of each inoculum source were individually macerated in a sterile mortar to which the corresponding buffer in a 1/10 p/v ratio was added. Twenty-four plants per differential species were inoculated: two plants per inoculum source (one for each buffer solution). Two plants were established as negative controls in each species and inoculated only with each of

de las variedades comerciales positivas al PnMV analizadas por RT-PCR, exceptuando ‘Amaris Hot Pink’, por lo que se tuvieron 12 fuentes de inóculo. Se utilizaron dos soluciones amortiguadoras: amortiguador de Fosfatos + DIECA (ácido dietilditiocarbámico) con pH 8.6 y amortiguador de Fosfatos de Na (mono y dibásico) con pH 7.8, con la finalidad de incrementar el porcentaje de éxito en la transmisión del virus, debido a su baja tasa de transmisión en especies diferenciales (Chung *et al.*, 2004; Guy *et al.*, 1985). Para preparar las soluciones virales e inoculación de las plantas diferenciales se siguió la metodología descrita por Jacobo *et al.* (2015), se maceraron individualmente hojas jóvenes de cada fuente de inóculo en un mortero estéril y se adicionó el amortiguador respectivo en relación 1/10 p/v. Se inocularon 24 plantas por especie diferencial: dos plantas por fuente de inóculo (una para cada solución amortiguadora). Se establecieron dos plantas como testigos negativos en cada especie, inoculadas únicamente con cada una de las soluciones amortiguadoras. Utilizando un hisopo estéril embebido con la solución viral o solución amortiguadora (testigos negativos) se frotaron de 4 a 5 hojas jóvenes por planta diferencial, asperjadas previamente con carborundum de 600 mallas.

Los materiales inoculados se mantuvieron en observación en el invernadero de Floricultura del Departamento de Fitotecnia de la UACH. Estos materiales no se fertilizaron. A los 60 días después de la inoculación (ddi) todos los materiales se analizaron molecularmente para determinar la transmisión del PnMV (de acuerdo con la metodología antes descrita para la extracción de ARN y RT-PCR en las variedades comerciales de nochebuena).

Las variedades comerciales de nochebuena que se observaron asintomáticas en el momento de su adquisición permanecieron sin cambios aparentes en el invernadero y representaron el 65% de la población evaluada. De acuerdo con Lebas *et al.*

the buffer solutions. Then 4-5 young leaves per differential plant that had been previously sprayed with 600 mesh carborundum, were rubbed with the viral solution or buffer solution (negative controls) using a sterile cotton swab.

The inoculated materials were kept under observation in the Floriculture greenhouse of UACH's Plant Breeding Department. These materials were not fertilized. Sixty days after inoculation (dai), all the materials were molecularly analyzed to determine the transmission of PnMV (according to the previously described methodology used to extract RNA and RT-PCR from the commercial poinsettia varieties).

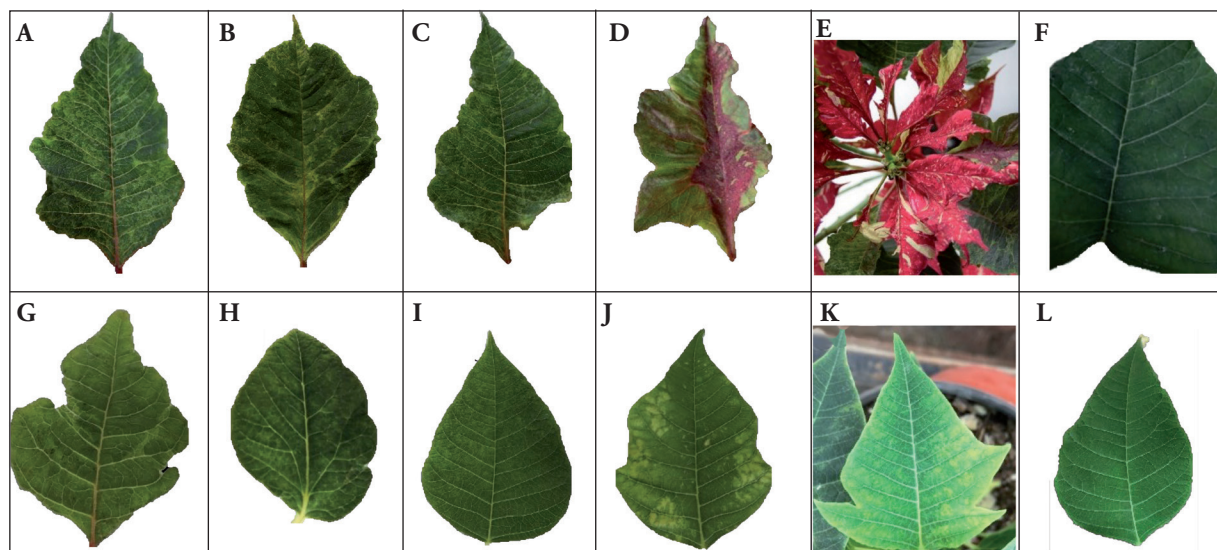
The commercial poinsettia varieties with no symptoms when they were bought had no apparent changes during the time they were kept in the greenhouse and accounted for 65% of the evaluated population. According to Lebas *et al.* (2007), PnMV sometimes does not induce symptoms in infected plants, which would explain the “healthy appearance” of these varieties. 35% of the poinsettia population showed putative virus symptoms from the time when they were bought and while kept in the greenhouse (approximately 1 year). The symptoms were mosaic, mottling, chlorosis, and foliar deformation. Carballo *et al.* (2001) and Chung *et al.* (2004) mentioned that these symptoms are characteristic of poinsettia varieties infected with PnMV. The ‘Enduring Marble’ variety showed rib yellowing, a secondary symptom that Bertaccini *et al.* (1996) associated with PnMV infection. The bracts of variety ‘Primero Red Glitter’ were severely deformed and not totally pigmented, and according to Brunt *et al.* (1996), these symptoms are associated with PnMV infection (Figure 1).

The absorbance values (DAS-ELISA) of all the commercial varieties were higher than those of the detection limit (DL). The average absorbance values were between 0.908 and 1.837. ‘Monet

(2007) el PnMV en ocasiones no induce síntomas en las plantas infectadas, lo que explicaría la “aparición sana” en estas variedades. El 35% de la población de nochebuenas presentó síntomas putativos a virus desde el momento de su adquisición y durante su permanencia en el invernadero (1 año aproximadamente). En estas plantas se observaron síntomas de mosaico, moteado, clorosis y deformación foliar. Carballo *et al.* (2001) y Chung *et al.* (2004) mencionan que estos síntomas son característicos en variedades de nochebuena infectadas con PnMV. En la variedad ‘Enduring Marble’ se presentó amarillamiento de nervaduras, Bertaccini *et al.* (1996) asocia este síntoma secundario a la infección por el virus. En ‘Primero Red Glitter’ las brácteas presentaron deformaciones severas y no se pigmentaron en su totalidad, de acuerdo con Brunt *et al.* (1996) estos síntomas se asocian a la infección del PnMV (Figura 1).

Early’ had the highest absorbance values, while ‘Sparkling Punch’ had lower values. The results of the serological analysis indicated that 100% of the plants were infected with the PnMV virus.

The amplification of the fragment of the 18S ribosomal gene with the RNA obtained from the commercial varieties ensured RNA viability in the molecular tests. PnMV was identified using the RT-PCR technique with specific primers. The presence of the virus was confirmed in 13 varieties: symptomatic: ‘Sparkling Punch’, ‘Amaris Hot Pink’, ‘Polar Bear’, ‘Primero Red Glitter’ and ‘Winter Rose Early Red’; and asymptomatic: ‘Silverstar Marble’, ‘Silverstar Red’, ‘Ice Punch’, ‘Marblestar’, ‘Cortez Electric Fire’, ‘Carousel Dark Red’, ‘Primero White’ and ‘Monet Early (Table 1), by amplifying the expected fragment. PnMV was molecularly identified in 65% of the evaluated varieties; the virus was identified in different plant



**Figura 1.** Síntomas putativos a virus en variedades comerciales de nochebuena. A-E) ‘Primero Red Glitter’; A-C): deformación de la lámina foliar y mosaico clorótico; D): bráctea deforme (en proceso de diferenciación); E): conjunto de brácteas con deformación severa; F) ‘Winter Rose Early Red’, mosaico; G): ‘Cortez Red’, deformación y mosaico; H): ‘Enduring Marble’, clorosis y amarillamiento de nervaduras; I y J) ‘Polar Bear’; I): clorosis; J): moteado; K) ‘Sparkling Punch’, manchas cloróticas; L): ‘Primero White’ hoja asintomática.

**Figure 1.** Putative virus symptoms in commercial poinsettia varieties. A-E) ‘Primero Red Glitter’; A-C): foliar blade deformation and chlorotic mosaic; D): deformed bract (in differentiation process); E): cluster of severely deformed bracts; F) ‘Winter Rose Early Red’, mosaic; G): ‘Cortez Red’, deformation and mosaic; H): ‘Enduring Marble’, chlorosis and rib yellowing; I and J) ‘Polar Bear’; I): chlorosis; J): mottling; K) ‘Sparkling Punch’, chlorotic spots; L): ‘Primero White’ asymptomatic leaf.



Los valores de absorbancia (DAS-ELISA) presentados en todas las variedades comerciales fueron superiores al límite de detección (LD). Los valores promedios de absorbancia en las variedades estuvieron entre 0.908 y 1.837. ‘Monet Early’ presentó los valores mayores de absorbancia, mientras que ‘Sparkling Punch’ presentó valores menores. Los resultados serológicos indicaron que el 100% de las plantas estuvieron infectadas con el virus PnMV.

La amplificación del fragmento del gen ribosomal 18S con el ARN obtenido en las variedades comerciales garantizó la viabilidad del ARN en las pruebas moleculares. Se realizó RT-PCR con los iniciadores específicos para la identificación del PnMV. Se corroboró la presencia del virus en 13 variedades: sintomáticas: ‘Sparkling Punch’, ‘Amaris Hot Pink’, ‘Polar Bear’, ‘Primero Red Glitter’ y ‘Winter Rose Early Red’; y asintomáticas: ‘Silverstar Marble’, ‘Silverstar Red’, ‘Ice Punch’, ‘Marblestar’, ‘Cortez Electric Fire’, ‘Carousel Dark Red’, ‘Primero White’ y ‘Monet Early (Cuadro 1), mediante la amplificación del fragmento esperado. Se identificó molecularmente al PnMV en 65% de las variedades evaluadas, la identificación del virus en diferentes tejidos de la planta se realizó para disminuir el riesgo de obtener falsos positivos, por falta de carga viral en determinados tejidos. Mediante las pruebas serológicas y moleculares se identificó al PnMV tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas, estos resultados evidencian que el virus puede estar presente en las plantas de nochebuena sin inducir síntomas, como lo mencionan Lebas *et al.* (2007) lo que representa una fuente de inóculo latente del patógeno, poniendo en riesgo la sanidad de las plantas en la producción del cultivo.

Las secuencias de ADN del PnMV obtenidas en 11 de las variedades comerciales tuvieron porcentajes de similitud del 95-98% con la secuencia de un aislamiento del virus reportado en Japón con número de acceso AB550788.1. De acuerdo con

tissues in order to reduce the risk of obtaining false positives due to the lack of viral load in certain tissues. PnMV was identified through serological and molecular tests in both symptomatic and asymptomatic plants, and the results showed that the virus may be present in poinsettia plants without inducing symptoms, as mentioned by Lebas *et al.* (2007), which is a latent source of pathogenic inoculum that puts the plant’s health at risk during crop production.

The DNA sequences of PnMV obtained from 11 of the commercial varieties had 95-98% similarity with the sequence of a virus isolate reported in Japan with accession number AB550788.1. According to Jacobo *et al.* (2015), the DNA sequences obtained from the virus in the ‘Freedom’ and ‘Red Prestige’ varieties were aligned with this sequence with 92% similarity. ‘Marblestar’ had 97% similarity with the DNA sequence of the virus reported in Germany with accession number AJ271595.1. The amplicon obtained from ‘Amaris Hot Pink’ was not sent for sequencing.

The *N. benthamiana* plants that were inoculated with PnMV (phosphates + DIECA solution) had warts, systemic chlorosis, foliar deformation and chlorotic spots on the leaves (Figure 2); these symptoms are in agreement with those described by Lebas *et al.* (2007), who inoculated plants of this species with the virus and observed warts and systemic chlorosis on the leaves. The plants that were inoculated with PnMV using a Na phosphates buffer (mono and dibasic) had no symptoms, possibly due to the incompatibility of the buffer and the virus. According to Guy (1985), PnMV has a 0-10% success rate in the mechanical transmission of the virus.

In the particular case of *N. glutinosa*, *N. clevelandii* and *C. amaranticolor*, no differences were observed in the expressed symptoms compared to the use of the buffer solutions. *N. glutinosa*

**Cuadro 1. Resultados de las pruebas serológicas y moleculares en la identificación del PnMV en variedades comerciales de nochebuena.****Table 1. Results of the serological and molecular tests used to identify PnMV in commercial poinsettia varieties.**

|    | Variedad comercial      | Tejido analizado | No. plantas analizadas | RT-PCR             | DAS-ELISA <sup>z</sup> |
|----|-------------------------|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| 1  | 'Silverstar Marble'     | HJ               | 3                      | (+)                | (+)                    |
| 2  | 'Silverstar Red'        | HJ               | 2                      | (+)                | (+)                    |
| 3  | 'Sparkling Punch'       | HJ               | 1                      | (+)                | (+)                    |
| 4  | 'Ice Punch'             | HJ, T            | 3                      | (+)                | (+)                    |
| 5  | 'Marblestar'            | HJ, T            | 2                      | (+)                | (+)                    |
| 6  | 'Cortez Electric Fire'  | HJ               | 1                      | (+)                | (+)                    |
| 7  | 'Carousel Dark Red'     | HJ               | 1                      | (+)                | (+)                    |
| 8  | 'Primero White'         | HJ               | 6                      | 3 <sup>y</sup> (+) | (+)                    |
| 9  | 'Amaris Hot Pink'       | HJ               | 11                     | 7 <sup>y</sup> (+) | (+)                    |
| 10 | 'Cortez Red'            | HJ               | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 11 | 'Enduring Marble'       | HJ               | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 12 | 'Freedom Pink'          | HJ, T            | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 13 | 'Monet Early'           | HJ               | 2                      | (+)                | (+)                    |
| 14 | 'Polar Bear'            | HJ, BR           | 2                      | (+)                | (+)                    |
| 15 | 'Premier Pink'          | HJ, BR           | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 16 | 'Primero Red Glitter'   | HJ               | 6                      | 3 <sup>y</sup> (+) | (+)                    |
| 17 | 'Viking Cinammon'       | HJ               | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 18 | 'Winter Rose Early Red' | HJ               | 2                      | (+)                | (+)                    |
| 19 | 'Whinter Rose White'    | HJ               | 2                      | (-)                | (+)                    |
| 20 | 'Orange Spice'          | HJ, BR, T        | 6                      | (-)                | (+)                    |

Abreviaturas en la tabla. Tejido analizado. HJ: Hojas Jóvenes; T: Tallo; BR: Brácteas. Resultados. (+): positivo; (-): negativo; <sup>y</sup>: indica el número de plantas positivas en relación con el número total de plantas analizadas. <sup>z</sup>: Se analizaron únicamente hojas jóvenes. Variedad comercial. (1, 2, 4-7, 10, 12): Material vegetal de la empresa Vivero Internacional de México<sup>®</sup>; (3, 8, 9, 11, 13-20): Material vegetal de la empresa Floraplant<sup>®</sup> / Abbreviations in the table. Analyzed tissue. HJ: Young leaves; T: Stem; BR: Bracts. Results. (+): positive; (-): negative; <sup>y</sup>: indicates the number of positive plants compared to the total number of analyzed plants. <sup>z</sup>: Only young leaves were analyzed. Commercial variety. (1, 2, 4-7, 10, 12): Plant material from the company Vivero Internacional de México<sup>®</sup>; (3, 8, 9, 11, 13-20): Plant material from the Floraplant<sup>®</sup> company.

Jacobo *et al.* (2015) las secuencias de ADN obtenidas del virus en las variedades 'Freedom' y 'Red Prestige' se alinearon a esta misma secuencia con porcentajes de similitud del 92%. En 'Marblestar' se obtuvo un porcentaje de similitud del 97% con la secuencia de ADN del virus reportado en Alemania con número de accesión AJ271595.1. El amplicón obtenido en 'Amaris Hot Pink' no se mandó a secuenciar.

Las plantas de *N. benthamiana* que se inocularon con el PnMV (solución de fosfatos + DIECA)

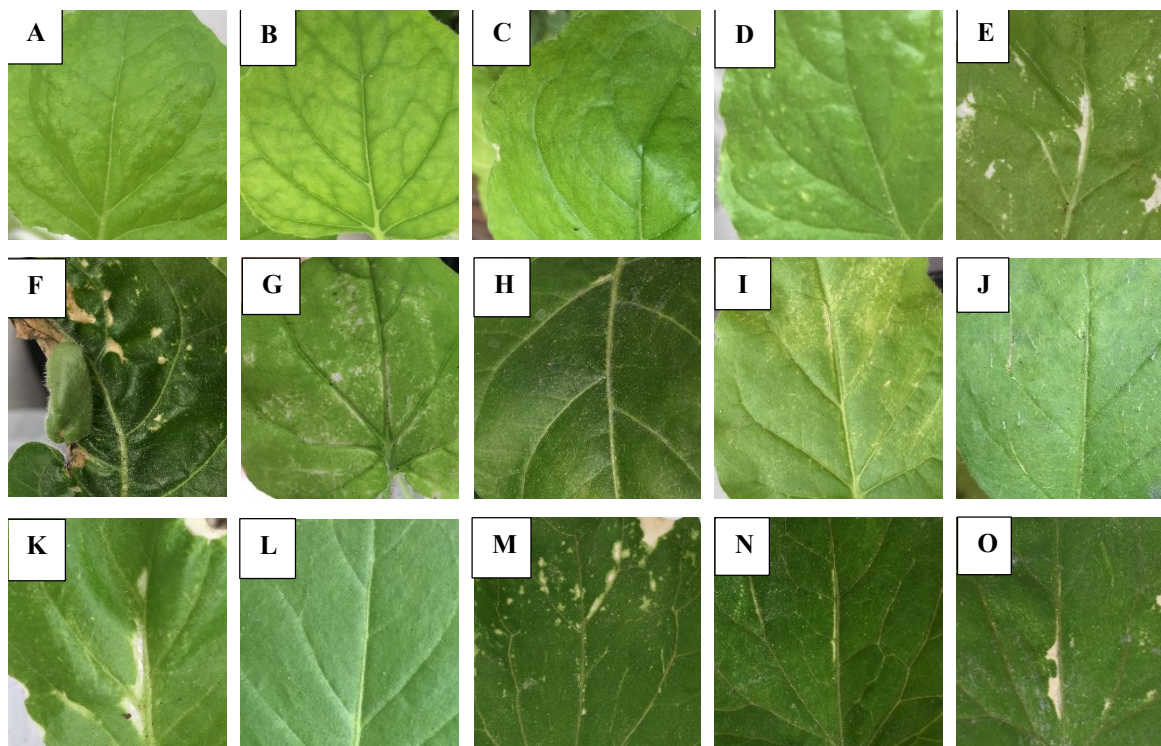
showed light mosaic symptoms that were attributed to virus transmission. The *N. clevelandii* plants had chlorosis symptoms on the leaves, possibly in response to viral infection. The inoculated plants of *C. amaranticolor* had no symptoms (Figure 2).

All the differential plants that were inoculated with PnMV were analyzed using RT-PCR, and the results obtained were negative. The differential plants of *N. benthamiana*, *N. glutinosa* and *N. clevelandii* are reported as PnMV hosts, while *C. amaranticolor* is not susceptible to infection by this

presentaron verrugas, clorosis sistémica, deformación y puntos cloróticos en las hojas (Figura 2), estos síntomas coinciden con los descritos por Lebas *et al.* (2007) quienes al inocular plantas de esta especie con el virus observaron verrugas y clorosis sistémica en hojas. Las plantas inoculadas con PnMV utilizando el amortiguador de fosfatos de Na (mono y dibásico) se mostraron asintomáticas, posiblemente a la incompatibilidad del amortiguador con el virus. De acuerdo con Guy (1985) el PnMV presenta un porcentaje de éxito en la transmisión mecánica del 0-10%.

pathogen (Brunt *et al.*, 1996). Despite the negative results of the molecular tests, the symptoms observed on *N. benthamiana* can be attributed to PnMV infection, since according to Brunt *et al.* (1996), Floeistad and Blystad (1999) and Lebas *et al.* (2007), this species has been mechanically inoculated and the virus re-isolated; the authors also point out that this species is adequate for diagnosing the pathogen, because the plants that are inoculated with the virus are systemically infected.

The negative results of the RT-PCR tests for PnMV in the differentiated plants can be attributed



**Figura 2.** Síntomas observados en las plantas diferenciales inoculadas con el PnMV. A-E): *N. benthamiana*; A): verrugas; B): clorosis sistémica; C): deformación; D): puntos cloróticos; E): Testigo (-), daño mecánico; F-I): *N. glutinosa*; F): deformación; G): manchas blancas; H): mosaico ligero; I): Testigo (-), daño mecánico; J-L): *N. clevelandii*; J): clorosis; K): daño mecánico; L): Testigo (-), hoja sana; M-O): *C. amaranticolor*; M y N): daño mecánico; O): Testigo (-), daño mecánico.

**Figure 2.** Symptoms observed on differentiated plants inoculated with PnMV. A-E): *N. benthamiana*; A): warts; B): systemic chlorosis; C): deformation; D): chlorotic spots; E): Control (-), mechanical damage; F-I): *N. glutinosa*; F): deformation; G): white spots; H): slight mosaic; I): Control (-), mechanical damage; J-L): *N. clevelandii*; J): chlorosis; K): mechanical damage; L): Control (-), healthy leaf; M-O): *C. amaranticolor*; M and N): mechanical damage; O): Control (-), mechanical damage.

En el caso particular de *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *C. amaranticolor*, no se observaron diferencias en los síntomas expresados con respecto a la utilización de las soluciones amortiguadoras. En *N. glutinosa* se observaron síntomas de mosaico ligero atribuibles a la transmisión del virus. Las plantas de *N. clevelandii* presentaron síntomas de clorosis en las hojas, posiblemente como respuesta a infección viral. En *C. amaranticolor* las plantas inoculadas se mostraron asintomáticas (Figura 2).

Todas las plantas diferenciales inoculadas con el PnMV se analizaron por RT-PCR, los resultados obtenidos fueron negativos. Las plantas diferenciales de *N. benthamiana*, *N. glutinosa* y *N. clevelandii* están reportadas como hospedantes del PnMV, mientras que *C. amaranticolor* no es susceptible a la infección por este patógeno (Brunt *et al.*, 1996). A pesar de los resultados negativos en las pruebas moleculares, los síntomas observados en *N. benthamiana*, se puede atribuir a la infección del PnMV, ya que de acuerdo con Brunt *et al.* (1996), Floeistad y Blystad (1999) y Lebas *et al.* (2007) en esta especie se ha podido inocular mecánicamente y aislar el virus, y señalan esta especie como adecuada para el diagnóstico del patógeno, ya que las plantas inoculadas con el virus se infectan sistémicamente.

Los resultados negativos en las pruebas de RT-PCR del PnMV en las plantas diferenciales pueden atribuirse a la presencia de inhibidores, como se observó en las variedades comerciales de nochebuena, donde mediante las pruebas serológicas se obtuvieron resultados positivos (validados por los controles negativos y positivos) que no se pudieron corroborar molecularmente, Lebas *et al.* (2007) mencionan que las causas probables pueden ser la presencia de inhibidores y látex que dificultan la extracción de ARN, por lo que sugieren la identificación del virus mediante RT-PCR para caracterizar aislamientos y las pruebas DAS-ELISA para detección del patógeno.

to the presence of inhibitors, as was observed on the commercial poinsettia varieties, where using serological tests, positive results were obtained (validated by negative and positive controls) that could not be molecularly confirmed. Lebas *et al.* (2007) mentioned that the probable causes could be the presence of inhibitors and latex, which make it difficult to extract RNA, and suggest using RT-PCR to identify the virus and characterize isolates, and the DAS-ELISA tests to detect the pathogen.

*Poinsettia mosaic virus* was detected on 100% of the commercial poinsettia varieties using the DAS-ELISA serological technique, and on 65% using RT-PCR molecular tests. 35% of the varieties showed characteristic symptoms of viral infection, while 65% showed no symptoms. PnMV was identified in both symptomatic and asymptomatic plants. The origin of the plant material did not influence the results. The use of the buffer solution prepared with phosphates + DIECA, pH 8.6, to mechanically inoculate PnMV in *Nicotiana benthamiana* plants contributed to the development of putative virus infection symptoms but this was not molecularly confirmed.

### Acknowledgments

The authors wish to thank CONACyT for the financial support provided for conducting this research.

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

Se detectó el *Poinsettia mosaic virus* en 100 % de las variedades comerciales de nochebuena evaluadas con la técnica serológica DAS-ELISA y en 65% mediante pruebas moleculares RT-PCR. El 35% de las variedades mostró síntomas característicos de la infección viral, mientras que el 65%

fueron asintomáticas. La identificación del PnMV se obtuvo tanto en plantas sintomáticas como asintomáticas. El origen del material vegetal no influyó en los resultados. El empleo de la solución amortiguadora de fosfatos + DIECA, pH 8.6 en la inoculación mecánica de PnMV en plantas de *Nicotiana benthamiana*, propició la aparición de síntomas putativos a la infección por el virus, pero no se corroboró molecularmente.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACyT por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

#### LITERATURA CITADA

- aus dem Siepen M, Pohl J, O, Koo BJ, Wege C and Jeske H. 2005. *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but anatural poleovirus-sobemovirus hybrid. *Virology* 336(2): 240-250. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.03.020>
- Bertaccini A, Vibio M and Bellardi MG. 1996. Virus diseases of ornamental shrubs. X. *Euphorbia pulcherrima* Willd. infected by viruses and phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 35(2): 129-132. <https://www.jstor.org/stable/pdf/42685257.pdf?seq=1>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L and Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and lists from the VIDE Database. *Poinsettia mosaic tymovirus*. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/dесr633.htm> (consulta, mayo 2020).
- Cabrera RJ, Morán MF, Torres QR, Pellón BA y Granada CL. 2006. Producción de nochebuena *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch en Morelos. Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Folleto Técnico No. 23. Zacatepec, Mor., México. 20p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2912/PRODUCNO-CHBUENA.pdf?sequence=1>
- Canul KJ, García PF, Osuna CFJ y Ramírez RS. 2012. Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena. Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Folleto Técnico No. 64. Zacatepec, Mor., México. 39p. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3553>
- Carballo O, Izaguirre ML and Marys E. 2001. Detection of *Poinsettia mosaic virus* infecting poinsettias (*Euphorbia pulcherrima*) in Venezuela. *Plant Disease* 85(11): 1208. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1208D>
- Chung BN, Lee EK, Jeong MI and Kim HR. 2004. First report of *Poinsettia mosaic virus* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 20(3): 220-223. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2004.20.3.220>
- Clarke JL, Klemsdal SS, Floistad E, Hvoslef-Eide AK, Haugslie S, Moe R and Blystad DR. 2006. Genetic engineering of poinsettia with the aim of enhancing its resistance to *Poinsettia mosaic virus*. *Proc. XIth is on Virus Diseases in Ornamentals*. Ed. C.A. Chang. *Acta Horticulturae* 722: 321-325. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.40>
- Floistad E and Blystad DR. 1999. Two new hosts for *Poinsettia mosaic virus*. *Plant Disease* 83(4): 399. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30845606>
- Fulton RW and Fulton JL. 1980. Characterization of a tymo-like virus common in poinsettia. *Phytopathology* 70: 321-324. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n04\\_321.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n04_321.PDF)
- Guy P. 1985. New plant disease record in Tasmania: *Poinsettia mosaic virus*. *Australasian Plant Pathology* 14: 12-13. <http://koreascience.or.kr/article/JAKO200411922981818.page>
- Jacobo VO, Valdovinos PG, Ramírez RS y Hernández JC. 2015. Búsqueda de fuentes de resistencia al *Poinsettia mosaic virus* en plantas silvestres de nochebuena. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33(2): 219-231. <http://www.rmfm.smf.org.mx/ojs/index.php/RMF/article/view/15/16>
- Lebas BSM, Ochoa CFM, Elliott DR, Tang JZ and Alexander BJR. 2007. Detection of *Poinsettia mosaic virus* by RT-PCR in *Euphorbia* spp. In *New Zealand. Plant Disease* 91(1): 110. <https://doi.org/10.1094/PD-91-0110A>
- Ma XY, Cai JH, Li GX, Qin BX and Zhou XP. 2004. Molecular characterization of a distinct begomovirus infecting *Euphorbia pulcherrima* in China. *Journal Phytopathology* 152(4): 215-218. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00832>
- Ocampo OT, Ochoa MDL, Ramírez RS, Valdovinos PG y Nava DC. 2013. Primer reporte de *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Poinsettia mosaic virus* (PnMV) en nochebuena de sol (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82: 235-241. [http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/OCAMPO\\_OCAMPO.pdf](http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol82/OCAMPO_OCAMPO.pdf)
- Okano Y, Maejima K, Shiraishi T, Hashimoto M, Senshu H, Ozeki J, Takahashi S, Komatsu K, Yamaji Y and Namba S. 2010. Genetic heterogeneity found in the replicase gene of *Poinsettia mosaic virus* isolates. *Archives of Virology* 155: 1367- 1370. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0708-y>
- Ruiz GN, Mora AG, Rivas VP, Gongora CC, Loeza KE, Martínez OD, Ramírez VG, Gutiérrez EA y Álvarez RR. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 41-47. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2009000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100007)
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2019. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119](http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119) (consulta, mayo 2020).

United States Department of Agriculture (USDA). 2019. Floriculture Crops 2018. National Agricultural Statistics Service. 88 p. [https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays\\_Reports/reports/floran19.pdf](https://www.nass.usda.gov/Publications/Todays_Reports/reports/floran19.pdf)

Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. iForest 1(4): 122-125. <https://doi.org/10.3832/ifor0465-0010122>

# Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*

## Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum*

Luis Angel Morales-Mora, Petra Andrade-Hoyos, M. Angeles Valencia-de Ita, Omar Romero-Arenas\*, Centro de Agroecología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Pedro Zacachimalpa, 72960, Puebla, México; Hilda Victoria Silva-Rojas, Producción de Semillas, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México; Carlos A. Contreras-Paredes, Jardín Botánico Universitario, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Colonia San Manuel, 72590 Puebla, Puebla, México. \*Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com

Recibido: 26 de Mayo, 2020.

Aceptado: 14 de Agosto, 2020.

Morales-Mora LA, Andrade-Hoyos P, Valencia-de Ita MA, Romero-Arenas O, Silva-Rojas HV and Contreras-Paredes CA. 2020. Characterization of strawberry associated fungi and *in vitro* antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 434-449.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-7

Primera publicación DOI: 25 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 25, 2020.

**Resumen.** México es el tercer productor de fresa a nivel mundial, donde la producción de este cultivo es de importancia económica y generación de divisas en el país. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar morfológicamente los hongos asociados a enfermedades en un cultivo de la fresa, así como determinar la capacidad antagónica *in vitro* de la cepa T-H4 de

**Abstract.** Mexico is the third largest strawberry producer in the world, where the production of this crop is of economic importance and generates foreign exchange in the country. The objective of the present investigation was to identify and morphologically characterize the fungi associated with a commercial strawberry field, as well as to determine the *in vitro* antagonistic capacity of the T-H4 strain of *Trichoderma harzianum* in isolated fungi. Samples of plants from the strawberry crop with fungal symptoms were collected, sown in PDA medium and monosporic cultures were generated for their morphological characterization. The identified fungi and the strain T-H4 were compared in a dual way. Were identified and characterized three fungi associated with the fruit (*A. niger*, *Colletotrichum* sp. and *R. stolonifer*), three on leaves and stem (*Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. and *Alternaria* sp.) and two associated fungi on the root (*Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp.). The T-H4

*Trichoderma harzianum* con los hongos identificados. Se colectaron muestras de plantas del cultivo de fresa con síntomas de enfermedades fúngicas, se sembraron en medio PDA y se generaron cultivos monospóricos para su caracterización morfológica. Los hongos identificados y la cepa T-H4 se confrontaron mediante cultivos duales. Se identificaron tres hongos asociados al fruto (*A. niger*, *Colletotrichum* sp. y *R. stolonifer*), tres en hojas y tallo (*Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp.) y dos hongos asociados a la raíz (*Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp.). La cepa T-H4 presentó un nivel antagónico adecuado para *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Curvularia* sp., *in vitro*. Se sugiere realizar evaluaciones de control biológico con estos aislamientos en invernadero y a campo abierto, así como determinar su patogenicidad.

**Palabras clave:** Antagonismo, identificación taxonómica, crecimiento micelial, inhibición.

El cultivo de fresa (*Fragaria* × *ananassa*) está ampliamente distribuido en el mundo debido a su diversidad genotípica, naturaleza altamente heterocigótica y amplia gama de adaptaciones ambientales (Vikas-Kumar y Anil, 2019). En México, los estados de Jalisco, Tlaxcala, Michoacán, Baja California (Norte y Sur) y Guanajuato son los principales productores, pues aportan el 99% de la producción nacional. El estado de Puebla se posiciona en el noveno lugar de producción de fresa (SIAP, 2019). A pesar de su importancia, el cultivo presenta problemas fitosanitarios causados en su mayoría por hongos. Por mencionar algunos, se resaltan a *Fusarium solani* (Baiswar y Ngachan, 2018), *Pestalotiopsis* sp. (Morales-Mora *et al.*, 2019), *Curvularia inaequalis*, *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017), *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum*

strain presented an antagonistic level suitable for *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. and *Curvularia* sp., *in vitro*. It is suggested to carry out biological control evaluations with these isolates in the greenhouse and in the open field, as well as to determine their pathogenicity.

**Key words:** Antagonist, taxonomic identification, mycelial growth, inhibition.

The planting of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) is widely distributed in the world due to its genotypic diversity, its highly heterozygotic nature, and the wide range of environmental adaptations (Vikas-Kumar and Anil, 2019). In Mexico, the states of Jalisco, Tlaxcala, Michoacán, Baja California, Baja California Sur and Guanajuato are the main producers, providing 99% of the country's production. The state of Puebla is ninth in strawberry production (SIAP, 2019). Despite its importance, the crop presents phytosanitary problems, mostly caused by fungi, some of the most important of which include *Fusarium solani* (Baiswar and Ngachan, 2018), *Pestalotiopsis* sp. (Morales-Mora *et al.*, 2019), *Curvularia inaequalis*, *C. spicifera* (Ayoubi *et al.*, 2017), *Colletotrichum fragariae*, *C. acutatum* (Chung *et al.*, 2019), *Rhizopus stolonifer* (Oliveira *et al.*, 2019) and *Aspergillus niger* (Chiotta *et al.*, 2009), to mention a few. These phytopathogens, whether alone or in combination, cause 70% of the production to go to waste, leading to economic losses (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016). Chemical synthesis products have been used for decades to control these diseases (Gan and Wickings, 2017). However, their use is related to the creation of resistance and damages to both the environment and to human health (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019).



(Chung *et al.*, 2019), *Rhizopus stolonifer* (Oliveira *et al.*, 2019) y *Aspergillus niger* (Chiotta *et al.*, 2009). Estos fitopatógenos solos o en conjunto originan pérdidas del 70% de la producción ocasionado mermas económicas (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016). Los productos de síntesis química se han empleado por décadas para el control de estas enfermedades (Gan y Wickings, 2017). Sin embargo, el uso de éstos está relacionado con la generación de resistencia, daños al ambiente y la salud humana (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019). Bajo esta premisa, el control biológico se considera una de las prácticas eficientes y ecológicamente viables para el desarrollo de una agricultura sostenible (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

El género *Trichoderma* contiene a las especies antagonistas más relevantes, capaces de controlar un amplio número de hongos que afectan a las plantas de interés agrícola (Romero-Arenas *et al.*, 2017). El éxito y su uso en la agricultura se debe a sus mecanismos de acción como la competencia por espacio, micoparasitismo, antibiosis y la producción de compuestos volátiles (Nawrocka *et al.*, 2018; Hernández-Melchor *et al.*, 2019). En consecuencia, los objetivos de este trabajo fueron: 1) identificar y caracterizar morfológicamente a nivel género aislados fúngicos asociados a un cultivo de fresa de la variedad Camino Real en Atlixco Puebla, México y 2) determinar la capacidad antagonista y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial *in vitro* de la cepa T-H4 de *Trichoderma harzianum* contra los hongos aislados del cultivo de fresa.

**Zona del aislamiento.** Se tomaron muestras de tejido vegetal del cultivo de fresa variedad “Camino Real” en una parcela de 2,000 m<sup>2</sup>, de la comunidad de Xalpatlaco, Atlixco, Puebla (18° 56' 9.26" N y 98° 26' 16.56" O; 2,350 msnm), con antecedentes de alta incidencia de enfermedades fúngicas durante la producción primavera-verano 2018 y 2019.

Under this premise, biological control is considered an efficient and environmentally feasible practice for the development of a sustainable agriculture (Pérez-Torres *et al.*, 2018).

The genus *Trichoderma* contains the most relevant antagonistic species, capable of controlling a large number of fungi that affect plants of agricultural interest (Romero-Arenas *et al.*, 2017). Its success and use in agriculture are due to its action mechanisms, such as competition for space, mycoparasitism, antibiosis and the production of volatile compounds (Nawrocka *et al.*, 2018; Hernández-Melchor *et al.*, 2019). Consequently, the goals of the present work were 1) to identify and morphologically characterize fungal isolations related to a strawberry plantation of the Camino Real variety in Atlixco, Puebla, Mexico, at a genus level, and 2) to determine the antagonistic ability and the percentage of inhibition of radial growth *in vitro* of the strain T-H4 of *Trichoderma harzianum* against isolated fungi of the strawberry crop.

**Isolation zone.** Plant tissue samples were taken from the “Camino Real” strawberry crop variety in a 2,000 m<sup>2</sup> plot in the town of Xalpatlaco, Atlixco, Puebla (18°56'9.26" N y 98°26'16.56" W; 2,350 masl), with backgrounds of high incidence of fungal diseases during the 2018-2019 spring-summer production cycle. The sampling was directed, collecting samples with suspicious fungus symptoms; all samples were stored in plastic bags inside an ice cooler until they were transported to the laboratory.

**Isolation of fungi of plant tissues.** The samples were cut into 0.5 cm<sup>2</sup> sections of living and dead tissue. They were disinfested with 1.5% sodium hypochlorite and washed three times with distilled water, dried with sterile paper and finally planted in Petri dishes with a Potato Dextrose Agar (PDA)

El muestreo fue dirigido, colectando muestras con síntomas sospechosos de hongos; todas las muestras se mantuvieron en bolsas de plástico dentro de una hielera hasta su traslado al laboratorio.

**Aislamiento de hongos de tejidos vegetales.** Las muestras se cortaron en secciones de 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido vivo y muerto, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% y se lavaron tres veces con agua destilada, se secaron con papel estéril y finalmente se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a una temperatura de 25 ± 2 °C con luz ambiental por tres días. Las colonias desarrolladas fueron aisladas y purificadas mediante cultivos monospóricos o transferencia de puntas de hifa y se conservaron en una solución de glicerol al 20% a -84 °C.

**Caracterización morfológica y crecimiento micelial.** La identificación a nivel género de los hongos se realizó comparando las características morfológicas de la colonia (textura, tipo de micelio, color, tipo de hifas) y se tomaron medidas de forma y tamaño de estructuras anamórficas, las cuales se compararon con claves taxonómicas de identificación de Barnett y Hunter (1998) en un sistema de micro cultivo utilizando un microscopio óptico (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 1000x magnificaciones (Samson *et al.*, 2014). Para la evaluación de la tasa de desarrollo micelial, se colocaron fragmentos de 0.25 cm<sup>2</sup> de agar con micelio de 10 días de crecimiento de cada hongo caracterizado en cajas Petri con PDA, se incubaron bajo oscuridad a 27 °C por 10 días y se midió el diámetro micelial cada 12 h para estimar la velocidad de crecimiento (cm), la cual se calculó con la función de crecimiento lineal  $y=mx + b$  (donde 'y' es la distancia, 'x' es el tiempo y 'b' el factor constante) y se expresó en centímetros por día (cm d<sup>-1</sup>) (Zeravakis *et al.*, 2001). El diámetro fue medido con un vernier digital (CD-6

medium at a temperature of 25 ± 2 °C with ambient light for three days. The cultures developed were isolated and purified using monosporic cultures or the transfer of hyphae tips, and kept in a 20% glycerol solution at -84 °C.

**Morphological characterization and mycelial growth.** The identification of the fungi at a genus level was carried out by comparing the morphological characteristics of the culture (texture, type of mycelia, color, type of hyphae) and measurements of shape and size of anamorphic structures, which were compared using taxonomic identification keys by Barnett and Hunter (1998) in a microculture system using an optical microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000x (Samson *et al.*, 2014). For the evaluation of the mycelial development rate, 0.25 cm<sup>2</sup> pieces of agar were placed, along with 10-day old mycelia from each characterized fungus were placed in Petri dishes with PDA; they were incubated in the dark at 27 °C for 10 days, and the mycelial diameter was measured every 12 h to estimate the speed of growth (cm), which was calculated with the linear growth function  $y=mx + b$  (where 'y' is distance, 'x' is time and 'b' is the constant factor) and expressed in centimeters per day (cm d<sup>-1</sup>) (Zeravakis *et al.*, 2001). The diameter was measured using a digital caliper (CD-6 Mitutoyo), kept always in the same direction in triplicate, which was established at random for each repetition; only the average was used to calculate the development rate and the speed of mycelial growth per day.

**Antagonism of *T. harzianum* towards fungi isolated from strawberry crop.** The antagonism was evaluated with the strain T-H4 of *T. harzianum*, isolated from the root of *Persea americana*, the sequence of which was included in the National Center for Biological Information (NCBI) data

Mitutoyo), manteniendo siempre en la misma dirección por triplicado, la cual fue establecida al azar para cada repetición, se usó solo el promedio para calcular la tasa de desarrollo y la velocidad de crecimiento micelial por día.

**Antagonismo de *T. harzianum* ante hongos aislados del cultivo de fresa.** La evaluación del antagonismo se realizó con la cepa T-H4 de *T. harzianum*, aislada de la raíz de *Persea americana*, cuya secuencia se incluyó en la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso MK779064.1, mismo que está depositado en el laboratorio de Eco-Campus Valsequillo, del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). La técnica de cultivo dual se utilizó de acuerdo con Andrade-Hoyos *et al.* (2019) por triplicado para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento radial aplicando la fórmula  $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$  para cada ensayo evaluado por un lapso de siete a 10 días. Para complementar las evidencias del antagonismo, se comparó y clasificó cada ensayo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982); I) Crecimiento de *Trichoderma* sp. cubrió toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno, II) Crecimiento de *Trichoderma* sp. cubrió al menos 2/3 partes del medio, III) *Trichoderma* sp. y fitopatógeno crecieron ambos a la mitad de la superficie del medio, no se sobrepuso uno del otro, IV) Hongo patógeno creció al menos 2/3 partes del medio y resistió a la invasión de *Trichoderma* sp. y V) Crecimiento del patógeno cubrió toda la superficie del medio.

**Análisis estadísticos.** Los datos se analizaron con ANOVA (de dos vías) en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 25. La velocidad de crecimiento, tasa de desarrollo y PICR fueron las

base, with Access number MK779064.1, which is deposited in the Eco-Campus Valsequillo laboratory of the Science Institute, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). The dual culture technique was used following Andrade-Hoyos *et al.* (2019) in triplicate to determine the percentage of inhibition of radial growth applying the formula  $PICR = [(R1-R2/R1) \times 100]$  for each assay evaluated in a lapse of 7 to 10 days. To complete the evidence of the antagonism, each assay was compared and classified using the scale established by Bell *et al.* (1982); I) Growth of *Trichoderma* sp. covered the entire surface of the medium and reduced the pathogen culture, II) Growth of *Trichoderma* sp. covered at least 2/3 of the medium, III) *Trichoderma* sp. and phytopathogen both grew to cover half of the Surface of the medium, did not overgrow each other, IV) Pathogenic fungus grew to cover at least 2/3 of the medium and resisted the invasion by *Trichoderma* sp. and V) Growth of the pathogen covered the entire surface of the medium.

**Statistical analyses.** The data were analyzed with an ANOVA (two-way) in the IBM SPSS Statistics statistical package, version 25. Growth speed, rate of development and PICR were the response variables with three repetitions is a totally random statistical design. The experiment was carried out twice for validation. A comparison of averages was carried out using the Tukey-Kramer method with a level of likelihood of  $p \leq 0.05$ .

Thirty plant tissue samples were taken: 10 root samples, 10 leaf samples and 10 stem samples with the presence of mycelia, as well as 20 mature strawberry fruits with disease symptoms, in which two root-related fungi, three leaf and stem-related fungi and three strawberry fruit-related fungi were identified.

variables de respuestas con tres repeticiones en un diseño estadístico completamente al azar. El experimento se repitió dos veces para su validación. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad de  $p \leq 0.05$ .

Se obtuvieron 30 muestras de tejidos vegetales: 10 muestras de raíz, 10 muestras de hojas y 10 muestras de tallos con presencia de micelio, así como 20 frutos maduros de fresa con síntomas de enfermedad, de los cuales se identificaron dos hongos asociados a la raíz; tres hongos asociados a hojas y tallos; así como tres hongos asociados al fruto de fresa.

***Fusarium* sp.** Se aisló de la corona de la planta y se asoció a síntomas de marchitez. Las colonias fúngicas desarrollaron micelio aéreo abundante, de textura algodonosa y de color blanco. En el reverso, la colonia fue de color rosado y tiñó el agar de tonos entre púrpura y violeta (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). En cuanto a las características microscópicas se observaron macroconidios (Figura 1A) ligeramente curvos de uno a cinco septos (Gordon, 2017) y microconidios en forma ovoide, yacientes de monofálides laterales (Figura 1B), pueden formar masas (simulan cabezas) pero nunca cadenas. Las colonias crecieron a una velocidad de  $0.83 \pm 0.03$  cm d<sup>-1</sup> (Cuadro 1), rango que concuerda con el estudio de Groenewald *et al.* (2006).

***Rhizoctonia* sp.** El hongo se asoció a síntomas de marchitez y pudrición de raíz. La colonia en medio de cultivo PDA, se observó de color blanco al inicio y posteriormente de color marrón y café arena en su periferia, con textura aterciopelada y cerosa, con escaso micelio aéreo, y con una tasa de desarrollo de 1.05 cm por día (Cuadro 1). Se observaron hifas hialinas y septadas, algunas de tonalidades

***Fusarium* sp.** This was isolated from the crown of the plant and related to symptoms of wilting. The fungal cultures developed abundant white aerial mycelia with a cotton-like texture. In the reverse, the culture was pink and it stained the agar with a purple-to-violet color (Rentería-Martínez *et al.*, 2018). Regarding microscopic characteristics, slightly curved macroconidia were observed (Figure 1A) with one to five septa (Gordon, 2017), along with oval-shaped microconidia, are born from lateral monophyllids (Figure 1B); they can form masses (simulating heads) but never chains. The cultures grew at a speed of  $0.83 \pm 0.03$  cm d<sup>-1</sup> (Table 1), a range which agrees with the study by Groenewald *et al.* (2006).

***Rhizoctonia* sp.** This fungus was related to symptoms of wilting and root rot. The culture in the PDA culture medium initially presented a white color, and later, maroon and brown on the edges, with a velvetlike and waxy texture, with scarce aerial mycelia and a development rate of 1.05 cm per day (Table 1). Hyalin and septated hyphae were observed, some of which presented darker tones, with the formation of a right angle in some areas in which hyphae crossed (Figures 1 C and D), criteria to locate the fungus in the *Rhizoctonia* genus (González *et al.*, 2006).

***Pestalotiopsis* sp.** The fungus was isolated from areas with necrosis, mainly on leaves and stems; the leaves presented acervuli, mainly on the necrotic areas, and the *Pestalotiopsis* genus was characterized (Morales-Mora *et al.*, 2019). The cultures displayed rosetted growth and scarce aerial mycelia, a white to creamy color on the inside, and on the Surface of the culture medium, bright black acervuli developed (Figure 1E). Conidia, typical to the *Pestalotiopsis* genus were observed, similar to those reported by Maharachchikumbura *et al.*

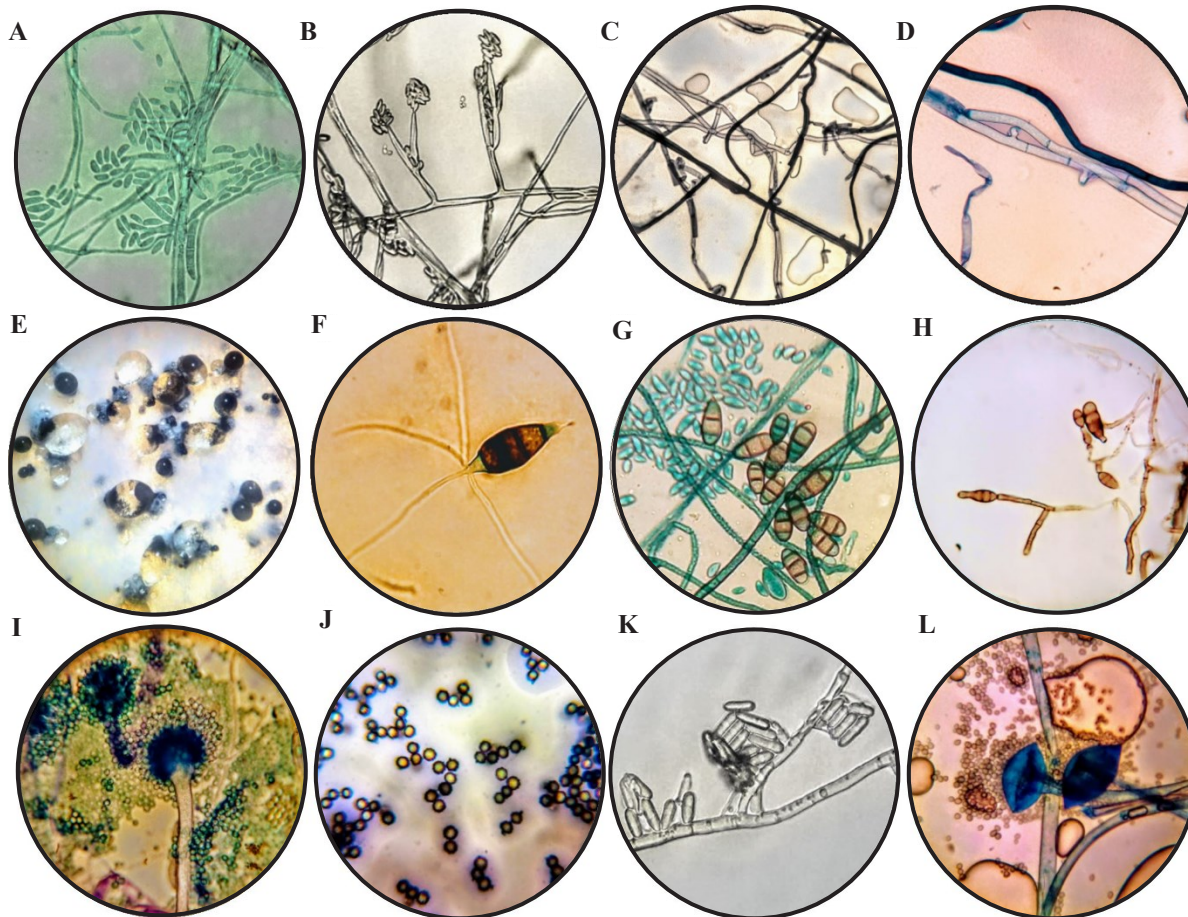


Figura 1. Características morfológicas, (A) Macroconidios septados (40 X) de *Fusarium* sp. teñidos con verde de malaquita; (B) Microconidios aglomerados en cabezas falsas sobre monofialides con presencia de septos (100 X) característicos de *Fusarium* sp.; (C) Micelio con ramificación y constricción en ángulo recto (40 X) de *Rhizoctonia* sp.; (D) Hifas septadas, con hifa naciente en un ángulo recto (100 X), de *Rhizoctonia* sp. teñidas con azul de metileno; (E) Conidiomas de color negro de *Pestalotiopsis* sp. en la superficie de la colonia; (F) Conidio (100 X) de *Pestalotiopsis* sp.; (G) Microconidios teñidos con verde de malaquita y presencia de conidios maduros (100 X) de *Curvularia* sp.; (H) Conidios ovoides a oblongos con celdillas (100 X) y sostenidos por hifas septadas de *Alternaria* sp.; (I) Conidióforo teñido con azul de metileno y métula hialina de *Aspergillus niger* (40 X); (J) Conidios globosos con crestas en su contorno (100 X) característicos de *Aspergillus niger*; (K) Conidios (100 X) de *Colletotrichum* sp.; (L) Esporangio maduro teñidos con azul de metileno de *Rhizopus stolonifer* (100 X).

Figure 1. Características morfológicas, (A) Macroconidios septados (40 X) de *Fusarium* sp. teñidos con verde de malaquita; (B) Microconidios aglomerados en cabezas falsas sobre monofialides con presencia de septos (100 X) característicos de *Fusarium* sp.; (C) Micelio con ramificación y constricción en ángulo recto (40 X) de *Rhizoctonia* sp.; (D) Hifas septadas, con hifa naciente en un ángulo recto (100 X), de *Rhizoctonia* sp. teñidas con azul de metileno; (E) Conidiomas de color negro de *Pestalotiopsis* sp. en la superficie de la colonia; (F) Conidio (100 X) de *Pestalotiopsis* sp.; (G) Microconidios teñidos con verde de malaquita y presencia de conidios maduros (100 X) de *Curvularia* sp.; (H) Conidios ovoides a oblongos con celdillas (100 X) y sostenidos por hifas septadas de *Alternaria* sp.; (I) Conidióforo teñido con azul de metileno y métula hialina de *Aspergillus niger* (40 X); (J) Conidios globosos con crestas en su contorno (100 X) característicos de *Aspergillus niger*; (K) Conidios (100 X) de *Colletotrichum* sp.; (L) Esporangio maduro teñidos con azul de metileno de *Rhizopus stolonifer* (100 X).

**Cuadro 1. Clase de antagonismo de acuerdo a Bell *et al.* (1982), porcentaje de inhibición de crecimiento radial y tasa de desarrollo de diferentes hongos asociados al cultivo de fresa en Atlixco, Puebla.**  
**Table 1. Type of antagonism according to Bell *et al.* (1982), percentage of inhibition of radial growth and rate of development of different fungi related to strawberry crops in Atlixco, Puebla.**

| Nombre                    | Tasa de desarrollo (mm/h) * | Velocidad de crecimiento (cm d <sup>-1</sup> ) * | PICR*                      | Clase Antagonismo |
|---------------------------|-----------------------------|--|----------------------------|-------------------|
| <i>Colletotrichum</i> sp. | 0.28 ± 0.007 <sup>c</sup>   | 0.75 ± 0.01 <sup>c</sup>                         | 87.56 ± 1.60 <sup>a</sup>  | II                |
| <i>Pestalotiopsis</i> sp. | 0.28 ± 0.027 <sup>c</sup>   | 0.94 ± 0.08 <sup>d</sup>                         | 71.11 ± 1.18 <sup>d</sup>  | II                |
| <i>Alternaria</i> sp.     | 0.18 ± 0.006 <sup>d</sup>   | 0.47 ± 0.01 <sup>f</sup>                         | 81.33 ± 0.77 <sup>c</sup>  | II                |
| <i>Rhizoctonia</i> sp.    | 0.46 ± 0.052 <sup>b</sup>   | 0.47 ± 0.02 <sup>f</sup>                         | 70.22 ± 5.46 <sup>de</sup> | III               |
| <i>A. niger</i>           | 0.51 ± 0.067 <sup>b</sup>   | 1.33 ± 0.07 <sup>c</sup>                         | 43.56 ± 6.73 <sup>f</sup>  | III               |
| <i>R. stolonifer</i>      | 0.56 ± 0.017 <sup>b</sup>   | 2.08 ± 0.28 <sup>a</sup>                         | 28 ± 12.72 <sup>f</sup>    | IV                |
| <i>Curvularia</i> sp.     | 0.31 ± 0.027 <sup>c</sup>   | 1.52 ± 0.10 <sup>b</sup>                         | 84 ± 0.77 <sup>b</sup>     | II                |
| <i>Fusarium</i> sp.       | 0.16 ± 0.013 <sup>d</sup>   | 0.83 ± 0.03 <sup>d</sup>                         | 63.65 ± 1.50 <sup>c</sup>  | III               |
| <i>T. harzianum</i>       | 1.67 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 1.86 ± 0.22 <sup>a</sup>                         |                            |                   |

\*Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos de acuerdo con Tukey-Kramer para  $p \leq 0.05$ . /

\*Different letters mean significant difference between treatments according to Tukey-Kramer for  $p \leq 0.05$ .

más oscuras, con formación de un ángulo recto en algunos sitios de entrecruzamiento de las hifas (Figuras 1 C y D), criterio para ubicar al hongo dentro del género *Rhizoctonia* (González *et al.*, 2006).

***Pestalotiopsis* sp.** El hongo se aisló de áreas con necrosis principalmente en hojas y tallos; en las hojas se observaron acérvulos, principalmente en las zonas necróticas y se caracterizó al género de *Pestalotiopsis* (Morales-Mora *et al.*, 2019). Las colonias mostraron crecimiento arrosado y micelio aéreo escaso, una coloración entre tonos blanco y crema, en su interior y en la superficie del medio de cultivo se desarrollaron acérvulos de color negro brillante (Figura 1E). Se observaron conidios característicos del género *Pestalotiopsis* similares a lo reportado por Maharachchikumbura *et al.* (2014), oscuros, ligeramente curvados, con seis células con la basal y la terminal hialina y, esta última puntiaguda con tres a cinco apéndices apicales hialinos, también elipsoidal (Figura 1F). Además, se observaron conidióforos hialinos, irregularmente ramificados, septados, lisos y cortos. Las colonias mostraron una tasa de desarrollo micelial promedio de  $0.28 \pm 0.027$  mm h<sup>-1</sup> (Cuadro 1).

(2014), dark, slightly curved, with six cells with the basal and the hyalin terminal, the latter of which was pointy with three to five apical hyaline appendages, as well as ellipsoidal (Figure 1F). In addition, hyalin conidiophores were observed, irregularly ramified, septated, smooth and short. The cultures presented an average mycelial development of  $0.28 \pm 0.027$  mm h<sup>-1</sup> (Table 1).

***Curvularia* sp.** The fungus was isolated from leaves with oval stains with light to dark chestnut tones, with yellowish edges. Some species of *Curvularia* are known to cause smut on the leaf and rotting of the strawberry (Ayoubi *et al.*, 2017). The fungal culture displayed abundant aerial mycelia, greenish black in color, and radial and expansive vegetative mycelia, dark brown in color and greyish white towards the edges of the reverse part of the culture. Septated hyphae, hyaline, light brown and ramified, 1.5-4 µm in width. Sympodial, spindle-shaped conidia with oval ends, with three or four divisions, gold-brown to pale brown in color, with divisions in the slightly hyaline ends, measuring between 10-25 µm in length and 7-10 µm in width. Hyalin conidiogenous cells, 7-12 µm in length by 5-10 µm

***Curvularia* sp.** El hongo se aisló de hojas con manchas ovaladas con tonos castaño claro hasta oscuros, con márgenes amarillentos. Algunas especies de *Curvularia* son conocidas por causar tizón en la hoja y podredumbre de la fresa (Ayoubi *et al.*, 2017). La colonia del hongo mostró abundante micelio aéreo, de color verde-negro y micelio vegetativo radial y expansivo de color café-oscuro y blanco grisáceo hacia la periferia de la parte reversa de la colonia. Hifas septadas, hialinas a marrón claro y ramificadas de 1.5-4  $\mu\text{m}$  de ancho. Conidios de forma simpodial, fusiformes y ovalados en los extremos, con tres o cuatro divisiones, de color café-dorado a café-pálido, con divisiones de los extremos ligeramente hialinas y de tamaño entre 10-25  $\mu\text{m}$  de largo y 7-10  $\mu\text{m}$  de ancho. Células conidiógenas hialinas de 7-12  $\mu\text{m}$  de largo por 5-10  $\mu\text{m}$  de ancho, proliferando de forma simpodial con desprendimiento de microconidios (Figura 1G). Esta caracterización concuerda con algunas especies de *Curvularia* descritas por Madrid *et al.* (2014). La velocidad de crecimiento promedio fue de  $1.52 \pm 0.10 \text{ cm d}^{-1}$  resultados similares a los reportados por Almaguer *et al.* (2013).

***Alternaria* sp.** El hongo se aisló de hojas con manchas foliares de forma irregular y de color café oscuro, con un contorno amarillento tenue; estos síntomas se asocian con infecciones de *Alternaria*. La colonia presentó una textura algodonosa, abundante y densa, de tonalidades entre blanco-gris y, posteriormente gris oscuro, como lo reportaron Mehmood *et al.* (2018) en el cultivo de fresa. En el anverso y reverso de la caja Petri, el agar se tiñó de un tono entre verde y negro. La cepa presentó hifas septadas, hialinas y conidios de forma ovoides a oblongos, septados transversal y longitudinalmente (Figura 1H), con tres hasta cinco divisiones en los conidios. Este hongo presentó una tasa de desarrollo micelial de  $0.18 \pm 0.006 \text{ mm h}^{-1}$  (Cuadro 1).

in width, proliferating in a sympodial shape with the detachment of conidia (Figure 1G). This characterization matches some *Curvularia* species described by Madrid *et al.* (2014). Average growth speed was  $1.52 \pm 0.10 \text{ cm d}^{-1}$ . Similar results were reported by Almaguer *et al.* (2013).

***Alternaria* sp.** The fungus was isolated from leaves with irregularly-shaped, dark brown foliar spots with a pale yellow edge, symptoms which are associated with *Alternaria* infections. The culture presented a dense, abundant cotton-like texture with tones between white and gray, and later dark gray, as reported by Mehmood *et al.* (2018) for strawberry crops. On both sides of the Petri dish, the agar acquired a color between Green and black. The strain presented septated hyphae, hyaline and oval to oblong-shaped conidia, septated transversally and longitudinally (Figure 1H), with three to five divisions in the conidia. This fungus presented a mycelial growth rate of  $0.18 \pm 0.006 \text{ mm h}^{-1}$  (Table 1).

***Aspergillus niger*.** The fungus was isolated from fruits with signs of “strawberry rot” and characterized as *A. niger* (Chiotta *et al.*, 2009). The culture presented mycelia with black scattered growth, with a dense, grainy texture. Microscopic characteristics observed included biserialated and radial conidial heads from aerial hyphae, de 5-7  $\mu\text{m}$  in diameter, with thick, smooth, hyaline walls, pale maroon in color, an almost spherical vesicle, 10  $\mu\text{m}$  in diameter, in which metulas develop, covering the entire surface. Its maroon globular conidia (Figure 1 I-J) are normally rugged with uneven crests and bulges (Krijgsheld *et al.*, 2013). Growth speed was of  $1.33 \pm 0.07 \text{ cm d}^{-1}$  (Table 1). Jørgensen *et al.* (2011) reported a vegetative growth of *A. niger* N402 in a maltose medium of 0.22 to 0.24  $\text{mm h}^{-1}$ .

***Aspergillus niger***. El hongo se aisló de frutos con signos de “podredumbre de la frutilla” y se caracterizó como *A. niger* (Chiotta *et al.*, 2009). La colonia presentó micelio con crecimiento disperso de color negro oscuro, con textura granular y densa. Dentro de las características microscópicas se observaron cabezas conidiales biseriadas y radiales procedentes de hifas aéreas de 5-7  $\mu\text{m}$  de diámetro, de paredes gruesas, lisas, hialinas y de color marrón pálido, vesícula casi esférica de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro de donde se desarrollaron métulas, ocupando toda la superficie. Sus conidios globosos de color marrón (Figura 1 I-J), normalmente rugosos con crestas irregulares y protuberancias (Krijghsheld *et al.*, 2013). La velocidad de crecimiento fue de  $1.33 \pm 0.07 \text{ cm d}^{-1}$  (Cuadro 1). Jørgensen *et al.* (2011) reportan un crecimiento vegetativo de *A. niger* N402 en medio maltosa de 0.22 a 0.24  $\text{mm h}^{-1}$ .

***Colletotrichum* sp.** El hongo se aisló de frutos que presentaron lesiones necróticas, hundidas, en forma de anillos concéntricos. Los principales hongos asociados a estos síntomas de enfermedad pertenecen al género *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*) (Howard *et al.*, 1992). Las colonias presentaron micelio de tonos naranja-pálido a naranja-salmón; así mismo desarrolló un micelio aéreo con tonos blancos hasta rosados. Además, se observó la formación de aglomeraciones sobre la superficie de la colonia, estas eran de un color naranja brillante y en su interior se observó el desarrollo de conidios. Dichas estructuras se describen como conidiomas de tipo acérvulo (Dai *et al.*, 2006). Específicamente, la colonia aislada desarrolló acérvulos epidermales, conidios de forma cilíndrica con extremos redondeados, los cuales se generaron directamente de las monofiáides provenientes de las hifas septadas (Figura 1K) (Freeman y Katan, 1997). Las colonias crecieron a velocidad de  $0.75 \pm 0.01 \text{ cm d}^{-1}$  (Cuadro 1), rango

***Colletotrichum* sp.** The fungus was isolated from fruits with sunken necrotic lesions in the shape of concentric rings. The main fungi related to these disease symptoms belong to the genus *Colletotrichum* (*C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*) (Howard *et al.*, 1992). The cultures presented pale orange to salmon orange mycelia, and developed an aerial mycelium with white to pink tones. In addition, bright orange agglomerations formed on the surface of the culture, and conidia developed inside. These structures are described as acervular conidiomas (Dai *et al.*, 2006). Specifically, the isolated culture developed epidermal acervula, cylindrical conidia with rounded ends, which were generated directly from the monophyllids from the septated hyphae (Figure 1K) (Freeman and Katan, 1997). The cultures grew at a speed of  $0.75 \pm 0.01 \text{ cm d}^{-1}$  (Table 1), which matches reports by Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001), who evaluated different isolations of *C. gloeosporioides*.

***Rhizopus stolonifer***. The fungus was isolated from rotting fruits. The culture presented white and later gray cultures, cottonlike in texture, with rapid growth and with aerial mycelia. Growth speed was  $2.08 \pm 0.28 \text{ cm d}^{-1}$  (Table 1); Hernández-Lauzardo *et al.* (2005) reported a higher growth rate ( $2.3 \text{ mm h}^{-1}$ ) of *R. stolonifer* during the four-day incubation period; higher results to those reported in the present investigation. Dark brown sporangiophora developed from a knot of rhizoids, spherical zygospores with thick, naked walls. This fungus is easily recognizable thanks to its hyaline or brownish side shoots, its numerous brown rhizoids and its black and lustrous sporangia (Figure 1L) (Farrera *et al.*, 2007).

**Antagonism of *T. harzianum* towards fungi isolated from strawberry crop.** Areas of



que concuerda con Gutiérrez-Alonso *et al.* (2001), quienes evaluaron distintos aislamientos de *C. gloeosporioides*.

***Rhizopus stolonifer*.** El hongo se aisló de frutos en descomposición. La colonia presentó colonias blancas y posteriormente gris, algodonosas con crecimiento rápido y con micelio aéreo. La velocidad de crecimiento fue de  $2.08 \pm 0.28$  cm d<sup>-1</sup> (Cuadro 1); Hernández-Lauzardo *et al.* (2005) reportaron una tasa de crecimiento superior (2.3 mm h<sup>-1</sup>) de *R. stolonifer* durante el período de incubación de cuatro días, resultados superiores a los reportados en esta investigación. Se observó el desarrollo de esporangióforos de color pardo oscuro que nacen de un nudo de rizoides, zigosporas esféricas de pared gruesa y desnuda. Este hongo se reconoce fácilmente por sus esporones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos (Figura 1L) (Farrera *et al.*, 2007).

**Antagonismo de *T. harzianum* ante hongos aislados del cultivo de fresa.** Se presentaron zonas de interacción entre *T. harzianum* y los hongos evaluados, donde se observó un parasitismo para todos los casos. La reducción en la tasa de crecimiento de los hongos en cultivos duales es un indicador de la capacidad antagónica de *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) varió en un rango de 28 a 87.6%, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los porcentajes de inhibición más altos se registraron en los confrontamientos con las cepas de *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp. (Cuadro 1). En el confrontamiento con *Alternaria* sp. se observó nulo crecimiento al momento del contacto con el antagonista. Este efecto se reportó contra *A. porri*, al confrontarse con *T. harzianum* en pruebas *in vitro*; que también mostró fuerte actividad micoparasítica y alta capacidad competitiva por espacio y nutrientes (Mazrou *et al.*, 2020).

interaction were observed between *T. harzianum* and the evaluated fungi, in which parasitism was displayed in all cases. The reduction in growth rate of the fungi in dual cultures is an indicator of the antagonistic ability of *Trichoderma* (Guigón-López *et al.*, 2010). The percentage of inhibition of radial growth (PIRG) varied in a range of 28 to 87.6%, with significant differences ( $p < 0.05$ ). The greatest percentages of inhibition were recorded in the confrontations with the strains of *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. and *Curvularia* sp. (Table 1). No growth was observed in the confrontation with *Alternaria* sp. at the moment of contact with the antagonist. This effect was reported against *A. porri* when confronting *T. harzianum* in *in vitro* tests, which also displayed a strong mycoparasitic activity and a high ability of competition for space and nutrients (Mazrou *et al.*, 2020).

When studying *T. harzianum*, Gaviria-Hernández *et al.* (2013) obtained antagonism values of 65% for *C. gloeosporioides* and 79% for *C. acutatum*, results below those reported in the present investigation. On the other hand, Benhamou and Chet (1993) indicated strong aggression from the antagonist *T. harzianum* and susceptibility of *R. solani* from the second day after inoculation. These results coincide with those by Hernández-Lauzardo *et al.* (2005), who, under similar conditions, obtained a PIRG of 58% when they evaluated *T. harzianum* A-34 against *R. solani*, results lower than those reported in the present investigation. However, Andrade-Hoyos *et al.* (2019), found a PIRG of 87.9% for *R. solani* using *T. harzianum*.

In another study, Guédez *et al.* (2009) compared the myceliar growth of *T. harzianum* with *R. stolonifer* (3.22 cm), *R. solani* (3.1 cm) and *A. niger* (1.72 cm) and obtained significant differences ( $p < 0.01$ ), similar results to those in the present investigation. Michel-Aceves *et al.* (2005) found that evaluating the antagonistic effect of native *Trichoderma* spp. isolations on the growth of *F.*

En un estudio realizado por Gaviria-Hernández *et al.* (2013), al estudiar *T. harzianum*, obtuvieron valores de antagonismo de 65% para *C. gloeosporioides* y 79% para *C. acutatum*, resultados inferiores a los reportados en la presente investigación. Por otro lado, Benhamou y Chet (1993) indicaron que existe gran agresividad por parte del antagonista *T. harzianum* y susceptibilidad de *R. solani* desde el segundo día después de la inoculación. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hernández-Lauzardo *et al.* (2005), quienes en condiciones similares obtuvieron un PICR de 58% cuando evaluaron a *T. harzianum* A-34 contra *R. solani*, resultados menores a los reportados en la presente investigación; sin embargo, Andrade-Hoyos *et al.* (2019), encontraron un PICR de 87.9% para *R. solani* utilizando *T. harzianum*.

En otra investigación Guédez *et al.* (2009), compararon el crecimiento micelial de *T. harzianum* con *R. stolonifer* (3.22 cm), *R. solani* (3.1 cm) y *A. niger* (1.72 cm) obteniendo diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), resultados similares a la presente investigación. Michel-Aceves *et al.* (2005) encontraron que al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma* spp., sobre el crecimiento de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* fueron de 47.6% y 73%, respectivamente, resultados similares a los del presente estudio. Por otro lado, en una investigación reciente de Andrade-Hoyos *et al.* (2019), mencionan que *T. harzianum* inhibe el crecimiento de micelio en *F. oxysporum* hasta 35%. La actividad antagónica de *T. harzianum* fue menor con *A. niger* y *R. stolonifer*, donde los porcentajes de inhibición fueron de  $43.56 \pm 6.73\%$  y  $28 \pm 12.72\%$ , respectivamente, valores que se clasifican en las clases III y IV (Figura 2) de acuerdo con la escala establecida por Bell *et al.* (1982). Corrêa *et al.* (2007), observaron un efecto antagónico nulo de cepas de *T. harzianum* y *T. aureoviride* frente a *Sclerotium rolfsii*. Esto podría indicar que los

*oxysporum* and *F. subglutinans* were 47.6% and 73%, respectively, similar results to those in the present investigation. On the other hand, a recent investigation by Andrade-Hoyos *et al.* (2019) mentions that *T. harzianum* inhibits the myceliar growth of *F. oxysporum* by up to 35%.

The antagonistic activity of *T. harzianum* was lower with *A. niger* and *R. stolonifer*, where the percentages of inhibition were  $43.56 \pm 6.73\%$  and  $28 \pm 12.72\%$ , respectively, values classified in classes III and IV (Figure 2), according to the scale obtained by Bell *et al.* (1982). Corrêa *et al.* (2007), observed a null antagonistic effect for *T. harzianum* and *T. aureoviride* strains when faced with *Sclerotium rolfsii*. This could indicate that the *S. rolfsii* isolations are able to release substances into the culture medium when they come in contact with the antagonist, which hinder its progress and/or detox the metabolites secreted by *Trichoderma*, as mentioned by Duarte-Leal *et al.* (2017), therefore these aspects must be investigated further for other fungi, as in the case of *A. niger* and *R. stolonifer*.

Reyes *et al.* (2008) noted that one of the significant characteristics of *Trichoderma* is its high growth speed. García-Espejo *et al.* (2016) mentioned that the way in which *T. harzianum* probably inhibits the growth of the pathogen is due to the production of inhibiting compounds that spread into the culture medium; antibiosis by the production of volatile and non-volatile metabolites, which include pyrones, isocyanates, peptics and trichocines; in addition, the production of extracellular diffusible enzymes such as pectinases, cutinases, glucanases and chitinases. In this sense, it is possible to notice that *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. and *Curvularia* sp. are more susceptible to the antagonistic fungus. Antagonism tests reflect the ability and genetic variability of the antagonist and the phytopathogen to resist antagonism, allowing the preliminary selection for

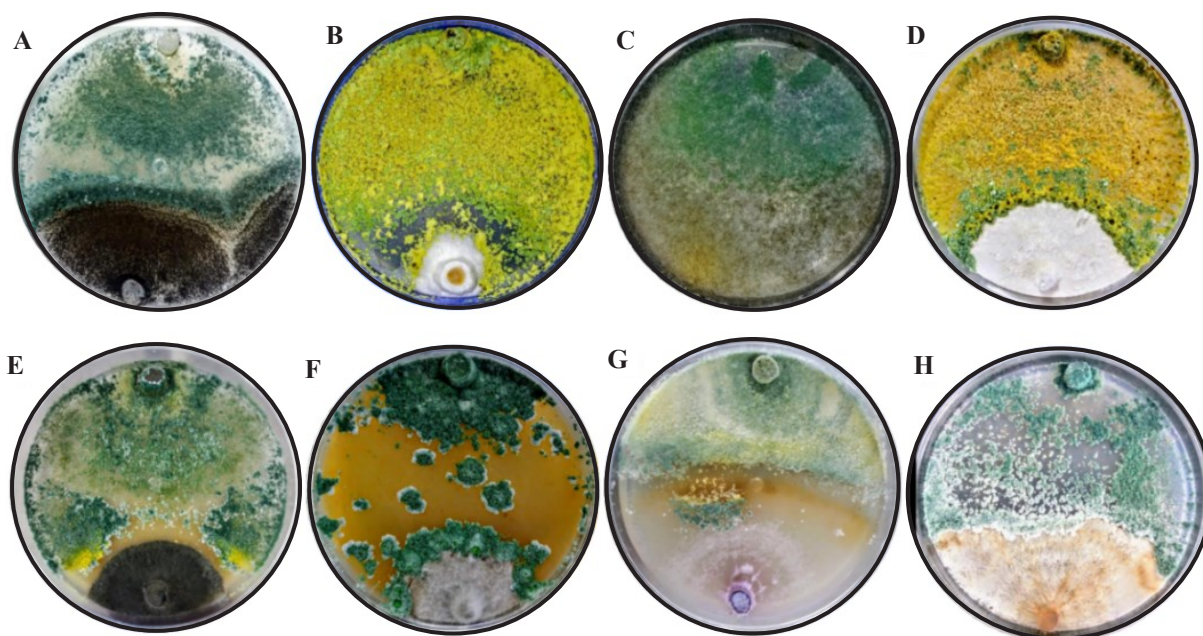


Figura 2. Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* en escala de Bell *et al.* (1982), (A) *Aspergillus niger*, (B) *Colletotrichum* sp., (C) *Rhizopus stolonifer*, (D) *Pestalotiopsis* sp., (E) *Curvularia* sp., (F) *Alternaria* sp., (G) *Fusarium* sp. y (H) *Rhizoctonia* sp.

Figure 2. Antagonismo de la cepa T-H4 de *T. harzianum* en escala de Bell *et al.* (1982), (A) *Aspergillus niger*, (B) *Colletotrichum* sp., (C) *Rhizopus stolonifer*, (D) *Pestalotiopsis* sp., (E) *Curvularia* sp., (F) *Alternaria* sp., (G) *Fusarium* sp. y (H) *Rhizoctonia* sp.

aislamientos de *S. rolfii* son capaces de liberar sustancias al medio de cultivo al entrar en contacto con el antagonista, que impiden el avance de este y/o desintoxican los metabolitos secretados por *Trichoderma*, como lo menciona Duarte-Leal *et al.* (2017), por lo que estos aspectos se deben continuar investigando para otros hongos, como es el caso de *A. niger* y *R. stolonifer*.

Reyes *et al.* (2008) notificaron que una de las características significativas de *Trichoderma* es su elevada velocidad de crecimiento. García-Espejo *et al.* (2016) mencionan que la forma en que *T. harzianum* probablemente inhibe el crecimiento del patógeno, es debido a la producción de compuestos inhibitorios que se difunden al medio de cultivo; antibiosis por producción de metabolitos volátiles y no volátiles entre los cuales se encuentran, pirones,

their evaluation under field conditions, as well as to complement and determine their biocontrolling activity (Fraire-Cordero *et al.*, 2003). In this area of study, potential perspectives open up, since the antagonistic microorganisms have been used as biocontrol agents in diseases in fresh fruit and crops with good results (Elad *et al.*, 1983).

The present investigation identified *Colletotrichum* sp., *A. niger* and *R. stolonifer* in relation to the strawberry fruit, *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. and *Alternaria* sp., present in leaves and stems, and *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium* sp. in relation to the root of the strawberry plant, of the Camino Real variety. The strain of *Trichoderma harzianum* (T-H4) displayed antagonistic activity *in vitro* against *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis*

isocianatos, pépticos y trichocinas; además, la producción de enzimas extracelulares difundibles tales como pectinasas, cutinasas, glucanasas y quitinasas. En este sentido, se logra observar que que *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. y *Curvularia* sp., son más susceptibles al hongo antagonista.

Las pruebas de antagonismo reflejan la capacidad y variabilidad genética del antagonista y del fitopatógeno para resistir el antagonismo, permitiendo la selección preliminar para ser evaluados en condiciones de campo, así como para complementar y determinar su capacidad biocontroladora (Fraire-Cordero *et al.*, 2003). En esta área de estudio se abren perspectivas potenciales, debido a que los microorganismos antagonistas se han utilizado durante años como agentes de biocontrol para diversas enfermedades en fruta fresca y para cultivos con buenos resultados (Elad *et al.*, 1983).

En la presente investigación se logró identificar a *Colletotrichum* sp., *A. niger* y *R. stolonifer* asociados al fruto de fresa, *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp., presentes en hojas y tallos y a *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp., asociados a la raíz del cultivo de fresa, variedad Camino Real. La cepa de *Trichoderma harzianum* (T-H4) mostró capacidad antagónica *in vitro* frente a *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Curvularia* sp., pero no consiguió inhibir el desarrollo de *R. stolonifer*.

## LITERATURA CITADA

- Almaguer M, Rojas TI, Dobal V, Batista A, Rives N and Aira MJ. 2013. Effect of temperature on growth and germination of conidia in *Curvularia* and *Bipolaris* species isolated from the air. *Aerobiología* 29: 3-20. <https://doi.org/10.1007/s10453-012-9257-z>
- Andrade-Hoyos P, Luna-Cruz A, Hernández EO, Gayosso EM, Valenzuela NL and Cureño HJB. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(6): 1259-1272. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i6.1326>
- Ayoubi N, Soleimani MJ, Zare R and Zafari D. 2017. First report of *Curvularia inaequalis* and *C. spicifera* causing leaf blight and fruit rot of strawberry in Iran. *Nova Hedwigia* 105: 75-85. [https://doi.org/10.1127/NOVA\\_HEDWIGIA/2017/0402](https://doi.org/10.1127/NOVA_HEDWIGIA/2017/0402)
- Baiswar P and Ngachan SV. 2018. First report of root and collar rot of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) caused by *Ceratobasidium* sp. AG-B (o) (*Binucleate Rhizoctonia*) in India. *Plant Disease* 102(5):1035. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1285-PDN>
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. 218 p.
- Bell DK, Wells HD and Markham CR. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Benhamou N and Chet I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. *Phytopathology* 83: 1062-1062. <https://doi.org/10.1094/phyto-83-1062>
- Corrêa S, Mello M, Ávila ZR, Minaré B, Raquel R and Gomes D. 2007. Cepas de *Trichoderma* spp., para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 11(1): 3-9. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116144001.pdf>
- Chiotta ML, Ponsone ML, Combina M, Torres AM and Chulze SN. 2009. *Aspergillus* section *nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 136(1): 137-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.013>
- Chung PC, Wu HY, Ariyawansa HA and Chung CL. 2019. First report of anthracnose crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum siamense* in Taiwan. *Plant Disease* 103(7): 1775. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2167-PDN>
- Dai FM, Ren XJ and Lu JP. 2006. First report of anthracnose fruit rot of strawberry caused by *Colletotrichum acutatum* in China. *Plant disease* 90(11): 1460-1460. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1460A>
- Duarte-Leal Y, Lamz-Piedra A and Martínez-Coca B. 2017. Antagonismo *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Revista de Protección Vegetal* 32(3): 1-11. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v32n3/rpv03317.pdf>
- Elad Y, Chet I, Boyle P and Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. On *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, scanning electron microscopy and fluorescence

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

- microscopy. *Phytopathology* 73(1): 85-88. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-85>
- Farrera PRE, Zambrano VAE and Ortiz MFA. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de la Facultad de Agronomía* 24(2): 269-281. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182007000200005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182007000200005)
- FAOSTAT. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/>
- Fraire-Cordero M, Yáñez-Morales M, Nieto-Ángel D and Vázquez-Gálvez G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 285-91. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221307.pdf>
- Freeman S and Katan T. 1997. Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology* 87: 516-521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.5.516>
- Gan H. and Wickings K. 2017. Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 246: 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.014>
- García-Espejo CN, Mamani-Mamani MM, Chávez-Lizárraga GA and Álvarez-Aliaga MT. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. *Journal of the Selva Andina Research Society* 7(1): 20-32. [http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n1/v7n1\\_a04.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n1/v7n1_a04.pdf)
- Gaviria-Hernández V, Patiño-Hoyos LF and Saldarriaga-Cardona A. 2013. Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria* 14(1): 67-75. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol14\\_num1\\_art:344](https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:344)
- González GV, Portal OSM and Rubio V. 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4(1): 55-79. <https://doi.org/10.5424/sjar/2006041-178>
- Gordon TR. 2017. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome. *The Annual Review of Phytopathology* 55: 23-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095919>
- Groenewald S, Van den Berg N, Marasas WF and Viljoen A. 2006. Biological, physiological and pathogenic variation in a genetically homogenous population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Australasian Plant Pathology* 35(4): 1-40. <https://doi.org/10.1071/AP06041>
- Guédez C, Cañizález L, Castillo C and Oliva R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp.). *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 29(1): 34-38. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S131525562009000100007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562009000100007&lng=es&tlng=es)
- Guigón-López C, Guerrero-Prieto V, Vargas-Albores F, Carvajal-Millán E, Ávila-Quezada GD, Bravo-Luna L, Rouco M, Lanzuise S, Woo S, Lorito M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(2): 87-96. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61218468002>
- Gutiérrez-Alonso JG, Nieto-Ángel D, Téliz-Ortiz D, Zavaleta-Mejía E, Vaquera-Huerta H, Martínez-Damián T and Delgado-Sánchez F. 2001. Características de crecimiento, germinación, esporulación y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de frutos de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 90-93. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61219113>
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez del Valle MG, Rodríguez-Ambríz SL, Corona-Rangel ML, Solano-Navarro A and Bósquez-Molina E. 2005. Potencial del quitosano en el control de las enfermedades postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 198-205.
- Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R and Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 35(1): 98-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Howard CM, Maas JL, Chandler CK and Albrechts EE. 1992. Anthracnose of Strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. *Plant Disease* 76: 976-981. <https://doi.org/10.1094/PD-76-0976>
- Jørgensen TR, Nielsen KF, Arentshorst M, Park J, Van den Hondel CA, Frisvad JC, Ram AF. 2011. Submerged co-nidiation and product formation by *Aspergillus niger* at low specific growth rates are affected in aerial developmental mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 77(15): 5270-5277. <https://doi.org/10.1128/AEM.00118-11>
- Krijgsheld P, Bleichrodt RJ, Veluw GJ, Wang F and Müller WG. 2013. Development of *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74: 1-29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Lafuente-Rincón DF, Barboza-Corona JE, Salcedo-Hernández R, Abraham-Juárez R, Valadez-Lira JA, Quistián-Martínez D, De la Fuente-Salcido NM. 2016. Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (its y ef-1 $\alpha$ ) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(1): 417-422. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/3/72.pdf>
- Madrid H, Cunha KC, Gené J, Dijksterhuis J, Cano J, Sutton DA, Guarro J and Crous PW. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia* 33: 48-60. <https://doi.org/10.3767/003158514X683538>
- Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J and Crous PW. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121-186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Mazrou YS, Makhlof AH, Elseehy MM, Awad MF and Hassan MM. 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(1): 4e. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-0207-8>
- Mehmood N, Riaz A, Naz F, Hassan I, Jaabeen N, Anwaar S and Gleason ML. 2018. First report of strawberry leaf spot caused by *Alternaria alternata* in Pakistan. *Plant Disease* 102(4): 820 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1464-PDN>

- Michel-Aceves AC, Otero-Sánchez MA, Darío R, Rebolledo-Domínguez O, Lezama-Gutiérrez R and Ariza-Flores R. 2005. *In vitro* mycoparasitic activity of *Trichoderma* spp. Against *Fusarium subglutinans* (Wollenweb and Reinke) PE Nelson, TA Toussoun, and Marasas, and *F. oxysporum* Schlechtend. Revista Mexicana de Fitopatología 23(3): 253-261. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073103350>
- Morales-Mora LA, Martínez SSJ, Andrade-Hoyos P, Valencia de Ita, MA, Silva-Rojas HV and Romero-Arenas O. 2019. First report of leaf spot and anthracnosis caused by *Pestalotiopsis* sp., on strawberry in Puebla, Mexico. Plant Disease 103(10): 2668 <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-1010-PDN>
- Nawrocka J, Szczech M and Malolepsza U. 2018. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. Plant Protection Science 54(1): 17-23. <https://doi.org/10.17221/126/2016-PPS>
- Oliveira J, Parisi MC, Baggio JS, Silva PPM, Paviani B, Spoto MHF and Gloria EM. 2019. Control of *Rhizopus stolonifer* in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethyl cellulose. International Journal of Food Microbiology 292: 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.014>
- Pérez-Torres E, Bernal-Cabrera A, Milanés-Virelles P, Sierra-Reyes Y, Leiva-Mora M, Marín-Guerra S and Monteagudo-Hernández O. 2018. Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. Bioagro 30(1): 17-26.
- Rentería-Martínez ME, Guerra-Camacho MA, Ochoa-Meza A, Moreno-Salazar SF, Varela-Romero A, Gutiérrez-Millán LE and Meza-Moller AC. 2018. Multilocus phylogenetic analysis of fungal complex associated with root rot watermelon in Sonora, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 36(2): 233-255. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1710-1>
- Reyes Y, Martínez B and Infante D. 2008. Evaluación de la actividad antagonista de trece aislamientos de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizoctonia* sp. Revista Protección Vegetal 23(2): 112-117.
- Romero-Arenas O, Amaro JL, Damián MA, Valencia de Ita MA, Rivera A and Huerta M. 2017. Bio-preparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. ITEA 113(4): 313-324. <https://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Samson RA, Visagie CM and Houbraken J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Mycology 78:141-173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2019. Atlas Agroalimentario 1080-2019.
- Vikas-Kumar S and Anil KG. 2019. Growth responses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants grown at different planting density using pvc pipe under protected cultivation. Bangladesh Journal of Botany 48(1): 1-7.
- Zeravakis G, Philippoussis A, Ioannidou S and Diamantopoulou P. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia microbiologica 46(3): 231e. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>

# Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*

## Bacterias antagónicas para control en bioespacio del manchado de jamaica (*Corynespora cassiicola*) en *Hibiscus sabdariffa*

**Alberto Patricio-Hernández**, <sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, <sup>2</sup>Laboratorio de Patometabolismo Microbiano, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México; **Santo Ángel Ortega-Acosta**, <sup>3</sup>Departamento de Agronomía, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Iguala de la Independencia, Guerrero; <sup>2</sup>**Arturo Ramírez-Peralta**; **Alejandro Ayala-Sánchez**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Zacatepec de Hidalgo, Morelos, México; <sup>3</sup>**Francisco Palemón-Alberto**, <sup>1</sup>**Erubiel Toledo-Hernández**, <sup>1</sup>**Yanet Romero-Ramírez**, <sup>1</sup>**Jeiry Toribio-Jiménez\***.

\*Autor para correspondencia: jeiryjimenez2014@gmail.com

Recibido: 05 de Junio, 2020.

Aceptado: 02 de Agosto, 2020.

Patricio-Hernández A, Ortega-Acosta SA, Ramírez-Peralta A, Ayala-Sánchez A, Palemón-Alberto F, Toledo-Hernández E, Romero-Ramírez Y and Toribio-Jiménez J. 2020. Antagonistic bacteria for biospace control of roselle spot (*Corynespora cassiicola*) of *Hibiscus sabdariffa*. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 450-462.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2006-1

Primera publicación DOI: 25 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 25, 2020.

**Resumen.** En años recientes, el manchado de la jamaica inducido por *Corynespora cassiicola* amenaza la producción de cálices. El objetivo fue determinar si algunas cepas bacterianas inhiben el desarrollo de *C. cassiicola* *in vitro* y bajo condiciones de bioespacio. La inhibición del desarrollo fue por confrontación dual de las bacterias: alimentos

**Abstract.** In recent years, *Corynespora cassiicola* induced spotted of roselle threatens calyx production. The objective was to determine if some bacterial strains inhibit the development of *C. cassiicola* *in vitro* and under biospace conditions. The inhibition of development was due to the dual confrontation of the bacteria: food (20), amphibian skin (41), tailings (22), air (seven) and rhizosphere (10) against the fungus. Plants of jamaican “Creole” variety were sown and artificially inoculated with *C. cassiicola*. From the beginning of symptoms of the disease, the selected bacterial strains with the highest percentage of inhibition were inoculated. AUDPC was evaluated. Only seven strains inhibited the development of the fungus *in vitro* from 62.7 to 100%: *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 and M10-10), *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia marcescens* (M13ACD), *S. liquefaciens*

(20), piel de anfibios (41), jales mineros (22), aire (siete) y rizosfera (10) contra el hongo. Se sembraron plantas de jamaica variedad “criolla” y se inocularon artificialmente con *C. cassiicola*, a partir del inicio de síntomas de la enfermedad se inocularon las cepas bacterianas seleccionadas con mayor porcentaje de inhibición. Se evaluó la ABCPE. Solo siete cepas inhibieron del 62.7 al 100% el desarrollo del hongo *in vitro*: *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia marcescens* (M13ACD), *S. liquefaciens* (M8ACD) y *Acinetobacter* sp. (5H2). En relación a la severidad en hojas las cepas M10-1 y M10-10 redujeron el ABCPE en un 9.5 y 12.6%, respectivamente, seguido de NF21 (14.5 de ABCPE), el control registró los mayores niveles (45.7 de ABCPE). Para la severidad en cálices, los análisis del ABCPE de todas las cepas ejercieron control al reducir niveles de severidad (17.1-8.6 ABCPE).

**Palabras clave:** control biológico, bacterias, hongo fitopatógeno, *in vitro*

En México, la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), es un cultivo de importancia económica, se cultiva para fines de consumo nacional y exportación; el estado de Guerrero es el principal productor con 14,294 hectáreas cultivadas que representan aproximadamente el 70% de la superficie nacional (SIAP, 2019).

En años recientes la enfermedad conocida como manchado de la jamaica causada por el hongo *Corynespora cassiicola*, es capaz de alcanzar una incidencia del 100% y pérdidas totales del cultivo (Ortega-Acosta *et al.*, 2015; Ortega-Acosta *et al.*, 2019), con valores de severidad en hojas y cálices superiores al 50%, con estos niveles de severidad el producto comercial (cálices) generalmente son

(M8ACD) and *Acinetobacter* sp. (5H2). Regarding leaf severity, the M10-1 and M10-10 strains reduced AUDPC by 9.5 and 12.6%, respectively, followed by NF21 (AUDPC 14.5), the control registered the highest levels (AUDPC 45.7). For the severity in calyces, the AUDPC analyzes of all the strains exercised control by reducing severity levels (17.1-8.6 AUDPC).

**Key words:** biological control, bacterial, phytopathogenic fungus, *in vitro*

In Mexico, roselle (*Hibiscus sabdariffa*) is an economically important crop; it is cultivated for domestic consumption and for export. The state of Guerrero is the major roselle producer with 14,294 hectares cultivated, which represent approximately 70% of the national area (SIAP, 2019).

In recent years, the disease known as spotted of roselle, induced by the fungus *Corynespora cassiicola*, has reached 100% incidence and caused the total loss of the crop (Ortega-Acosta *et al.*, 2015; Ortega-Acosta *et al.*, 2019) with severity values higher than 50% for leaves and calyces; at this level of severity, the commercial product (calyces) is usually discarded thus causing economic losses to the producers (Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Ortega-Acosta *et al.*, 2020a). In addition to roselle, *C. cassiicola* causes severe diseases in diverse crops such as cotton (*Gossypium hirsutum*), soybean (*Glycine max*), rubber tree (*Hevea brasiliensis*), among others, and, worldwide, it has been isolated from more than 530 plant species (Nghia *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2015).

Currently, conventional and alternative agrochemicals are used for controlling *C. cassiicola* (Vawdrey *et al.*, 2008; Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020). However, despite their effectiveness, the frequent use of these



desechados causando así pérdidas económicas a los productores (Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Ortega-Acosta *et al.*, 2020a). Además de la jamaica, *C. cassiicola* causa enfermedades severas en diversos cultivos como algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), entre otros y a nivel mundial se ha aislado en más de 530 especies de plantas (Nghia *et al.*, 2008; Dixon *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2015).

Actualmente el control de *C. cassiicola* ha sido con agroquímicos convencionales y alternativos (Vawdrey *et al.*, 2008; Ortega-Acosta *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2020); sin embargo, a pesar de su eficacia, el uso frecuente de estas sustancias puede causar serios problemas ambientales y de salud (Hahn 2014; Ghosal y Hati, 2019; Weber y Hahn, 2019). Es por ello, una de las alternativas para controlar de manera sustentable las enfermedades en plantas es el control biológico con microorganismos antagonistas, con la finalidad de limitar el desarrollo de los patógenos o reducir la severidad de los daños en el cultivo (Blakeman y Fokkema, 1982; Köhl *et al.*, 2019).

En estudios previos de control biológico para disminuir los daños de las enfermedades causadas por *C. cassiicola*, se han evaluado bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*, en cultivos de pepino, jitomate y árbol de caucho (Romeiro *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Manju *et al.*, 2019, Köhl *et al.*, 2019). No se encontraron estudios sobre el control biológico de la enfermedad del manchado de la jamaica causada por el hongo. Por lo que, los objetivos fueron determinar la capacidad de cepas bacterianas para inhibir el desarrollo de *C. cassiicola in vitro* y evaluar su control en hojas y cálices en condiciones de bioespacio.

Se utilizaron 100 cepas bacterianas del biobanco del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad

substances can cause serious environment and health issues (Hahn 2014; Ghosal and Hati, 2019; Weber and Hahn, 2019). For this reason, one of the alternatives for sustainably controlling plant diseases is the biological control with antagonistic microorganisms in order to limit the development of pathogens or reduce the severity of crop damages (Blakeman and Fokkema, 1982; Köhl *et al.*, 2019).

In previous studies about biological control to reduce disease damages caused by *C. cassiicola*, bacteria such as *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* have been evaluated in cucumber, tomato and rubber trees (Romeiro *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2010; Manju *et al.*, 2019, Köhl *et al.*, 2019). No studies about the use of biological controls for spotted of roselle caused by the fungus were found. Therefore, the objectives of this study were to determine the ability of bacterial strains to inhibit *C. cassiicola* growth *in vitro* and evaluate their control in leaves and calyces under biospace conditions.

For the study, 100 bacterial strains from the biobank of the Molecular Microbiology and Environment Biotechnology Laboratory, Autonomous University of Guerrero, were used; the strains were isolated from diverse environments: food (20), amphibian skin (41), tailings (22), air (7) and rhizosphere (10). For *in vitro* studies, the *C. cassiicola* CCHFR strain (GenBank: KM207768), reported by Ortega-Acosta *et al.* (2015), was used. All the bacterial strains were used in antagonistic *in vitro* tests based on dual confrontations to select only those able to inhibit the growth of the CCHFR strain; the bacteria were identified through micro- and macroscopic morphology using the Vitek2® automated system (Vargas *et al.*, 2005) for their subsequent evaluation in biological control essays of spotted of roselle under biospace conditions.

The essay to determine the inhibition percent of mycelial development *in vitro* consisted of a

Autónoma de Guerrero, aisladas de diversos ambientes; alimentos (20), piel de anfibios (41), jales mineros (22), aire (siete) y rizosfera (10). Para los estudios *in vitro* se usó la cepa *C. cassiicola* CCHFR (GenBank: KM207768) reportada por Ortega-Acosta *et al.* (2015). Todas las cepas bacterianas se emplearon para las pruebas antagónicas *in vitro* basadas en confrontaciones duales con el fin de seleccionar solo aquellas capaces de inhibir el crecimiento de la cepa CCHFR, la identificación bacteriana se hizo por morfología micro y macroscópica, usando el sistema automatizado Vitek2® (Vargas *et al.*, 2005), para su posterior evaluación en ensayos de control biológico del manchado de la jamaica en bioespacio.

El ensayo para determinar el porcentaje de inhibición del desarrollo micelial *in vitro*, consistió de un fragmento micelial de 1 cm<sup>2</sup> obtenido de un cultivo de siete días de *C. cassiicola* (CCHFR), colocado en el centro de una caja de Petri con agar PDA (Agar Papa Dextrosa, Difco®), enseguida se inocularon las bacterias, impregnando discos de papel filtro estéril de 6 mm con 20 µL de suspensión bacteriana a una densidad de 1×10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y se colocaron en cada punto cardinal a una distancia de 2.5 cm del hongo (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011), incubadas a 25±2 °C por 21 días, como control negativo se utilizó discos con agua destilada estéril. Los ensayos por triplicado se aplicaron solo a las cepas con una inhibición >50%. Se fotografió cada ensayo y se utilizó el software ImageJ v.1.8.0 para obtener el área total del desarrollo micelial (Cuervo-Parral *et al.*, 2011).

El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la siguiente formula:

$$\text{Inhibición de crecimiento (\%)} = \left( \frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \times 100$$

mycelial fragment 1 cm<sup>2</sup> in size obtained from a seven-day culture of *C. cassiicola* (CCHFR), which was placed in the middle of a Petri dish containing agar PDA culture medium (Potato- Dextrose-Agar Difco®); then, the bacteria were inoculated using 6 mm sterile filter paper disks impregnated with 20 µL of a bacterial suspension at a density of 1×10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, placed at each cardinal point at a distance of 2.5 cm from the fungus (Petatán-Sagahón *et al.*, 2011) and incubated at 25±2 °C for 21 days; disks with sterile distilled water were used as the negative control. The essays in triplicate were applied only to strains with >50% inhibition. Photographs of each essay were taken, and the total area of the mycelial development was obtained using the ImageJ v.1.8.0 software (Cuervo-Parral *et al.*, 2011).

The percent inhibition of the mycelial growth was calculated using the following formula:

$$\text{Growth inhibition (\%)} = \left( \frac{D_c - D_t}{D_c} \right) \times 100$$

Where *D<sub>c</sub>*: Mycelial growth of the control plates, and *D<sub>t</sub>*: Mycelial growth in the Petri dishes treated (Durairaj *et al.*, 2018).

Since in a preliminary essay under biospace conditions, the CCHFR strain had a low level of pathogenicity (data not shown), a sampling in the field was conducted at El Pericón, municipality of Tecoaapa, Guerrero, where roselle leaves with spotted of roselle symptoms were collected in September 2019, following the methodology described by Ortega-Acosta *et al.* (2015); a pathogenically active *C. cassiicola* strain called CCPER4 was isolated and identified.

The vegetal material used consisted of three-month-old roselle plants of a “Creole” variety, which

Donde *Dc*: Crecimiento micelial de las placas control y *Dt*: Crecimiento micelial de las cajas de Petri tratadas (Durairaj *et al.*, 2018).

En un ensayo preliminar en bioespacio la cepa CCHFR presentó bajo nivel de patogenicidad (datos no mostrados), por lo anterior se realizó un muestreo en campo en el Pericón, Municipio de Tecoaapa, Guerrero, para lo cual se recolectaron hojas de jamaica con síntomas del manchado durante septiembre de 2019, siguiendo la metodología descrita por Ortega-Acosta *et al.* (2015); se aisló e identificó una cepa de *C. cassiicola* patogénicamente activa denominada CCPER4.

El material vegetal utilizado consistió en plantas de jamaica de la variedad “criolla” con tres meses de desarrollo, la siembra se hizo en macetas de polietileno (15×25 cm), como sustrato se usó una mezcla de suelo y composta (1:1). Para la fertilización se utilizó la fórmula 45-30-20 de NPK, con dos aplicaciones (Alejo, 2017). No se realizaron aplicaciones de productos químicos para el control de plagas y enfermedades. Para evaluar el control biológico de *C. cassiicola* (CCPER4) se utilizaron únicamente las siete bacterias con inhibición del desarrollo micelial  $\geq 50\%$ , cada cepa fue considerada como un tratamiento con seis repeticiones, cada repetición consistió de cuatro macetas con plantas de jamaica (2 plantas/maceta), alojadas bajo un diseño completamente al azar, la unidad experimental fueron las dos macetas centrales/repetición, para esto se preparó e inoculó por aspersión una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> sobre planta de tres meses de edad con un atomizador manual a punto de goteo. Después de 24 h se preparó e inoculó una suspensión de  $2 \times 10^5$  conidios mL<sup>-1</sup> de *C. cassiicola* (CCPER4) con un atomizador manual, todas las plantas fueron cubiertas con bolsas de polietileno transparente durante 72 h. Para el testigo positivo se asperjaron plantas de jamaica únicamente con conidios de *C. cassiicola* (CCPER4).

were sown in polyethylene pots (15×25 cm) using a mixture of soil and compost (1:1) as substrate. The plants were fertilized twice using a 45-30-20 of NPK formulation (Alejo, 2017). No chemical products were applied for controlling pests and diseases. To evaluate the biological control of *C. cassiicola* (CCPER4), only the seven bacteria which inhibited  $\geq 50\%$  mycelial development were used; each strain was considered as a treatment with six replications; each replication consisted of four pots with roselle plants (2 plants/pot) arranged in a completely randomized design, and the experiment unit consisted of two central/replication pots. For inoculation, a bacterial suspension of  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> was prepared and sprayed on three-month-old plants using a manual sprayer on the point of dripping. After 24 h, a suspension of  $2 \times 10^5$  conidia mL<sup>-1</sup> of *C. cassiicola* (CCPER4) was prepared and inoculated using a manual sprayer; all the plants were covered with transparent polyethylene bags for 72 h. For the positive control, roselle plants were sprayed only with *C. cassiicola* (CCPER4) conidia.

To estimate the severity of the disease induced by *C. cassiicola* (CCPER4) in each treatment, the plants were stratified in three levels (low, intermediate and high) (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005), and then four leaves or calyces per stratum were evaluated. To estimate the extent of disease severity, two diagrammatic scales were used for leaves: 0=0, 1=(>0-2 to 4), 2=(>4-7 to 12), 3=(>12-19 to 29), 4=(>29-42 to 57) and 5=(>57-70 to  $\leq 100$ ), and for calyces: 0=0, 1=(>0-3 to 5), 2=(>5-10 to 18), 3=(>18-30 to 46), 4=(>46-63 to 77) and 5=(>77-87 to  $\leq 100$ ) (Ortega-Acosta *et al.*, 2016). The estimation of the severity was evaluated from October to November, for leaves, and from November to December for calyces. Four evaluations were made to leaves and calyces at six-day intervals, according to the phenological stage. The temperature and relative humidity within the

Las estimaciones de severidad de la enfermedad inducida por *C. cassiicola* (CCPER4) sobre cada tratamiento se realizaron mediante la estratificación de las plantas en tres niveles (bajo, medio y alto) (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005), de donde se evaluaron cuatro hojas o cálices por cada estrato. Las estimaciones de la severidad se realizaron con dos escalas diagramáticas que fueron para hojas: 0=0, 1=(>0-2 a 4), 2=(>4-7 a 12), 3=(>12-19 a 29), 4=(>29-42 a 57) y 5=(>57-70 a ≤100) y para cálices: 0=0, 1=(>0-3 a 5), 2=(>5-10 a 18), 3=(>18-30 a 46), 4=(>46-63 a 77) y 5=(>77-87 a ≤100) (Ortega-Acosta *et al.*, 2016). La estimación de la severidad fue evaluada durante octubre a noviembre para hojas y de noviembre a diciembre para cálices. En hojas y cálices se registraron cuatro evaluaciones a intervalos de seis días, según la etapa fenológica. La temperatura y humedad relativa dentro del bioespacio fue estimada con un higrotermógrafo digital Extech® RHT10.

Los datos obtenidos a partir de las pruebas de antagonismo *in vitro* fueron sometidos a un análisis de varianza y separación de medias (Tukey,  $p=0.01$ ). Con los datos estimados de severidad de hojas y cálices de jamaica, se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) por cada tratamiento, con base en el método descrito por Campbell y Madden (1990), posteriormente se realizó un análisis de varianza y separación de medias (Tukey,  $p=0.01$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS v 9.4.

De todas las 100 cepas evaluadas, siete se seleccionaron por obtener  $\geq 50\%$  de inhibición de *C. cassiicola* (CCHFR). De éstas, la cepa *Serratia marcescens* (M13ACD) mostró un 100% de inhibición (Figura 1, Cuadro 1), y las cepas de *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia liquefaciens* (M8ACD) y *Acinetobacter* sp. (5H2), mostraron diferencias estadísticas

bioespacio were estimated using an Extech® RHT10 digital hygromograph.

The data obtained from the antagonism *in vitro* tests were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and a separation of means (Tukey,  $p=0.01$ ). Using the estimated data of severity in roselle leaves and calyces, the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC) per treatment was estimated based on the method described by Campbell and Madden (1990), followed by an analysis of variance and a separation of means (Tukey,  $p=0.01$ ). Statistical analyses were performed using SAS v 9.4 statistical software.

Of the 100 strains evaluated, seven that inhibited  $\geq 50\%$  of *C. cassiicola* (CCHFR) were selected. Of these, the strain *Serratia marcescens* (M13ACD) showed 100% inhibition (Figure 1, Table 1), and the strains of *Acinetobacter lwoffii* (A5), *Klebsiella pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *Sphingomonas paucimobilis* (NF21), *Serratia liquefaciens* (M8ACD) and *Acinetobacter* sp. (5H2) had statistical differences compared to the control; these strains were selected for control essays under biospace conditions (Table 1).

The CCPER4 strain produced dense, compact and black-greyish mycelium, and straight-to-curve conidia with short light-brown pseudosepta that measured 57.0-308.2 x 10-20  $\mu\text{m}$  (length x width, respectively), which are distinctive characteristics of *C. cassiicola* (Qi *et al.*, 2011; Ortega-Acosta *et al.*, 2020b).

The artificial inoculation of *C. cassiicola* (CCPER4) induced the spotted of roselle disease under biospace conditions. The estimated severity values of AUDPC for spots on roselle leaves and calyces allowed to determine an effect on disease reduction in all the bacterial treatments compared to the control treatment.

However, the effect was differential on leaves depending on the inoculated bacteria ( $p=0.01$ ),

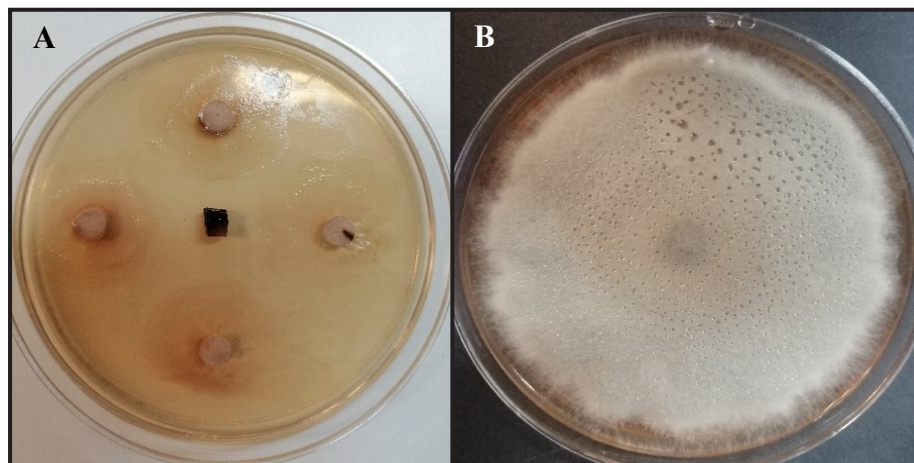


Figura 1. Actividad antagonista en medio PDA después de 21 días de cultivo a  $27\pm 2$  °C. A= cepa *Serratia marcescens* (M13A-CD) sobre *C. cassiicola*. B= Tratamiento control (*C. cassiicola*- CCHFR).

Figure 1. Antagonistic activity in PDA culture medium after 21 days in a culture medium at  $27\pm 2$  °C. A= *Serratia marcescens* strain (M13ACD) in *C. cassiicola*. B= Control treatment (*C. cassiicola*- CCHFR).

Cuadro 1. Origen e identificación de cepas con capacidad antagonista  $\geq 50\%$  de inhibición *in vitro* contra *C. cassiicola* y su efecto en la reducción de la severidad del manchado de hojas y cálices de jamaica en condiciones de bioespacio en Iguala, Guerrero, México.

Table 1. Origin and identification of strains with  $\geq 50\%$  antagonistic capacity of inhibition *in vitro* against *C. cassiicola* and their effect on severity reduction of spots on roselle leaves and calyces under biospace conditions in Iguala, Guerrero, Mexico.

| Cepa                 | Origen           | Identificación <sup>w</sup> | Inhibición (%)<br><i>in vitro</i> | Severidad en<br>hojas (ABCPE <sup>z</sup> ) | Severidad en<br>cálices (ABCPE) |
|----------------------|------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 5H2                  | Aire             | <i>Acinetobacter</i> sp.    | 69.4d <sup>y</sup>                | 26.9bc                                      | 13.6b                           |
| A5                   | Aire             | <i>A. lwoffii</i>           | 62.7e                             | 18.8bcd                                     | 9.1b                            |
| M10-1                | Jales mineros    | <i>K. pneumoniae</i>        | 66.6ed                            | 9.5d                                        | 15.0b                           |
| M10-10               | Jales mineros    | <i>K. pneumoniae</i>        | 75.2c                             | 12.6d                                       | 13.7b                           |
| NF21                 | Jales mineros    | <i>S. paucimobilis</i>      | 80.9b                             | 14.5cd                                      | 13.1b                           |
| M13ACD               | Piel de anfibios | <i>S. marcescens</i>        | 100a                              | 30.7b                                       | 17.1b                           |
| M8ACD                | Piel de anfibios | <i>S. liquefaciens</i>      | 68.0d                             | 30.9b                                       | 8.6b                            |
| Control <sup>x</sup> | ---              | ---                         | ---                               | 45.7a                                       | 42.1a                           |

<sup>w</sup> Género y especie identificado. / Genus and species identified.

<sup>x</sup> Tratamiento control positivo en ensayos en condiciones de bioespacio. / Positive control treatment in trials under biospace conditions.

<sup>y</sup> Medias en la misma columna seguidas de la misma letra, no son significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey (\*=  $P > 0.01$ ). / Means in the same column followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's test (\*=  $P > 0.01$ ).

<sup>z</sup> Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad. / Area Under the Disease Progress Curve.

respecto al control; estas cepas fueron seleccionadas para realizar los ensayos de control en condiciones de bioespacio (Cuadro 1).

La cepa CCPER4 mostró micelio denso y compacto, de color negro grisáceo, con conidios rectos a curvos, con pseudoseptos, cortos, de coloración marrón claro, con dimensiones de 57.0-308.2 x 10-20 µm (largo x ancho, respectivamente), características distintivas de *C. cassiicola* (Qi *et al.*, 2011; Ortega-Acosta *et al.*, 2020b).

Con la inoculación artificial de *C. cassiicola* (CCPER4) se logró inducir la enfermedad del manchado de la jamaica en condiciones de bioespacio. Los valores de severidad estimados del ABCPE del manchado en hojas y cálices de jamaica, permitieron determinar un efecto en la disminución de la enfermedad en todos los tratamientos bacterianos evaluados con respecto al tratamiento control.

Sin embargo, el efecto fue diferencial en hojas según la especie de bacteria inoculada ( $p=0.01$ ), en cambio en cálices, todas mostraron el mismo efecto en la reducción de la severidad comparado con el tratamiento control ( $p=0.01$ ). Así, por ejemplo, en hojas, los tratamientos inoculados con las cepas M10-1 y M10-10 (*K. pneumoniae*) mostraron los menores valores de severidad con 9.5 y 12.6 de ABCPE; mientras que las cepas de NF21 (*S. paucimobilis*), A5 (*A. lwoffii*), 5H2 (*Acinetobacter* sp.), M13ACD (*S. marcescens*) y M8ACD (*S. liquefaciens*), mostraron una disminución de la severidad de ABCPE con valores de 14.5 a 30.9 y, el tratamiento control registró la mayor severidad con 42.1 de ABCPE (Cuadro 1).

Por otra parte, en cálices, todas las cepas bacterianas mostraron una disminución significativa de la severidad con valores entre 8.6 a 17.1 de ABCPE y fueron estadísticamente similares, pero diferentes con respecto al control con 42.1 de ABCPE (Cuadro 1). Las condiciones de Temperatura y humedad relativa durante las evaluaciones fueron de 28 °C y 67% de humedad respectivamente.

while in calyces, all showed the same effect on the decrease of severity compared to the control treatment ( $p=0.01$ ). For example, in leaves, the treatments inoculated with the strains M10-1 and M10-10 (*K. pneumoniae*) had the lowest severity values with 9.5 and 12.6 of AUDPC, while the strains NF21 (*S. paucimobilis*), A5 (*A. lwoffii*), 5H2 (*Acinetobacter* sp.), M13ACD (*S. marcescens*) and M8ACD (*S. liquefaciens*) reduced the severity of AUDPC with values of 14.5 to 30.9, and the control treatment had the greatest severity with 42.1 of AUDPC (Table 1).

On the other hand, in calyces, there was a significant decrease in severity in all the bacterial strains with AUDPC values between 8.6 and 17.1 and were statistically similar but different compared to the control with 42.1 of AUDPC (Table 1). The temperature and relative humidity conditions during the evaluations were 28 °C and 67%, respectively.

Based on the evaluation of the 100 bacterial strains, seven had an effect on inhibiting the development of *C. cassiicola* (CCHFR) *in vitro*, and significantly reduced the severity of spotted of roselle under biospace conditions. The results indicate that the studied bacteria have the potential to be evaluated in further studies as biological control agents of spotted of roselle under field conditions and inoculum natural pressure.

Under *in vitro* conditions, *S. liquefaciens* (M8ACD) inhibited 68% of *C. cassiicola* (CCHFR) and 100% of *S. marcescens* (M13ACD), and was the best under *in vitro* conditions (Table 1); inhibition can be possibly due to the surfactants (serrawatina type) produced by the strains (Shekhar *et al.*, 2015).

Regarding severity on leaves, *S. marcescens* (M13ACD) and *S. liquefaciens* (M8ACD) had 30.7 and 30.9 of ABCPE, respectively. These results suggest that the *Serratia* spp. strains had a better effect *in vitro* and that this result is similar to that

A partir de la evaluación de las 100 cepas bacterianas, siete ejercieron un efecto en inhibir *in vitro* el desarrollo de *C. cassiicola* (CCHFR), las mismas que lograron reducir significativamente la severidad del manchado de la jamaica en condiciones de bioespacio. Los resultados indican que las bacterias estudiadas presentan potencial para ser evaluadas en trabajos posteriores como agentes de control biológico de la enfermedad del manchado de la jamaica bajo condiciones de campo y presión natural de inóculo.

En condiciones *in vitro*, *S. liquefaciens* (M8ACD) inhibió a *C. cassiicola* (CCHFR) en un 68%, *S. marcescens* (M13ACD) con un 100%, siendo la mejor en condiciones *in vitro* (Cuadro 1), la inhibición posiblemente puede ser causada por la producción de biosurfactantes (tipo serrawatina) que las cepas puedan producir (Shekhar *et al.*, 2015).

En cuanto a la severidad en hojas *S. marcescens* (M13ACD) y *S. liquefaciens* (M8ACD) tuvieron un 30.7 y 30.9 de ABCPE, respectivamente, estos resultados sugieren que las cepas de *Serratia* spp., muestran un mejor efecto *in vitro* similar a lo reportado por Sabu *et al.* (2017) quienes describen al género mencionado capaz de controlar *in vitro* a *Pythium myriotylum* y otros patógenos en el cultivo de jengibre (*Zingiber officinale*); sin embargo, el efecto ejercido en condiciones de invernadero fue significativamente menor en comparación con el resto de cepas utilizadas (Mustafa *et al.*, 2019).

En cuanto a las cepas de *K. pneumoniae* (M10-1 y M10-10) fueron las especies con mayor capacidad para reducir la severidad en hojas (Cuadro 1); sin embargo, en cálices el efecto fue similar al resto de los aislamientos bacterianos. Al respecto, Dey *et al.* (2019) evaluaron el efecto de una cepa de *Klebsiella* sp. para el control *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de pudrición de raíz en cultivos de frijol negro (*Vigna mungo*), ellos determinaron un buen control de la enfermedad, por lo que recomiendan su uso como agente de biocontrol.

reported by Sabu *et al.* (2017), who stated that the mentioned genus is able to control *Pythium myriotylum in vitro*, as well as other pathogens in ginger crops (*Zingiber officinale*). However, the effect exerted under greenhouse conditions was significantly lower compared to the other strains used (Mustafa *et al.*, 2019).

Regarding *K. pneumoniae* strains (M10-1 and M10-10), these were the species with the greatest ability to reduce severity on leaves (Table 1), but in calyces the effect was similar to that of the other bacterial isolates. In this regard, Dey *et al.* (2019) evaluated the effect of a *Klebsiella* sp. strain on *in vitro* and *in vivo* control of root rot in black bean crops (*Vigna mungo*), and determined a good control of the disease, and for this reason, the authors recommend its use as a biocontrol agent.

On the other hand, *A. lwoffii* (A5) inhibited 62.7% of *C. cassiicola* growth *in vitro*, which had an effect similar to that exerted by *K. pneumoniae* strains. However, *A. lwoffii* reduced the disease severity in leaves with 18.8 of AUDPC, which was statistically similar to the effect exerted by strains of *K. pneumoniae* (M10-1 and M10-10), *S. marcescens* (M13ACD) and *S. liquefaciens* (M8ACD). In calyces, the severity caused by *A. lwoffii* showed 9.1 of AUDPC, which was similar to the other bacterial treatments (Table 1). In this regard, Trotel-Aziz *et al.* (2008) mentioned that this bacterial genus is able to induce resistance in grapevine plants (*Vitis vinifera*) and that this is a way to prevent *Botrytis cinerea* colonization and, consequently, reduces damage. Under *in vitro* conditions, *S. paucimobilis* (NF21) showed 80.9% inhibition. Regarding severity in leaves and calyces, the ABCPE values were 14.5 and 13.1, respectively. Medina-De la Rosa *et al.* (2016) mentioned that this species had an antagonistic effect on *Fusarium* sp.

The *Acinetobacter* sp. (5H2) strain inhibited 69.4% of *C. cassiicola* and the AUDPC value for

Por otra parte, *A. lwoffii* (A5) inhibió el 62.7% del crecimiento de *C. cassiicola* *in vitro*, el cual resultó en un efecto similar al ejercido por las cepas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, *A. lwoffii* ejerció una reducción sobre la severidad de la enfermedad en hojas al registrar una ABCPE de 18.8, siendo estadísticamente similar al efecto ejercido por las cepas de *K. pneumoniae* (M10-1 y M10-10), *S. marcescens* (M13ACD) y *S. liquefaciens* (M8ACD). En cálices *A. lwoffii* mostró una severidad de 9.1 de ABCPE, similar al resto de tratamientos bacterianos (Cuadro 1). En este sentido, Trotel-Aziz *et al.* (2008), mencionan que este género bacteriano es capaz de inducir resistencia en plantas de vid (*Vitis vinifera*), de esta manera evita la colonización de *Botrytis cinerea* y por consiguiente la disminución del daño. *S. paucimobilis* (NF21) mostró en condiciones *in vitro* una inhibición de 80.9%. En cuanto a la severidad en hojas y cálices fue de 14.5 y 13.1 de ABCPE, respectivamente. Medina-De la Rosa *et al.* (2016) describieron esta especie con efecto antagónico sobre *Fusarium* sp.

La cepa *Acinetobacter* sp. (5H2) logró una inhibición de *C. cassiicola* en un 69.4% y registró una severidad en hojas de 26.9 de ABCPE la cual fue similar a *S. liquefaciens* (M8ACD), y una severidad en cálices de 13.6 de ABCPE, estadísticamente similar al resto de tratamientos bacterianos. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores, quienes mencionan que el uso de bacterias ejerce control de enfermedades causadas por *C. cassiicola* (Romeiro *et al.* 2010; Manju *et al.*, 2019).

No se encontraron reportes de las especies bacterianas evaluadas como agentes de control biológico de *C. cassiicola*, por lo que la presente investigación presenta las primeras evidencias de control biológico de *C. cassiicola* causante del manchado de la jamaica en Guerrero, mediante el uso y aplicación de especies bacterianas como *K. pneumoniae*,

severity in leaves was 26.9, which was similar to that of *S. liquefaciens* (M8ACD); the AUDPC value for severity in calyces was 13.6, which was statistically similar to the other bacterial treatments. These results are in agreement with those reported by other authors, who mention that the use of bacteria exerts control on diseases caused by *C. cassiicola* (Romeiro *et al.* 2010; Manju *et al.*, 2019).

No reports of the bacterial species evaluated as biological control of *C. cassiicola* agents were found, and, therefore, this research shows the first evidences of biological control of *C. cassiicola*, the causal agent of spotted of roselle in Guerrero, by using and applying bacterial species such as *K. pneumoniae*, *A. lwoffii*, *S. paucimobilis*, *S. marcescens* and *S. liquefaciens*, isolated from diverse environments. For this reason, future studies could focus on the evaluation of these bacteria under inoculum natural pressure of the spotted of roselle disease, and also integrate other sustainable control strategies such as the removal of weed reservoirs of *C. cassiicola* (Hernández-Morales *et al.*, 2018), rotation with chemical alternatives (Ortega-Acosta *et al.*, 2019), among others, in order to decrease the impact of the damage caused by the pathogen in roselle cropping.

For the study, seven bacteria were isolated from air, tailings, and amphibian skin with *in vitro* antagonistic potential against *C. cassiicola*, the causal agent of spotted of roselle. The strains of M13ACD (*S. marcescens*) and NF21 (*S. paucimobilis*) were the most effective to inhibit the development of *C. cassiicola* *in vitro* with 100 and 80.9% inhibition, respectively. Under biospace conditions, M10-1 and M10-10 (*K. pneumoniae*), were the most effective in reducing the severity of spotted of roselle with AUDPC values of 9.5 and 12.6, compared to the control treatment (45.7 of AUDPC). In calyces, the seven strains selected



*A. lwoffii*, *S. paucimobilis*, *S. marcescens* y *S. liquefaciens* aisladas de diversos ambientes. Por lo que trabajos posteriores, podrían enfocarse en la evaluación de dichas bacterias bajo presión natural de inóculo de la enfermedad del manchado, además de integrar otras estrategias sustentables de control como la eliminación de malezas reservorios de *C. cassiicola* (Hernández-Morales *et al.*, 2018), rotación con sustancias químicas alternativas (Ortega-Acosta *et al.*, 2019), entre otras, a fin de disminuir el impacto del daño ocasionado por el patógeno en dicho cultivo.

Se obtuvieron siete bacterias aisladas de aire, jales mineros y piel de anfibio con potencial antagonico *in vitro* frente a *C. cassiicola* causante del manchado de la jamaica. Las cepas M13ACD (*S. marcescens*) y NF21 (*S. paucimobilis*) fueron las más efectivas para inhibir el desarrollo de *C. cassiicola in vitro* con 100 y 80.9% de inhibición, respectivamente. En bioespacio, M10-1 y M10-10 (*K. pneumoniae*), resultaron más efectivas en reducir la severidad del manchado en hojas al registrar valores de 9.5 y 12.6 de ABCPE, comparadas con el tratamiento control (45.7 de ABCPE). En cálices las siete cepas redujeron los niveles de severidad de la enfermedad con valores de 8.6 a 17.1 de ABCPE, el tratamiento control registró los mayores niveles de severidad con 42.1 de ABCPE.

#### AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado por medio del número beca 883268 y por el apoyo de Movilidad Nacional, así como también al Dr. Miguel Ángel Catalán y a la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez por sus aportaciones en el transcurso del proyecto.

#### LITERATURA CITADA

Alejo JA. 2017. Jamaica (monocultivo). Pp: 23-29. In: Moczuma LG, González HA, Romero SME, Pérez MR,

decreased the levels of disease severity with AUDPC values of 8.6 to 17.1, while the control treatment had the highest levels of severity with an AUDPC value of 42.1.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the economic support provided through the scholarship number 883268 and National Mobility's support, and to Dr. Miguel Ángel Catalán and Dra. Ma. Elena Moreno Godínez for their assistance during the project.

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

- Castillo MCR. (Eds.). Agenda Técnica Agrícola de Guerrero. INIFAP. 116 p. [https://vun.inifap.gob.mx/VUN\\_MEDIA/BibliotecaWeb/\\_media/\\_agendas/4130\\_4827\\_Agenda\\_T%e3%a9cnica\\_Guerrero\\_2017.pdf](https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_agendas/4130_4827_Agenda_T%e3%a9cnica_Guerrero_2017.pdf)
- Blakeman JP and Fokkema NJ. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20:167-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001123>
- Campbell CL and Madden LV. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York, USA. 532p. <https://doi.org/10.1017/S00074853000>
- Cuervo-Parral JA, Ramírez-Suerol M, Sánchez-López V. and Ramírez-Lepel M. 2011. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. African Journal of Biotechnology 10(52):10657–10663. <https://doi.org/10.5897/ajb11.1333>
- Dey S, Dutta P and Majumbar S. 2019. Biological control of *Macrosphomina phaseolina* in *Vigna nungo* L. by endophytic *Klebsiella pneumoniae* HR1. Jordan Journal of Biological Sciences 12(2): 210-227. <http://jjbs.hu.edu.jo/files/vol12/n2/Paper%20number%2014.pdf>
- Dixon LJ, Schlub RL, Pernezny K, Datnoff LE. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99(9): 1015-1027. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1015>
- Durairaj K, Velmurugan P, Park JH, Chang WS, Park YJ, Senthilkumar P, Choi KM, Lee JH and Oh BT. 2018. An investigation of biocontrol activity *Pseudomonas* and *Bacillus* strains against *Panax ginseng* root rot fungal phytopathogens. Biological Control 125:138-146. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.05.021>
- Fortunato AA, Debona D, Bernardeli AMA and Rodrigues FA. 2015. Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 105: 1050-1058. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-14-0283-R>

- Ghosal A and Hati A. 2019. Impact of some new generation insecticides on soil arthropods in rice maize cropping system. *The Journal of Basic and Applied Zoology* 80(6). <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0077-3>
- Hahn M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology* 7(4):133-141. <https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>
- Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL, Ortega-Acosta, SÁ and Vega-Muñoz R. 2018. Survey on alternative hosts of *Corynespora cassiicola*, the cause of the leaf and calyx spot, in the surroundings of roselle fields in Mexico. *Tropical Plant Pathology* 43: 263-270. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0206-9>
- Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg WJ. 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10:845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Manju MJ, Sadananda M, Santhosh HM, Roopa S, Patil TH, Shankarappa VI, Benagi and Idicula P. 2019. Evaluation of different fungi toxicants against *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* Leaf Fall (CLF) disease of rubber [*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.,] *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(2): 1640-1647. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2019.802.193>
- Medina-De la Rosa G, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG, López-Olguín JH, Hernández-Espinosa MA and Rivera-Tapia JA. 2016. Rhizosphere bacteria of maize with chitinolytic activity and its potential in the control of phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 49 (12): 310-321. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1201345>
- Mustafa S, Kabir S, Shabbir U and Batoool R. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. *Symbiosis* 78: 115-123. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00602-w>
- Nghia NA, Kadir J, Sunderasan E, Puad AM, Malik A and Napis S. 2008. Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia* 166: 189-201. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9138-8>
- Ortega-Acosta SÁ, Mora-Aguilera JA, Velasco-Cruz C, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG and Hernández-Morales J. 2020a. Temporal progress of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) leaf and calyx spot disease (*Corynespora cassiicola*) in Guerrero, Mexico. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00550-1>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J and Palemón-Alberto F. 2020b. Morphological and genetic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates obtained from roselle and associated weeds. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 62-78. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1909-2>
- Ortega-Acosta SA, Velasco-Cruz C, Hernández-Morales J, Ochoa-Martínez DL and Hernández-Ruiz J. 2016. Diagrammatic logarithmic scales for assess the severity of spotted leaves and calyces of roselle. *Mexican Journal of Phytopathology* 34(3): 270-285. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1606-6>
- Ortega-Acosta SA, Ochoa-Martínez DL, Leyva-Mir SG, Velasco-Cruz C, Mora-Aguilera JA y Hernández-Morales J. 2019. Control químico del manchado de hojas y cálices de jamaica en Guerrero, México. *Summa Phytopathologica*, 45(1): 38-43. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/182006>
- Ortega-Acosta SA, Hernández-Morales L, Ochoa-Martínez D and Ayala-Escobar V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Disease* 99(7): 1041. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-14-0438-pdn>
- Petatán-Sagahón I, Anducho-Reyes MA, Silva-Rojas HV, Arana-Cuenca A, Tellez-Jurado A, Cárdenas-Álvarez IO and Mercado-Flores Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences* 12(9): 5522-5537. <https://doi.org/10.3390/ijms12095522>
- Qi Y-X, Zhang X, J-J P, Liu X-M, Lu Y, Zhang H, Hui-Qiang Z, YanChao L and Yi-Xian X. 2011. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *European Journal of Plant Pathology* 130:83-95. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9734-6>
- Rahman MZ, Khanam H, Ueno M, Kihara J, Honda Y and Arase S. 2010. Suppression by red light irradiation of *Corynespora* leaf spot of cucumber caused by *Corynespora cassiicola*. *Journal of Phytopathology* 158: 378-381. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01632.x>
- Romeiro RS, Lana R, Macagnan D, Garcia F and Silva H. 2010. Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. *Tropical Plant Pathology* 35(1): 011-015. <https://doi.org/10.1590/s1982-56762010000100002>
- Sabu R, Aswani R, Jishma P, Jasim B, Mathew J and Radhakrishnan EK. 2017. Plant growth promoting endophytic *Serratia* sp. ZoB14 protecting ginger from fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0936-y>
- Shekhar S, Sundaramanickam A and Balasubramanian T. 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Critical Review in Environmental Science and Technology* 45:1522-1554. <https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>
- SIAP. 2018. Estadística de Producción Agrícola. Sistema de Información Agrícola y Pesquera. [http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos\\_a.php](http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php)
- Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagianti S and Aziz A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany* 64: 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.12.009>
- Vargas-Jordá L, Vila A, Lanza A, Bonvehí P, Nazar J, Mikietuk A, Labat R y Smayevsky J. 2005. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (1): 19-25.

- Vawdrey LL, Grice KRE and Westerhuis D. 2008. Field and laboratory evaluations of fungicides for the control of brown spot (*Corynespora cassiicola*) and black spot (*Asperisporium caricae*) of papaya in far north Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 37: 552-558. <https://doi.org/10.1071/AP08055>
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E y Tún-Suárez J M. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1): 49-56. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61223107.pdf>
- Weber RWS and Hahn M. 2019. Grey mould disease of strawberry in northern Germany: causal agents, fungicide resistance and management strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(4):1589-1597. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09590-1>
- Zhu J, Zhang L, Li T, Ma D, Gao Y, Mu W and Liu F. 2020. Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide. *Crop Protection* 130: 105056. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105056>

# Nematodes associated with the lychee crop (*Litchi chinensis*) in Oaxaca, Mexico

## Nematodos asociados con el cultivo de litchi (*Litchi chinensis*) en Oaxaca, México

**Misael Martínez-Bolaños\***, <sup>1</sup>Campo Experimental Rosario Izapa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Carretera Tapachula-Cacahoatán km 18, Tuxtla Chico, Chiapas, México; **Luciano Martínez-Bolaños**, Unidad Regional Universitaria Sur Sureste, Universidad Autónoma Chapingo. Km 7 Carretera Teapa-Vicente Guerrero C.P. 86800 Teapa, Tabasco, México; **Rebeca Martínez-Reyes**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5, Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México; <sup>1</sup>**Carlos Hugo Avendaño-Arrazate**; **Marco Antonio Cruz-Chávez**, Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca Ex-Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, C.P. 71230; **Luis Antonio Gálvez-Marroquín**, Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Melchor Ocampo No.7, Santo Domingo Barrio Bajo, Villa de Etla, Oaxaca C.P. 68200. \*Autor para correspondencia: martinez.misael@inifap.gob.mx.

Recibido: 29 de Mayo, 2020.

Aceptado: 20 de Agosto, 2020.

Martínez-Bolaños M, Martínez-Bolaños L, Martínez-Reyes R, Avendaño-Arrazate CH, Cruz-Chávez MA and Gálvez-Marroquín LA. 2020. Nematodes associated with the lychee crop (*Litchi chinensis*) in Oaxaca, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 463-474.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-8

Primera publicación DOI: 27 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 27, 2020.

**Resumen.** El objetivo de esta investigación fue determinar los principales géneros de nematodos asociados a plantas adultas de litchi y su asociación con el síntoma de clorosis en Oaxaca. Para ello, de marzo a agosto de 2013, en cuatro parcelas comerciales de litchi se colectaron muestras de suelo en

**Abstract.** The objective of this research was to determine the main genera of nematodes associated with lychee adult plants and their association with the symptom of chlorosis. To do this, from March to August 2013, soil samples were collected from four commercial lychee plots in the tree drip zone. Five asymptomatic and five plants with chlorosis of the Brewster and Mauritius varieties were selected in three phenological stages: flowering, harvesting and vegetative development. *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylenchus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* and *Xiphinema* were the main genera identified. The highest number of total nematodes in Mauritius variety was obtained in the harvest stage (300.6,  $p=0.05$ ), while in Brewster was in

la zona de goteo de los árboles; se seleccionaron cinco plantas asintomáticas y cinco con clorosis de las variedades Brewster y Mauritius, en tres etapas fenológicas: floración, cosecha y desarrollo vegetativo. *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylenchus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* y *Xiphinema* fueron los principales géneros identificados. El mayor número de nematodos totales se obtuvo en etapa de cosecha en la variedad Mauritius (300.6,  $p=0.05$ ), mientras que en Brewster fue en floración (576,  $p=0.05$ ). No se observó una relación directa de la población total de nematodos y el síntoma de clorosis para las diferentes etapas fenológicas evaluadas.

**Palabras clave:** clorosis, Brewster, Mauritius, fenología.

El litchi es nativo del sur de China y sudeste de Asia (Coates *et al.*, 1994), que se comercializa como fruto fresco, deshidratado o enlatado. China, India, Sudeste de Asia y Sudáfrica son las principales regiones productoras a nivel mundial (Menzel y Simpson, 1994). Aproximadamente 700,000 toneladas de litchi fresco se consumen anualmente en Asia e India, y una proporción también es procesada en forma de fruto enlatado o en jugo. La creciente demanda internacional del fruto ha incentivado a varios países para su cultivo, entre ellos México, el cual destina al menos de 4 250 ha, con una cosecha anual de 28 000 t y un crecimiento promedio de 7.7% durante 2012-2018 (SIAP, 2018). El estado de Veracruz ocupa el primer lugar con 9 223.47 t de producción equivalente al 50% del total nacional, seguido de Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca con 3 524.25 t, 1 957.65 t y 1 983.48 t, respectivamente (Torres-Becerril *et al.*, 2019).

flowering (576,  $p=0.05$ ). A direct relationship between the total population of nematodes and the symptom of chlorosis was not observed for the different phenological stages evaluated.

**Key words:** chlorosis, Brewster, Mauritius, phenology.

The lychee is native to Southern China and Southeast Asia (Coates *et al.*, 1994), and is commercialized as a fresh, dried or canned fruit. China, India, Southeast Asia and South Africa are the main regions of production on a global scale (Menzel and Simpson, 1994). Approximately 700,000 tons of fresh lychee are consumed annually in Asia and India, along with an important amount also being processed in the form of canned fruit or juice. The growing demand for the fruit has incentivized several countries to grow it, including Mexico, which grows this crop in at least 4,250 ha, with an annual harvest of 28,000 t and an average growth of 7.7% between 2012 and 2018 (SIAP, 2018). Veracruz is the state with the highest production, with 9,223.47 t, accounting for 50% of the country's total, followed by Puebla, San Luis Potosí and Oaxaca, with 3,524.25 t, 1,957.65 t and 1,983.48 t, respectively (Torres-Becerril *et al.*, 2019).

The lychee crop faces numerous problems in Mexico during production, mostly regarding postharvest handling and commercialization (Torres-Becerril *et al.*, 2019). However, on the field, there are a series of phytosanitary problems caused by anthracnose (Campbell and Campbell 2001; Martínez-Bolaños *et al.*, 2015) and some insect-related pests (Xu *et al.*, 2005). On the other hand, another important pest are nematodes, and their importance in tropical fruits is related to the induction of symptoms such as chlorosis, foliar

El cultivo del litchi en México enfrenta muchos problemas durante la producción, principalmente problemas de manejo poscosecha y comercialización (Torres-Becerril *et al.*, 2019); sin embargo, en campo se presentan una serie de problemas fitosanitarios causados por antracnosis (Campbell y Campbell 2001; Martínez-Bolaños *et al.*, 2015) y algunas plagas insectiles (Xu *et al.*, 2005). Por otra parte, otra plaga importante son los nematodos, cuya importancia en frutales tropicales está asociada a la inducción de síntomas tales como clorosis, deformación foliar, acortamiento de entrenudos, reducción de crecimiento y disminución en la producción (Ravichandra, 2019). Varios autores reportan en litchi a los nematodos: *Helicotylenchus dihystera*, *Helicotylenchus indicus*, *Hemicriconemoides litchi*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *Xiphinema brevicolle*, *Xiphinema sp.*, (Nath *et al.*, 2008), *Hemicriconemoides mangiferae*, *Trichodorus pakistanensis*, *Xiphinema inequale* (Nisha *et al.*, 2000) y *Helicotylenchus dihystera* (Nisha *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 2008). De estas especies, solo *H. mangiferae* y *X. brevicolle* se consideran patógenos al causar síntomas de defoliación, clorosis, necrosis apical de hojas, reducción de floración y caída de frutos (Nisha *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 2008).

En Oaxaca México, el cultivo de litchi ocupa una superficie de 1 500 ha, con rendimiento promedio de 4.6 t ha<sup>-1</sup>; las variedades Brewster y Mauritius se cultivan de manera comercial (Maldonado-Peralta *et al.*, 2012). Durante los ciclos de producción 2010-2012 en árboles de ambas variedades se observaron síntomas de clorosis y bajo rendimiento posiblemente asociadas al daño ocasionado por nematodos, por lo que es importante desarrollar estudios que permitan identificar tanto el nematodo, como los síntomas que provocan en el cultivo de litchi. El objetivo de la presente investigación fue

deformations, shortening of internodes, reduction of growth and of the production (Ravichandra, 2019). Several authors report such nematodes in lychee as *Helicotylenchus dihystera*, *Helicotylenchus indicus*, *Hemicriconemoides litchi*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchorhynchus leviterminalis*, *Xiphinema brevicolle*, *Xiphinema sp.*, (Nath *et al.*, 2008), *Hemicriconemoides mangiferae*, *Trichodorus pakistanensis*, *Xiphinema inequale* (Nisha *et al.*, 2000) and *Helicotylenchus dihystera* (Nisha *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 2008). Out of these species, only *H. mangiferae* and *X. brevicolle* are considered pathogens, since they cause symptoms of defoliation, chlorosis, apical necrosis of leaves, reduction of flowering and the falling of fruits (Nisha *et al.*, 2000; Nath *et al.*, 2008).

In Oaxaca, Mexico, lychee orchards cover a surface of 1,500 ha, with an average yield of 4.6 t ha<sup>-1</sup>; the Brewster and Mauritius varieties are grown commercially (Maldonado-Peralta *et al.*, 2012). During the 2010-2012 production cycles in trees of both varieties, symptoms of chlorosis and low yields were observed, possibly due to the damage caused by nematodes. Due to this, it is important to carry out studies that help identify the nematode, as well as the symptoms it causes in the lychee crop. The aim of the present investigation was to identify the main genera of nematodes related to the lychee crop and determine its relation with the foliar chlorosis symptoms.

Four commercial lychee plots were sampled (two with the Brewster variety and two with Mauritius), after having selected one plot per location or municipal area: San José Chiltepec (Brewster), Santa María Jacatepec (Brewster), San Juan Cotzocón (Mauritius) and Santiago Yaveo (Mauritius), in the state of Oaxaca, Mexico. In each plot, a surface of one hectare was considered, and from it, five trees (8 to 10 years in age) with

identificar los principales géneros de nematodos asociados al cultivo de litchi y determinar su relación con los síntomas de clorosis foliar.

Se muestrearon cuatro parcelas comerciales de litchi (dos con la variedad Brewster y dos de Mauritius), para ello se seleccionó una parcela por localidad o municipio: San José Chiltepec (Brewster), Santa María Jacatepec (Brewster), San Juan Cotzocón (Mauritius) y Santiago Yaveo (Mauritius), en el Estado de Oaxaca México. En cada parcela se consideró una superficie de una hectárea y de ella se seleccionaron (de manera dirigida) y etiquetaron cinco árboles (8-10 años) con síntomas de clorosis y cinco plantas asintomáticas.

En la zona de goteo de cada árbol etiquetado (15-30 cm de profundidad; se eliminaron los primeros 15 cm) se tomaron cinco submuestras de suelo, de 200 g (suelo y raíces) cada una, posteriormente estas submuestras se colocaron sobre un plástico y se mezclaron. Las raíces y suelo se separaron con cernidores, y de la muestra cernida se tomaron 200 g de suelo (muestra compuesta representativa para cada árbol). En cada muestreo se tuvieron diez muestras compuestas por parcela muestreada, cinco de árboles sintomáticos y cinco de asintomáticos (Barker, 1978). Cada muestra se etiquetó y guardó en una hielera para su posterior análisis en laboratorio. Los muestreos se realizaron en los meses de marzo, mayo y agosto de 2013, que correspondieron a las etapas fenológicas de floración, cosecha y desarrollo vegetativo de litchi.

Cada muestra de suelo se procesó mediante la técnica de tamizado-centrifugado (Ayoub, 1977; Hooper, 1986), para ello en una probeta de 1 L se adicionaron 200 cm<sup>3</sup> de suelo y se aforó con agua destilada a un volumen final de 1000 mL. La solución de suelo se vertió en un contenedor plástico, se mezcló, se dejó reposar durante 15 segundos y posteriormente se pasó por tamices de 60, 100, 200, 325 y 400 mallas. El material colectado en los tamices de 100, 200, 325 y 400 mallas de cada

symptoms of chlorosis and five asymptomatic plants were chosen (in a directed manner) and labelled.

In the dripping zone of each labelled tree (15-30 cm depth; the first 15 cm were eliminated) five 200g soil subsamples were taken (soil and roots). These subsamples were then placed on plastic and mixed. The roots and soil were separated with a sieve and 200 g of soil were taken from the sieved sample (representative composite sample for each tree). In each sample collection, ten composite samples were taken for each plot, five from symptomatic trees and five from asymptomatic trees (Barker, 1978). Each sample was labelled and kept in an ice cooler for its analysis in the laboratory. Samples were taken in the months of March, May and August of 2013, corresponding to the phenological stages of flowering, harvesting and vegetative development of lychee.

Every soil sample was processed with the sieving-centrifuging technique (Ayoub, 1977; Hooper, 1986). For this, 200 cm<sup>3</sup> were placed in a 1 L graduated cylinder, and diluted with distilled water for a final volume of 1000 mL. The soil solution was poured in a plastic container, mixed, left to rest for 15 seconds and then sieved using 60, 100, 200, 325 and 400-mesh sieves. The material collected in the 100, 200, 325 and 400-mesh sieves for each sample was placed in 50 mL centrifuge tubes. Each sample was added 1 g of kaolin and then centrifuges at 2,500 rpm for 5 min. The sedimentary fraction was suspended in a 46% saccharose solution (460 g sugar x L of water<sup>-1</sup>) and then centrifuged at 2,500 rpm for one minute. The collected supernatant was sieved using a 400-mesh sieve and water was added to avoid the plasmolysis of the nematodes. From each soil sample, 20 mL of suspension were collected and kept in glass jars to later analyze.

Glass jars with 10 mL of the extracted nematode suspension were placed in a double bath

muestra se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL; a cada muestra se le adicionó 1 g de caolín y posteriormente se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 min. La fracción sedimentaria se suspendió en una solución de sacarosa al 46% (460 g de azúcar x L de agua<sup>-1</sup>) y posteriormente se centrifugó a 2,500 rpm durante un minuto. El sobrenadante colectado se pasó por un tamiz de 400 mallas y se agregó agua para evitar plasmólisis de los nematodos. De cada muestra de suelo se colectaron 20 mL de suspensión y se conservaron en frascos de vidrio para su posterior análisis.

Frascos de vidrio con 10 mL de la suspensión de los nematodos extraídos se colocaron en baño María a 80 °C; posteriormente a cada frasco se le adicionó solución TAF (Formaldehído 40%, Trietanolamina y agua destilada) (Shurtleff y Averre III, 2000) y se dejó reposar por 24 h para posterior conteo poblacional de nematodos en microscopio estereoscópico.

La deshidratación de los nematodos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Seinhorst (1959). En cada frasco se sustituyó el 50% de volumen de TAF por un volumen proporcional de la solución A (Etanol 96%: 20 partes/ glicerina: 1 parte/ agua destilada: 79 partes). Posteriormente la suspensión de nematodos se transfirió a una placa de Petri y se incubó por 24 h dentro de una cámara con etanol 96% a 40 °C. Al líquido sobrante de la suspensión con nematodos se le adicionó solución B (Etanol 96%: 93 partes/ glicerina: 7 partes) hasta llenar la placa de Petri y se incubó por 24 h a 26 °C. Posterior a la evaporación de dos terceras partes del volumen del alcohol, el volumen restante se reemplazó con la solución C (Etanol 96%: 80 partes/ glicerina: 20 partes) y se incubó a temperatura ambiente (26 °C) durante 24 h. Una vez evaporado el alcohol, la placa de Petri se colocó en una estufa a 40 °C durante 48 horas y después se transfirió a una cámara de deshidratación con cloruro de calcio para eliminar los remanentes de agua.

at 80 °C; each jar was then added a FTW solution (Formaldehyde 40%, Triethanolamine and distilled water) (Shurtleff and Averre III, 2000) and left to rest for 24 h to then count the nematode population using a stereoscopic microscope.

The nematodes were dehydrated according to the procedure described by Seinhorst (1959). In each jar, 50% of the volume of FTW was replaced with the same volume of solution A (20 parts of 96% ethanol/1 part glycerin/79 parts distilled water). Afterwards, the nematode suspension was transferred to a Petri dish and incubated for 24 h in a chamber with 96% ethanol at 40 °C. Solution B (93 parts of 96% ethanol/ 7 parts glycerin) was added to the liquid remaining from the nematode suspension until the Petri dish was filled, and incubated for 24 h at 26 °C. After two thirds of the volume of alcohol evaporated, the remaining volume was replaced with the C solution (80 parts of 96% Ethanol / 20 parts glycerin) and incubated at room temperature (26 °C) for 24 h. After the alcohol evaporated, the Petri dish was placed in an oven at 40 °C for 48 hours and then transferred to a dehydration chamber with calcium chloride to eliminate the remaining water.

Permanent (paraffin) and temporary (water-agar 3%) preparations were made from the nematode samples (fixed and dehydrated) collected. In order to characterize and identify the nematodes, observations were carried out on an Olympus CX3 compound microscopes with magnifications of 10X, 40X and 100X; taxonomically important characteristics were photographed using an Olympus E330 camera. The images of the specimens were measured and analyzed using the program Axion Vision LE<sup>®</sup> for their identification with the use of taxonomic keys to determine the genus (Mai *et al.*, 1996; Shurtleff y Averre III, 2000) and species (Siddiqi, 1963; Boag and Jairajpuri, 1985; Siddiqi, 2000; Euon *et al.*, 2002; Castillo and Volvias, 2007).



Preparaciones permanentes (parafina) y temporales (agua-agar 3%) se realizaron a partir de las muestras de nematodos (fijados y deshidratados) colectados. Para la caracterización e identificación de los nematodos se hicieron observaciones en un microscopio compuesto Olympus CX3 con los objetivos de 10X, 40X y 100X; se fotografiaron caracteres de importancia taxonómica con una cámara Olympus E330. Las imágenes de los ejemplares se midieron y analizaron con el programa Axion Vision LE<sup>®</sup>, para su posterior identificación mediante el uso de claves taxonómicas para determinar el género (Mai *et al.*, 1996; Shurtleff y Averre III, 2000) y especie (Siddiqi, 1963; Boag y Jairajpuri, 1985; Siddiqui, 2000; Euon *et al.*, 2002; Castillo y Volvias, 2007).

De cada muestra se tomaron submuestras (3 mL) de los nematodos extraídos, se colocaron en cajas contadoras y se observaron en microscopio compuesto considerando cinco repeticiones por muestra. El conteo poblacional de ejemplares por género se realizó de acuerdo con la morfología de especímenes, mes de muestreo (etapa fenológica), variedad y sintomatología. Se evaluaron tres factores y su relación sobre poblaciones de nematodos. Los factores fueron, tres etapas fenológicas (desarrollo vegetativo, floración y cosecha), dos variedades (Brewster y Mauritius) y dos síntomas (plantas asintomáticas y cloróticas). Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación de medias de Duncan con 0.05% de confianza.

De acuerdo a los resultados obtenidos, 13 géneros de nematodos se identificaron de muestras de suelo de litchi provenientes de parcelas comerciales de las variedades Brewster y Mauritius en Oaxaca, México. Las características morfológicas y morfométricas correspondieron a los géneros: *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*,

Subsamples (3 mL) of the extracted nematodes were taken from each sample. They were placed in counting boxes and observed under a compound microscope, considering five repetitions per sample. The population count of the specimens per genus was carried out according to the specimen morphology, month in which samples were taken (phenological stage), variety and symptomatology. Three factors were evaluated, along with their relationship with nematode populations. The factors were three phenological stages (vegetative development, flowering and harvesting), two varieties (Brewster and Mauritius) and two symptoms (asymptomatic and chlorotic plants). The data were processed using an analysis of variance (ANOVA) and a Duncan average comparison test with a reliability of 0.05%.

According to the results obtained, 13 nematode genera were identified from lychee soil samples from commercial plots with Brewster and Mauritius varieties in Oaxaca, Mexico. The morphological and morphometric characteristics corresponded to the *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylenchus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* and *Xiphinema* genera (Figures 1 and 2). Some species within these genera have been reported to be related to the lychee crop (Nisha *et al.*, 2000). It is worth mentioning that some of these genera are, not only considered phytoparasitic, but they are nematodes with mycophagous feeding habits (*Aphelenchus*, *Tylenchus*, *Ditylenchus* and *Psilenchus*), and therefore their presence indicate that they are related, although this does not imply that they affect the crop.

The total nematode population during the flowering stage was higher in the Brewster variety. However, no significant differences ( $p=0.05$ ) were observed between the evaluated varieties (Table

*Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylenchus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* y *Xiphinema* (Figura 1 y 2). Algunas especies dentro de estos géneros se han reportado como asociadas al cultivo de litchi (Nisha *et al.*, 2000). Es importante mencionar que algunos de estos géneros además de ser considerados fitoparásitos, son nematodos que tienen hábitos alimenticios micófagos (*Aphelenchus*, *Tylenchus*, *Ditylenchus* y *Psilenchus*) por lo que su presencia en las muestras indica que están asociados sin que ello implique que afecten al cultivo.

La población total de nematodos durante la etapa de floración fue mayor en la variedad Brewster; sin embargo durante el desarrollo vegetativo y cosecha no se observaron diferencias significativas ( $p=0.05$ ) entre las variedades evaluadas (Cuadro 1). En las mismas poblaciones evaluadas, no se observó una relación directa de la población total de nematodos y el síntoma de clorosis para las diferentes etapas fenológicas evaluadas (Cuadro 1).

El género *Mesocriconema* fue el que presentó el mayor número de individuos en las diferentes etapas fenológicas evaluadas; aunque este género se ha reportado como posible fitoparásito de guayaba (*Psidium guajava*), papaya (*Carica papaya*) (Castellano *et al.*, 2012) y maracuyá (*Passiflora* sp.) (Souza y Pala, 2016) no existen reportes de su posible papel como fitopatógeno en litchi. Las poblaciones de *Hemicriconemoides* y *Tylenchus* fueron significativamente mayores a los demás géneros solo en cosecha. Para la variedad Brewster las principales poblaciones de nematodos correspondieron a los géneros *Mesocriconema*, *Ditylenchus*, *Hemicriconemoides* y *Pratylenchus*, mientras que para la variedad Mauritius lo fueron los géneros *Aphelenchus* y *Xiphinema* (Cuadro 2). A pesar de que los géneros *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides* (McSorley *et al.*, 1980) y *Xiphinema* fueron notificados como asociados a síntomas de clorosis en plantas en mango (*Mangifera indica*) y

1). In the same populations evaluated, no direct relation was observed between the total population of nematodes and the symptom of chlorosis for the different phenological stages evaluated (Table 1).

The genus *Mesocriconema* displayed the highest number of individuals in the different phenological stages evaluated. Although this genus has been reported as a possible phytoparasite in guava (*Psidium guajava*), papaya (*Carica papaya*) (Castellano *et al.*, 2012) and passionfruit (*Passiflora* sp.) (Souza and Pala, 2016), there are no reports on its possible role as a phytopathogen in lychee. The *Hemicriconemoides* and *Tylenchus* populations were significantly higher to those of the remaining genera, only in harvesting. For the Brewster variety, the main nematode populations corresponded to the genera *Mesocriconema*, *Ditylenchus*, *Hemicriconemoides* and *Pratylenchus*, whereas for the Mauritius variety, it was the genera *Aphelenchus* and *Xiphinema* (Table 2). Despite the genera *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides* (McSorley *et al.*, 1980) and *Xiphinema* having been reported to be related to symptoms of chlorosis in mango (*Mangifera indica*) and lychee plants, for the present study, the populations of both genera showed no significant differences between chlorotic and asymptomatic plants (Table 2). Only the genus *Trichodorus* displayed a significant difference between plant symptomatology, making the asymptomatic plant population the largest one (Table 2); this genus has been reported as a pathogen in sugarcane (Shahina and Firoza, 2007).

In conclusion, thirteen nematode genera were identified as being related to two lychee varieties (Brewster and Mauritius) in the stages of flowering, harvesting and vegetative development in the state of Oaxaca, Mexico: *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylenchus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*,

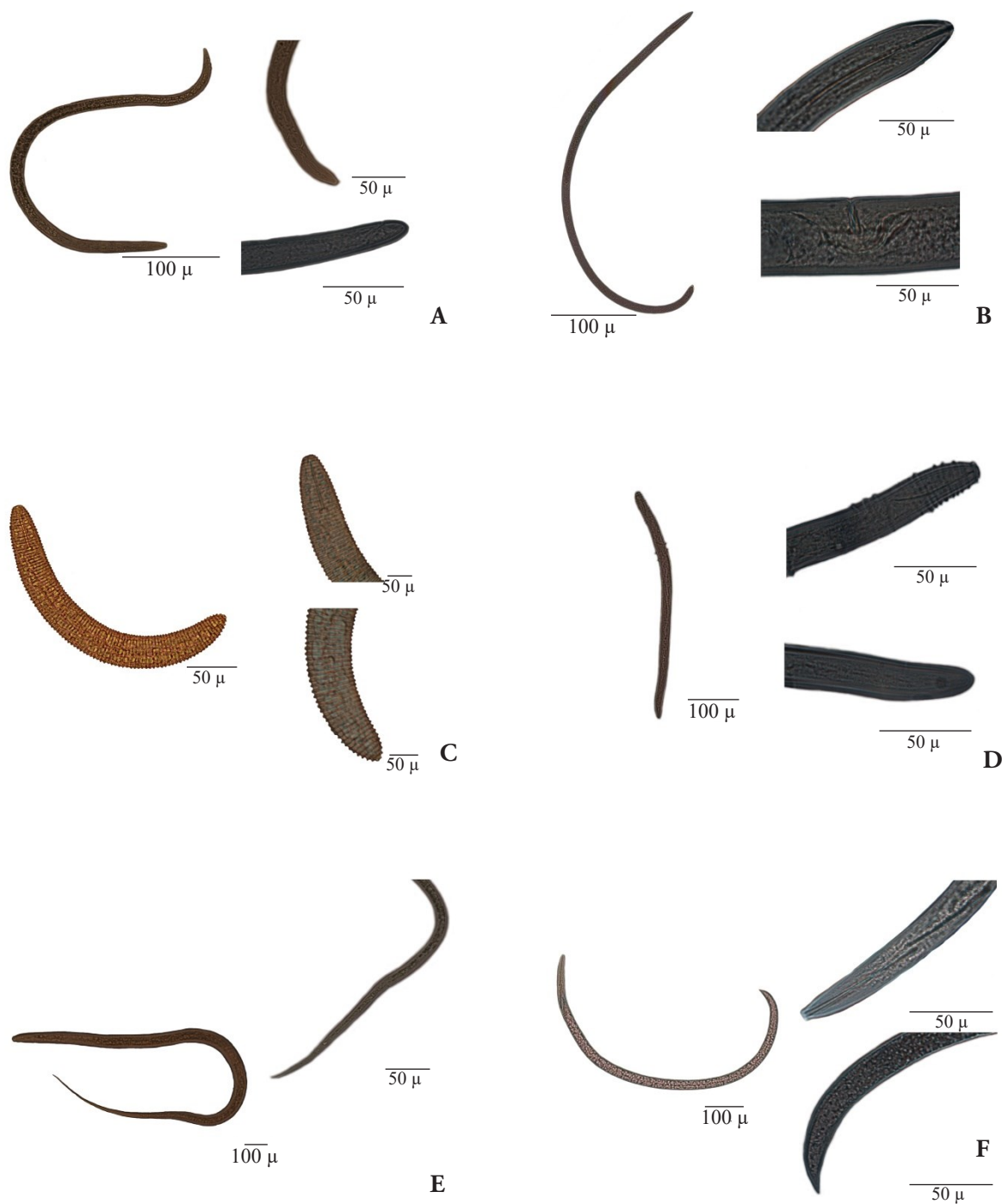


Figura 1. Características morfológicas distintivas de géneros de nematodos ectoparásitos asociados al cultivo de litchi (*Litchi chinensis*) en plantaciones comerciales en el estado de Oaxaca, México, A) *Aphelenchus*, B) *Longidorus*, C) *Mesocriconema*, D) *Trichodorus*, E) *Tylenchus* y F) *Xiphinema*.

Figure 1. Distinctive morphological characteristics of genera of ectoparasitic nematodes related to the lychee crop (*Litchi chinensis*) in commercial plantations in the state of Oaxaca, Mexico. A) *Aphelenchus*, B) *Longidorus*, C) *Mesocriconema*, D) *Trichodorus*, E) *Tylenchus* and F) *Xiphinema*.



Figura 2. Características morfológicas distintivas de géneros de nematodos asociados al cultivo de litchi (*Litchi chinensis*) en plantaciones comerciales en el estado de Oaxaca, México, A) *Helicotylenchus*, B) *Hemicriconemoides*, C) *Pratylenchus*, D) *Psilenchus*, E) *Rotylenchus* y F) *Tylenchorhynchus*.

Figure 2. Distinctive morphological characteristics of genera of nematodes related to the lychee crop (*Litchi chinensis*) in commercial plantations in the state of Oaxaca, Mexico. A) *Helicotylenchus*, B) *Hemicriconemoides*, C) *Pratylenchus*, D) *Psilenchus*, E) *Rotylenchus* and F) *Tylenchorhynchus*.

**Cuadro 1. Promedio poblacional de nematodos en 100 g de suelo muestreados durante las etapas fenológicas: floración, cosecha y desarrollo vegetativo del cultivo de litchi (*Litchi chinensis*), evaluadas en las variedades Mauritius y Brewster, en árboles con síntomas y asintomáticos en Oaxaca, México.**

**Table 1. Average population of nematodes in 100 g of soil sampled during the phenological stages (flowering, harvesting and vegetative development) of the lychee crop (*Litchi chinensis*), evaluated in the Mauritius and Brewster varieties, in symptomatic and asymptomatic trees in Oaxaca, Mexico.**

| Etapa fenológica      | Variedad <sup>x</sup> |          | Síntoma      |          |
|-----------------------|-----------------------|----------|--------------|----------|
|                       | Mauritius             | Brewster | Asintomático | Clorosis |
| Floración             | 75.3 b                | 576 a    | 308.6 a      | 341.3 a  |
| Cosecha               | 300.6 a               | 304 a    | 318 a        | 286.6 a  |
| Desarrollo vegetativo | 240 a                 | 213.3 a  | 234.6 a      | 218.6 a  |

<sup>x</sup>Promedios con la misma letra dentro de la misma fila no fueron significativamente diferentes. Prueba de Rango Múltiple Duncan, P=0,05. / <sup>x</sup>Averages with the same letter in the same row were not significantly different. Duncan Multiple Range Test, P=0,05.

**Cuadro 2. Promedio poblacional de trece géneros de nematodos en 100 g de suelo muestreados durante tres etapas fenológicas: floración, cosecha y desarrollo vegetativo, del cultivo de litchi (*Litchi chinensis*); evaluados en las variedades Mauritius y Brewster, en árboles con síntomas y asintomáticos en Oaxaca, México.**

**Table 2. Average population of thirteen genera of nematodes in 100 g of soil sampled during three phenological stages (flowering, harvesting and vegetative development) of the lychee crop (*Litchi chinensis*), evaluated in the Mauritius and Brewster varieties, in symptomatic and asymptomatic trees in Oaxaca, Mexico.**

| Nematodo/género          | Etapa fenológica <sup>x</sup> |        |         | Variedad |      | Síntoma |        |
|--------------------------|-------------------------------|--------|---------|----------|------|---------|--------|
|                          | 1                             | 2      | 3       | 1        | 2    | 1       | 2      |
| <i>Aphelenchus</i>       | 7.2 b                         | 53.8 c | 31.3 e  | 46       | 15.3 | 30 a    | 31.3 a |
| <i>Ditylenchus</i>       | 16 b                          | 44.6 c | 0.6 e   | 5.3      | 35.3 | 12 a    | 28.6 a |
| <i>Helicotylenchus</i>   | 185.3 b                       | 618 b  | 174 dce | 288.6    | 368  | 310 a   | 346 a  |
| <i>Hemicriconemoides</i> | 273 b                         | 1063a  | 4 e     | 4        | 1090 | 404 a   | 690 a  |
| <i>Longidorus</i>        | 36 b                          | 50 c   | 0.5 e   | 32.6     | 24.6 | 39.3 a  | 18 a   |
| <i>Mesocriconema</i>     | 2784 a                        | 954 a  | 1023 a  | 433.3    | 2741 | 1500 a  | 1674 a |
| <i>Pratylenchus</i>      | 250 b                         | 164 c  | 149 dce | 104      | 271  | 246.6 a | 128 a  |
| <i>Psilenchus</i>        | 26 b                          | 6.6 c  | 15.3 e  | 7.3      | 24.6 | 16 a    | 15.3 a |
| <i>Rotylenchulus</i>     | 116 b                         | 27.3 c | 339.3 c | 211.3    | 111  | 128.6 a | 193 a  |
| <i>Trichodorus</i>       | 0 b                           | 120 c  | 266 dc  | 258      | 0    | 220 a   | 38 b   |
| <i>Tylenchorhynchus</i>  | 38.2 b                        | 78.6 c | 83.3 de | 48       | 85.3 | 78 a    | 55.3 a |
| <i>Tylenchus</i>         | 735.3 b                       | 994 a  | 772.6 b | 996      | 672  | 948 a   | 720 a  |
| <i>Xiphinema</i>         | 0 b                           | 46.6 c | 8 e     | 30.6     | 6    | 8 a     | 28.6 a |

<sup>x</sup>Promedios con la misma letra dentro de la misma columna (para etapa fenológica) y/o línea (para síntoma) no fueron significativamente diferentes. Prueba de Rango Múltiple Duncan, P=0,05. Etapa fenológica: 1=Floración, 2=Cosecha y 3=Desarrollo vegetativo; Variedad: 1=Mauritius y 2= Brewster, y Síntoma: 1=Asintomático y 2=Clorosis. / <sup>x</sup>Averages with the same letter in the same column (for phenological stage) and/or row (for symptom) were not significantly different. Duncan Multiple Range Test, P=0,05. Phenological stage: 1=Flowering, 2=Harvesting and 3=Vegetative development; Variety: 1=Mauritius and 2= Brewster, and Symptom: 1=Asymptomatic and 2=Chlorosis.

litchi, para el presente estudio, las poblaciones de ambos géneros no mostraron diferencias significativas entre plantas cloróticas y asintomáticas (Cuadro 2). Solo en el género *Trichodorus* se observó diferencia significativa respecto a la sintomatología de las plantas, siendo mayor la población en plantas asintomáticas (Cuadro 2); este género ha sido notificado como patógeno de caña de azúcar (Shahina y Firoza, 2007).

Se concluye que trece géneros de nematodos se identificaron asociados a dos variedades de litchi Brewster y Mauritius en las etapas de floración, cosecha y desarrollo vegetativo, en el estado de Oaxaca, México: *Aphelenchus*, *Ditylenchus*, *Helicotylenchus*, *Hemicriconemoides*, *Longidorus*, *Mesocriconema*, *Pratylenchus*, *Psilenchus*, *Rotylechus*, *Trichodorus*, *Tylenchorhynchus*, *Tylenchus* y *Xiphinema*. Predominaron los géneros con hábito ectoparásito. El síntoma de clorosis en plantas de litchi no se asoció con la densidad poblacional de nematodos totales o con algún género en específico.

## LITERATURA CITADA

- Ayoub SM. 1977. Plant Nematology. An agricultural training aid. Department of Food and Agriculture. USA. Division of Plant Industry. Laboratory Services-Nematology.
- Barker KR. 1978. Determining Nematode Population Responses to Control Agents. In Methods for evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides Pp. 114-125. St. Paul Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Boag B and Jairajpuri MS. 1985. *Helicotylenchus scoticus* n.sp. and a conspectus of the genus *Helicotylenchus* Steiner, 1945 (Tylenchida: Nematoda). Systematic Parasitology 7:47-58. <https://doi.org/10.1007/BF00010161>
- Campbell RJ and Campbell CW. 2001. Evaluation and introduction of lychee cultivars in South Florida, USA. Acta Horticulturae 558:119-123. <https://doi.org/10.17660/Acta-Hortic.2001.558.15>
- Castellano G, Casassa-Padrón AM, Ramírez-Méndez R, Pérez-Pérez E, Burgos ME y Crozzoli R. 2012. Nematodos fitoparásitos asociados a frutales estratégicos en el municipio Baralt del estado Zulia, Venezuela. Fitopatología Venezolana 25:2-6.
- Castillo P and Vovlas N. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management. Nematology monographs and perspectives 6: 559. <https://doi.org/10.1163/ej.9789004155640.i-523>
- Coates LM, Johnson GI, Sardud U and Cooke AW. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. ACIAR proceedings 58:68-69. <http://hdl.handle.net/102.100.100/237081?index=1>
- Euon CY, Loof P and Brzeski M. 2002. Compendium of genus Mesocriconema Andrassy, 1965 (Nematoda: Criconematidae). Nematology 4(3):341-360. <https://doi.org/10.1163/156854102760199187>
- Hooper DJ. 1986. Extraction of free-living stages of soil. In: Laboratory methods for work with plant and soil nematodes (pp.5-30). London: Ministry of Agriculture Fisheries and Food.
- Mai WF, Mullin PG, Lyon HH and Loeffler K. 1996. Plant-Parasitic Nematodes a Pictorial Key to Genera. Fifth edition. USA: Cornell University. <https://www.jstor.org/stable/10.7591/j.ctv5rdz0t>
- Maldonado-Peralta R, Trinidad-Santos A, Téliz-Ortiz D, Velasco-Velazco VA y Volke HVH. 2012. Respuesta de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) a la fertilización con NPK en el norte de Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana 35(3): 251-258. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61024385008>
- Martínez-Bolaños M, Téliz-Ortiz D, Mora-Aguilera A, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D, García-Pérez E and Sánchez-López V. 2015. Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del fruto de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) en Oaxaca, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33:140-155. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000200140&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000200140&lng=es&nrm=iso). ISSN 2007-8080.
- McSorley R, Campbell CW and Goldweber S. 1980. Observations on a mango (*Mangifera indica*) decline in South Florida (nematode, verticillium wilt). Proceedings of the annual meeting of the Florida State Horticultural Society 93:132-133.
- Menzel CM and Simpson DR. 1994. Lychee. In: Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops (pp.123-141). Florida, USA: CRC Press.
- Nath RC, Sinha BC, Mukherjee B and Dasgupta MK. 2008. Occurrence, distribution and importance of plant parasitic nematodes associated with litchi plantations in north Tripura district. Indian Journal of Nematology 38(1):75-80.

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

- Nisha S, Rawat VS and Ahmad M. 2000. Seasonal population dynamics of plant-parasitic nematodes associated with *Lit-chi chinensis* in Doon Valley, U.P. (India). Indian Journal of Nematology 30(2):256-257.
- Ravichandra NG. 2019. New report of root-knot nematode (*Meloidogyne enterolobii*) on guava from Karnataka, India. EC Agriculture 5(9): 504-506. <https://www.ecronicon.com/ecag/pdf/ECAG-05-00187.pdf>
- Seinhorst JW. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica 4(1):67-69. <https://doi.org/10.1163/187529259X00381>
- Shahina F and Firoza K. 2007. Nematodes and pests problems in sugarcane. Pakistan Sugar Journal 22: 18-28.
- Shurtleff MC and Averre III ChW. 2000. Diagnosing plant diseases caused by nematodes. St. Paul Minnesota, USA: APS PRESS.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Boletín de exportación de Litchi. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/451512/Abril\\_lit-chi\\_2019.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/451512/Abril_lit-chi_2019.pdf)
- Siddiqui MR. 1963. Four new species of the genus *Tylenchus* Bastian, 1865 (Nematoda) from North India. Z. F. Parasitenkunde 23: 170-180. <https://doi.org/10.1007/BF00260292>
- Siddiqui MR. 2000. Tylenchida parasites of plants and insects. Second Edition. Wallingford, U.K: CABI Pub.
- Souza SR and Pala MPR. 2016. Nematodes associated with five fruit trees in the state of Amapá, Brazil. Ciência Rural 46(9):1509-1513. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150589>
- Torres-Becerril M, Morales-Trejo F, Arvizu-Barrón E, Ojeda-Enciso LA, Zaldívar-Cruz JM y Armida-Alcudia L. 2019. Situación actual del cultivo de litchi en municipios productores de Veracruz y Oaxaca, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 10(3):563-574. <https://dx.doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1457>
- Xu X, Wu Z, Chen W and Su M. 2005. Effect of low temperature on relative enzyme activity and membrane peroxidation of lychee fruits. Acta Horticulturae 665:359-364. <https://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.665.44>

# Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico

## Aislamiento de *Fusarium* de plantas de vainilla cultivadas en la Huasteca Potosina México

José Leonardo Hernández-Martínez, Candy Carranza-Álvarez, Juan José Maldonado-Miranda, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Romualdo del Campo 501, Colonia Rafael Curiel, C.P. 79060, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México; Domingo Martínez-Soto\*, Department of Microbiology and Plant Pathology, University of California, Riverside. 900 University Avenue, Riverside CA, 92521, USA. \*Autor para correspondencia: domingom@ucr.edu

Recibido: 22 de Abril, 2020.

Aceptado: 20 de Junio, 2020.

Hernández-Martínez JL, Carranza-Álvarez C, Maldonado-Miranda JJ and Martínez-Soto D. 2020. Isolation of *Fusarium* from vanilla plants grown in the Huasteca Potosina Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 475-484.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2004-4

Primera publicación DOI: 07 de Julio, 2020.

First DOI publication: July 07, 2020.

**Resumen.** La vainilla es una orquídea de importancia económica en México y el mundo. Entre las principales zonas de México donde se produce esta orquídea se encuentra la región Huasteca en el estado de San Luis Potosí. Recientemente se observó en plantas de vainilla cultivadas en esta región, la presencia de síntomas como clorosis, necrosis y marchitamiento general. Considerando que dichos síntomas son característicos de infecciones causadas por hongos patógenos, en este trabajo se planteó el objetivo de identificar los hongos asociados a

**Abstract.** Vanilla is an orchid of economic importance in Mexico and the world. Among the zones of Mexico where this orchid is produced, we can find the Huasteca region in the state of San Luis Potosi. Recently it was observed in plants cultivated in this region, the presence of symptoms such as chlorosis, necrosis, and wilting. Considering these symptoms as characteristic of fungal infections, the goal of this work was to identify the fungi associated with these plants. To achieve it, leaves, stems, and fruits of plants with symptoms were collected, washed, cut, and inoculated on PDA medium. Under these conditions fungal colonies grew, which were used to obtain monospore cultures, identified later by microcultures and amplification and sequencing of Internal Transcribed Spacers (ITS) region. The sequences were analyzed by BLAST in NCBI. The isolated fungi showed morphological characteristics of the *Fusarium*: violet mycelium, yellow-brown coloration in the culture medium, development of chlamydoconidia, macroconidia and microconidia. The ITS sequences showed



dichas plantas. Para ello se colectaron hojas, tallos y frutos de plantas con síntomas; los cuales se lavaron, cortaron, y colocaron sobre medio PDA. Bajo estas condiciones se obtuvieron colonias fúngicas que fueron usadas para obtener aislados monospóricos, los cuales fueron identificados mediante microcultivos y mediante la amplificación y secuenciación de las regiones génicas conocidas como Espaciadores Transcritos Internos (ITS). Dichas secuencias fueron analizadas mediante BLAST en NCBI. Los hongos aislados mostraron características morfológicas del género *Fusarium*: micelio color violeta, coloración amarillo-marrón en el medio de cultivo, desarrollo de clamidosporas, macroconidios y microconidios. Las secuencias ITS mostraron una cobertura del 100% y una similitud del 99.5% con el aislado de *Fusarium oxysporum* O309 (MT032690.1), confirmando la presencia de *Fusarium* en las plantas analizadas. Interesantemente, este es el primer reporte del aislamiento e identificación de *Fusarium* en plantas de vainilla cultivadas en el estado de S.L.P.

**Palabras clave:** *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, ITS.

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es una planta hemiepífita de la familia *Orchidaceae* originaria de Mesoamerica, cuyo centro de domesticación y diversificación se encuentra en el centro-norte del estado de Veracruz, México. Esta orquídea se desarrolla en climas cálidos a temperaturas de entre 20 y 30 °C, bajo condiciones específicas de luz y sombra, y requiere de un “tutor” es decir una planta o construcción artificial que le da sostén. La vainilla requiere de dos años de crecimiento vegetativo, y es hasta el tercer año de vida cuando desarrollan los primeros frutos. En México existen 874.50 ha sembradas con plantas de vainilla, las cuales producen 494.69 toneladas anuales de frutos procesados o

100% of query cover and 99.5% similarity with *Fusarium oxysporum* isolate O309 (MT032690.1), confirming the presence of *Fusarium* in the plants analyzed. Interestingly, this work is the first report of *Fusarium* isolation and identification in vanilla plants grown in the state of San Luis Potosi.

**Key words:** *Vanilla planifolia*, *Fusarium*, ITS.

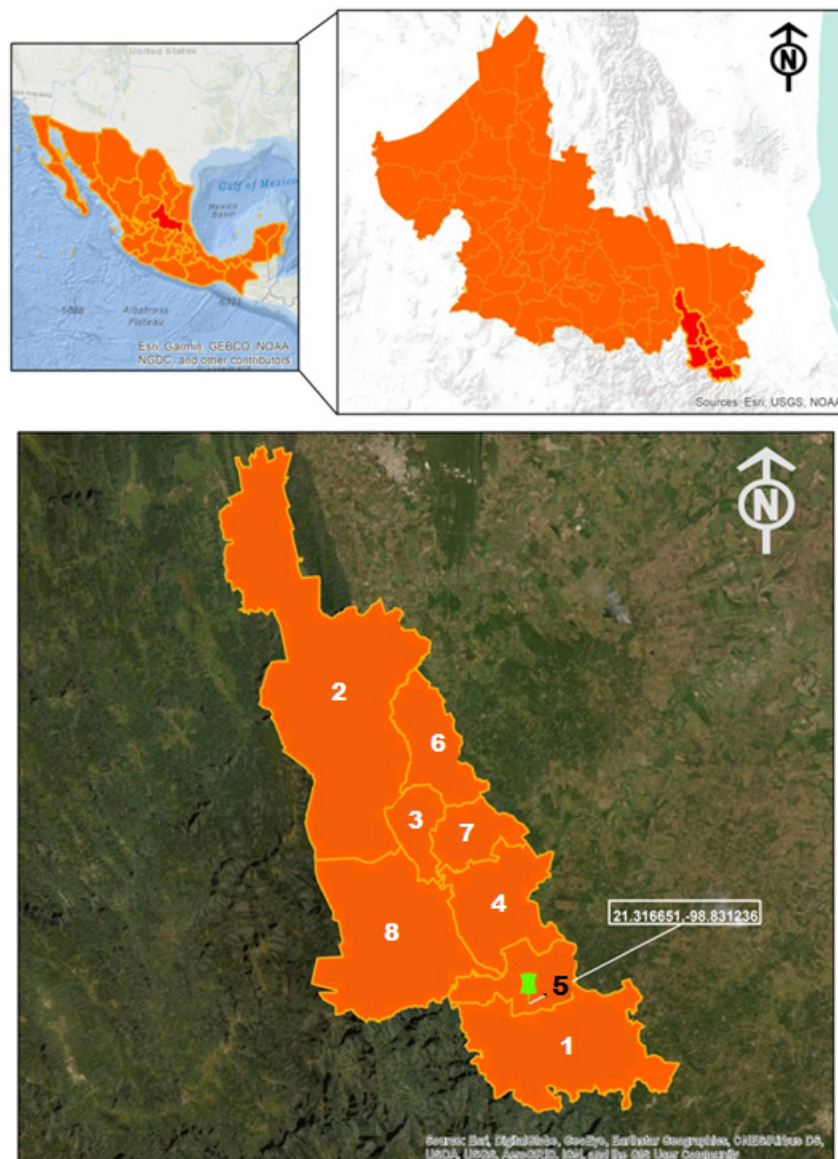
Vanilla (*Vanilla planifolia*) is a hemiepiphyte plant of the *Orchidaceae* family native to Mesoamerica, whose domestication and diversification center is located in the central-northern zone of the state of Veracruz, Mexico. This orchid grows in warm climates at temperatures between 20 and 30 °C, under specific light-shade conditions, and requires a “tutor,” that is, a plant or an artificial construction to support it. Vanilla plants require two years of vegetative growth, and the first fruits are not produced until the third year. In Mexico, vanilla plants are sown to 874.50 ha, where 494.69 annual tons of processed or “benefitted” fruits are harvested. The major vanilla producing states are Veracruz, Oaxaca, Puebla, and San Luis Potosí. In San Luis Potosí, the vanilla producing region is located in the southern Huasteca Potosina, which includes the municipalities of Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismón, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán and Xilitla (Figure 1).

It is known that vanilla plants can be susceptible to infection caused by the *Fusarium oxysporum* fungus, which produces leaf chlorosis and root and stem rot, and eventually the loss of the whole plant (Adame-García *et al.*, 2015). For several decades, vanilla (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews) has been cultivated under traditional systems in the southern Huasteca in San Luis Potosi, producing quality fruits with no apparent symptoms of infection. However, in the summer 2018, a group of vanilla

“Beneficiados”. Los estados con mayor producción son Veracruz, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí; en este último, la región vainillera se localiza en la Huasteca Potosina Sur que comprende los municipios de Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismon, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán y Xilitla (Figura 1).

Se conoce que las plantas de vainilla pueden ser susceptibles a la infección causada por el hongo *Fusarium oxysporum*, el cual produce clorosis en hojas y pudrición de la raíz y el tallo, llegando a ocasionar la pérdida total de la planta (Adame-García *et al.*, 2015). Desde hace varias décadas, se ha cultivado vainilla (*V. planifolia* Jacks. ex Andrews) bajo sistemas tradicionales en la Huasteca Sur de S.L.P., produciendo frutos de calidad y sin síntomas aparentes de infección. Sin embargo, en verano del 2018 un grupo de productores vainilleros de esta región observaron marchitez y clorosis, síntomas característicos de las infecciones causadas por hongos, en varias plantas de vainilla en edad de producción. Con el objetivo de identificar los posibles hongos asociados a dichas plantas, durante los meses de septiembre y octubre del mismo año se realizaron tres muestreos independientes de plantas cultivadas en dos parcelas de aproximadamente 1.5 ha, ubicadas en las coordenadas 21.316651,-98.831236 en la comunidad de Cuichiapa, Matlapa, S.L.P., México. En estas parcelas se cultiva vainilla a campo abierto y bajo el sistema llamado “casa malla”. Para los muestreos cada parcela fue dividida en cuatro cuadrantes, y se colectaron muestras de hojas, tallos y frutos de cinco plantas con síntomas en cada cuadrante. Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio en cámaras húmedas a 4 °C para ser procesadas. Los tejidos de vainilla fueron lavados con hipoclorito de sodio al 10%, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril, y se secaron con toallas de papel estériles. Se realizaron cortes transversales y longitudinales

producers from that region detected wilt and chlorosis, which are characteristic symptoms of infection caused by fungi, on several vanilla plants in production age. In order to identify the possible fungi associated with those plants, in September and October 2018, three independent samplings were conducted using plants from two fields of approximately 1.5 ha (coordinates 21.316651,-98.831236) at the community of Cuichiapa, Matlapa, San Luis Potosí, Mexico. In the sampling sites, vanilla is grown in the open field and under a system called “mesh house.” For the samplings, each plot was divided in four quadrants, and samples of leaves, stems, and fruits of five plants with infection symptoms from each quadrant were collected. The samples were placed in humid chambers at 4 °C and immediately taken to the laboratory to be processed. The vanilla tissues were washed with 10% sodium hypochlorite, rinsed with abundant sterile distilled water, and dried with sterile paper towels. Transverse and longitudinal cuts were made to the plant tissues and then small tissue fragments approximately 1 cm<sup>2</sup> in size were placed on agar-potato-dextrose (PDA) culture medium to which carbenicillin (100 µg mL<sup>-1</sup>) was added to prevent bacterial contamination. Three tissue segments were placed on each Petri dish with culture medium; all the samples were sown in triplicate and then incubated at 28 °C in darkness. The cultures were monitored every day for eight days until fungal colonies started to grow at the contact sites of the tissue sample and the culture medium. From the Petri dishes where fungi grew, mycelium samples were taken and placed on new Petri dishes with PDA medium to obtain cultures with the same colony morphology, and then from these obtain monosporic cultures which were later used to conduct morphological and molecular identification of fungi. To obtain monosporic cultures, the fungus spores were



**Figura 1.** Localización de los municipios productores de vainilla de la Huasteca Potosina Sur, y sitio de estudio. 1) Tamazunchale, 2) Aquismón, 3) Huehuetlán, 4) Axtla de Terrazas, 5) Matlapa, 6) Tancanhuitz de Santos, 7) Coxcatlán, 8) Xilitla. El número cinco en color negro indica el municipio donde se encuentra localizado el sitio de estudio de este trabajo.

**Figure 1.** Location of the vanilla producing municipalities in the southern Huasteca Potosina and study site. 1) Tamazunchale, 2) Aquismón, 3) Huehuetlán, 4) Axtla de Terrazas, 5) Matlapa, 6) Tancanhuitz de Santos, 7) Coxcatlán, 8) Xilitla. The number five in black indicates the municipality where the study site is located.

de los tejidos vegetales, después se colocaron pequeños segmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de tejido sobre agar papa dextrosa (PDA) adicionado con carbenicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) para evitar la contaminación por bacterias. Se colocaron tres segmentos de tejido por cada caja de Petri con medio de cultivo y todas las muestras fueron sembradas por triplicado, incubadas a 28 °C y en oscuridad. Los cultivos fueron observados diariamente durante ocho días, hasta observar el crecimiento de colonias fúngicas en los sitios de contacto de la muestra de tejido y el medio de cultivo. De las cajas de Petri donde se observó el desarrollo de hongos, se tomaron muestras del micelio y se colocaron en nuevas cajas de Petri con medio PDA para obtener cultivos con una misma morfología colonial y a partir de los cuales se obtuvieron cultivos monospóricos que posteriormente fueron usados para identificación morfológica y molecular de los hongos. Para la obtención de cultivos monospóricos, se colectaron las esporas del hongo con una solución estéril de Tween 80 al 0.1%, se preparó una suspensión de 100 esporas mL<sup>-1</sup>, y con una espátula Drigalsky se sembraron 100 µL de dicha suspensión en medio PDA. Las cajas de Petri fueron incubadas como se describió anteriormente hasta observar el inicio del crecimiento de colonias fúngicas, las cuales fueron transferidas a nuevas cajas de Petri con medio de cultivo. Tres de estas colonias provenientes de tres aislados diferentes de hongos con características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) similares fueron posteriormente utilizadas para la extracción de ADN, la amplificación de los ITS, y secuenciación de los mismos.

La identificación microscópica de los aislados fúngicos se realizó mediante la técnica de microcultivo. Las hifas y estructuras de los hongos fueron teñidas con azul algodón lactofenol (Sigma-Aldrich, 113741) y observadas directamente en un microscopio de campo claro (Carl Zeiss, Oberko-

collected using a 0.1% Tween 80 sterile solution; a suspension of 100 spores mL<sup>-1</sup> was prepared, and using a spatula Drigalski, 100 µL of the suspension were sown in PDA culture medium. The Petri dishes were incubated under the above described conditions until fungal colonies started to grow; the new colonies were transferred to new Petri dishes with culture medium. Three colonies from three different fungi isolates with similar morphological characteristics (macroscopic and microscopic) were later used to extract DNA and amplify and sequence the ITS.

The microscopical identification of the fungi isolates was performed using the microculture technique. The fungi hyphae and structures were stained with lactophenol cotton blue solution (Sigma-Aldrich, 113741) and directly observed under a light field microscope (Carl Zeiss, Oberkochen). Their morphological characteristics were determined using the taxonomic keys described by Leslie and Summerell (2006). Mycelium of the three different fungi isolates that had grown for six days in PDA solid culture medium was also collected and frozen with liquid nitrogen. The mycelium was pulverized with a mortar, and 100 mg were used to extract genomic DNA. The DNA was extracted using phenol-chloroform, washed with 70% ethanol, and re-suspended in sterile deionized water. The DNA integrity was observed using 1% ultrapure agarose gel electrophoresis (Sigma, MA) and its concentration was determined in a NanoDrop Thermo Scientific spectrophotometer (Waltham, MA). Later, the Internal Transcribed Spacers (ITS) region of the genomic DNA samples was amplified by PCR. The amplification was carried out using Taq DNA polymerase Platinum High Fidelity (Invitrogen, MA), the oligonucleotides ITS1 CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA and ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Bellemain *et al.* 2010), and 100 ng of genomic DNA of each fungus.

chen). Para determinar sus características morfológicas, se siguieron las claves taxonómicas descritas por Leslie y Summerell (2006). También se colectó y congeló con nitrógeno líquido, el micelio de tres diferentes aislados fúngicos a los seis días de crecimiento en medio sólido PDA. El micelio se pulverizó con la ayuda de un mortero, y se usaron 100 mg para la extracción de ADN genómico. El ADN se extrajo con fenol-cloroformo, se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en agua desionizada estéril. La integridad del ADN se observó mediante electroforesis en gel al 1% de agarosa ultrapura (Sigma, MA), y su concentración se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific (Waltham, MA). Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR de la región de Espaciadores Internos Transcritos (ITS) de las muestras de ADN genómico. Para ello se usó la Taq DNA polimerase Platinum High Fidelity (Invitrogen, MA), los oligonucleótidos ITS1 CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA e ITS2 GCTGCGTTCTTCATCGATGC (Bellemain *et al.* 2010), y 100 ng de DNA genómico de cada hongo. Las condiciones usadas en la PCR fueron las siguientes: temperatura inicial de desnaturalización a 94 °C durante 2 min; 35 ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 15 s, alineamiento a 55 °C por 30 s, extensión a 68 °C por 20 s; y una extensión final a 72 °C durante 1 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel al 1% de agarosa ultrapura (Thermo Fischer Scientific), se purificaron mediante el kit D4033 de Zymo Research (Irvine, CA), y se cuantificó su concentración en espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific (Waltham, MA). Los productos de PCR fueron secuenciados usando el oligonucleótido ITS1, y utilizando la plataforma de Sanger (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) en el Laboratorio de Servicios Genómicos de la UGA-CINVESTAV, en Irapuato Guanajuato, México. Las secuencias fueron editadas en el software BioEdit 7.2.5, y posteriormente

The conditions for PCR were as follows: initial denaturation temperature at 94 °C for 2 min; 35 cycles with denaturation at 94 °C for 15 s, alignment at 55 °C for 30 s, extension at 68 °C for 20 s, and one final extension at 72 °C for 1 min. The PCR products were visualized in 1% ultrapure agarose gel (Thermo Fischer Scientific), purified with a D4033 kit from Zymo Research (Irvine, CA), and their concentration was quantified in a NanoDrop Thermo Scientific spectrophotometer (Waltham, MA). The PCR products were sequenced with the ITS1 oligonucleotide and the Sanger platform (ABI 3730 XL, Applied Biosystem) in the Genomic Services Laboratory of UGA-CINVESTAV, in Irapuato, Guanajuato, Mexico. The sequences were edited with the BioEdit 7.2.5 software and subsequently analyzed with BLAST on the online site of the National Center for Biotechnology (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finally, spores of the three pure isolates were cryopreserved in tubes containing 25% glycerol at -80 °C in the strain pool of the Fungi Development and Differentiation Laboratory of CINVESTAV, Irapuato Unit.

Based on the guidelines to determine the damage caused to agricultural crops described by Gabriel *et al.* (2017), it was observed that approximately 70% of the vanilla plants with symptoms showed general wilt. In addition, some leaves and fruits had chlorotic areas and necrotic or rotten spots (Figures 2A and 2B). Interestingly, the leaves and fruits with symptoms were easily detached from the stem at different times during the sampling. Five days after the tissue segments were sown in PDA medium, the growth of filamentous fungal colonies was observed at the contact areas between the plant tissue and the culture medium. After obtaining fungal isolates with similar macroscopic characteristics, approximately 15 fungal isolates per sampling were taken, which were then used

analizadas mediante BLAST en el sitio en línea del National Center for Biotechnology (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Finalmente, esporas de los tres aislados puros fueron criopreservadas en tubos con glicerol al 25% y a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el cepario del laboratorio de desarrollo y diferenciación de hongos, del Cinvestav Unidad Irapuato.

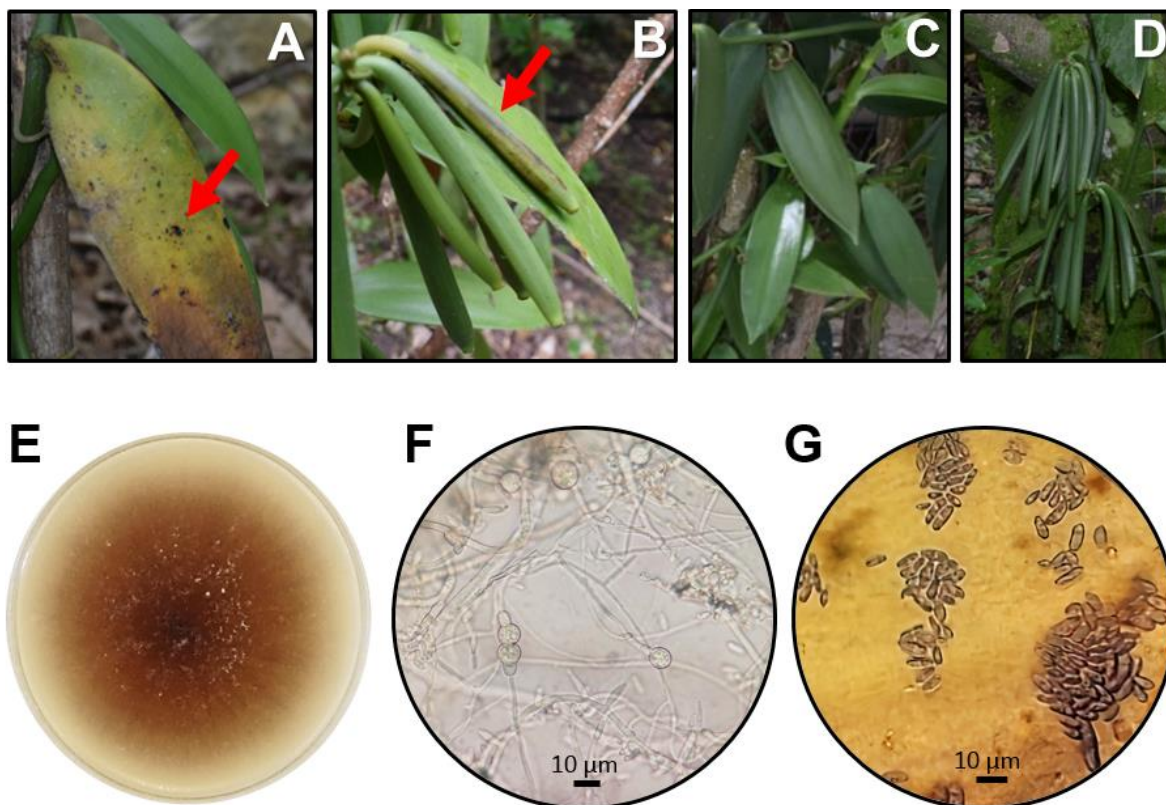
Considerando los lineamientos para determinación de daño en cultivos agrícolas descritos por Gabriel *et al.* (2017), se observó que aproximadamente un 70% de las plantas de vainilla con síntomas, presentaban marchitamiento general. Además, algunas de sus hojas y frutos presentaban zonas clorosis y puntos de necrosis o pudrición (Figura 2A y 2B). Interesantemente, las hojas y frutos con síntomas fueron fácilmente desprendidas del tallo, en los diferentes momentos de muestreo. A los cinco días post-siembra de los segmentos de tejido en medio PDA, se observó el crecimiento de colonias fúngicas filamentosas en las zonas de contacto entre los tejidos de planta y el medio de cultivo. Después de obtener aislados fúngicos con características macroscópicas similares, se obtuvieron aproximadamente 15 aislados fúngicos por muestreo, los cuales fueron usados para la obtención de cultivos monospóricos. Las colonias fúngicas puras mostraron desarrollo de micelio filamentosos, esparcido y abundante, con ligera acumulación de macroconidios y microconidios en el centro de la colonia. Se observó la producción de pigmentos color violeta por el anverso de la colonia y mostró una coloración amarillo-marrón por el reverso del medio de cultivo (Figura 2E). Bajo el microscopio se observó abundante micelio septado, hialino y después de una semana de crecimiento se observó el desarrollo de clamidosporas de aproximadamente  $8\ \mu\text{m}$  de diámetro (Figura 2F). Además, se observaron microconidios con forma arriñonada, u ovalada de aproximadamente  $7\ \mu\text{m}$  de largo (Figura 2G).

Las secuencias de ITS de los tres aislados fueron

to obtain monosporic cultures. The pure fungal colonies developed filamentous, scattered, and abundant mycelium, with slight accumulation of macronidia and microconidia in the middle of the colony. The production of pigments violet in color was observed on the front of the colony, and yellow-brown coloration on the back of the culture medium (Figure 2E). Abundant septate and hyaline mycelium was observed under the microscope and, after one week of growth, the formation of chlamydo spores approximately  $8\ \mu\text{m}$  in diameter was also observed (Figure 2F), as well as kidney-shaped or oval microconidia approximately  $7\ \mu\text{m}$  long (Figure 2G).

The ITS sequences of the three isolates were deposited in the GenBank of the NCBI with accession numbers MT573368, MT573369, and MT573370. Those sequences were approximately 230 nucleotides in length, and had 100% coverage and 99.55% similarity with the *Fusarium oxysporum* species complex, in particular with the O309 isolate reported in NCBI under code MT032690.1, which was isolated from roots, leaves and stems of pumpkin plants. These results prove that the three fungal isolates that were sequenced correspond to the same species of the *Fusarium* genus, but conducting more robust molecular and phylogenetic studies would make it possible to confirm the species, as well as the *forma specialis* (f. sp.) of the fungus, that is, the taxonomic group within the *F. oxysporum* species to which the isolated fungus belongs considering its range of host plants.

*Fusarium oxysporum* is a group with over 100 *formae speciales* (ff. spp.) of phytopathogenic and highly virulent fungi that can saprophytically survive for long periods in soil organic matter waiting for weak plants or hosts. Many of these fungi are pathogen agents of economically important plant species worldwide. In Mexico,



**Figura 2.** Síntomas de infección observados en las plantas de vainilla cultivada en la Huasteca Potosina Sur, e imágenes de la morfología del hongo *Fusarium* aislado. A, Hoja de vainilla con clorosis y puntos de necrosis (flecha roja). B, Frutos de vainilla con clorosis e importantes zonas de necrosis (flecha roja). C y D, Hojas y frutos de plantas de vainillas sin síntomas de infección. E, Crecimiento de *Fusarium* en medio PDA y en oscuridad. F, Micelio y clamidosporas de *Fusarium*. G, Microconidios de *Fusarium*.

**Figure 2.** Infection symptoms observed on vanilla plants cultivated in the southern Huasteca Potosina, and images of the isolated *Fusarium* fungus. A: Vanilla leaf with chlorotic and necrotic spots (red arrow). B: Vanilla fruits with chlorosis and important areas with necrosis (red arrow). C and D: Leaves and fruits of vanilla plants with no infection symptoms. E: *Fusarium* growth in PDA medium and in darkness. F: *Fusarium* mycelium and chlamydospores. G: *Fusarium* microconidia.

depositadas en GenBank de NCBI con los números de acceso MT573368, MT573369, y MT573370. Dichas secuencias presentaron una longitud de aproximadamente 230 nucleótidos y una cobertura del 100% y una similitud del 99.55% con el complejo de especies *Fusarium oxysporum*, en particular con el aislado O309 reportado en NCBI con la clave MT032690.1, el cual fue aislado de raíces, hojas y tallos de plantas de calabaza. Estos resul-

different species of the *Fusarium* genus have been reported in economically important crops with infection symptoms, for example, in Valencia var. orange trees and mango plants. Infection caused by *F. oxysporum* has also been previously reported on vanilla plants cultivated in the states of Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015) and Nayarit (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017), where plants that had been directly inoculated with the fungus isolates showed

tados comprueban que los tres aislados fúngicos secuenciados corresponden a una misma especie del género *Fusarium*, aunque estudios moleculares y filogenéticos más robustos permitirían confirmar la especie y la *forma specialis* (f. sp.) del hongo, es decir el grupo taxonómico dentro de la especie *F. oxysporum* a la cual pertenece el hongo aislado considerando su rango de plantas huéspedes.

*Fusarium oxysporum* es un grupo con más de 100 *formae speciales* (ff. spp.) de hongos fitopatógenos altamente virulentos, con la capacidad de sobrevivir saprofiticamente por largos periodos de tiempo en la materia orgánica del suelo en espera de plantas u hospederos débiles. Muchos de estos hongos son agentes patógenos de especies de plantas económicamente importantes en todo el mundo. En México, diferentes especies del género *Fusarium* han sido reportadas en cultivos de importancia económica con síntomas de infección, por ejemplo, en naranjos *var.* Valencia y en plantas de mango. Incluso, previamente ha sido reportada la infección por *F. oxysporum* en plantas de vainilla cultivadas en los estados de Veracruz (Adame-García *et al.*, 2015) y Nayarit (Casillas-Isiordia *et al.*, 2017), donde las plantas directamente inoculadas con aislados del hongo, mostraban importantes zonas de clorosis y necrosis o putrefacción; síntomas que también se observaron en las plantas utilizadas en este trabajo. En este trabajo se reporta por primera vez el aislamiento e identificación de *Fusarium* asociados a plantas de vainilla cultivadas en la región Huasteca del estado de San Luis Potosí. Por lo tanto, como perspectivas de este trabajo se plantea la infección de plantas de vainilla sanas con el aislado de *Fusarium* reportado, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Así como la realización de experimentos moleculares más robustos que permitan definir la *forma specialis* del hongo.

significant chlorotic and necrotic or rotten areas, symptoms that were also observed on the plants used in this study. This study reports for the first time the isolation and identification of *Fusarium* isolates associated with vanilla plants cultivated in the Huasteca region of the state of San Luis Potosí. Therefore, based on the results of this study, further research is proposed to evaluate infection on healthy vanilla plants using the reported *Fusarium* isolate, under *in vitro* and *in vivo conditions*, as well as conducting more robust molecular experiments that make possible to define the *forma specialis* of the fungus.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the Sociedad de Productores Vainilleros of the community of Cuichiapa, municipality of Matlapa, San Luis Potosí, for inviting us and supporting our activities in their fields. We also thank professor emeritus Dr. José Ruiz-Herrera of CINVESTAV Irapuato Unit for providing equipment from his laboratory to molecularly identify the fungi used in this study. We also thank B.S. in Geography José Joshua Josimar Silva Cortez for his support to draw the maps. DMS is a post-doctoral researcher with a scholarship granted by UC MEXUS CONACYT.

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

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sociedad de Productores Vainilleros de la comunidad de Cuichiapa municipio de Matlapa, S.L.P., por la invitación y facilidades para trabajar en sus parcelas. Agradecemos al Profesor Emérito Dr. José Ruiz-Herrera del



CINVESTAV Unidad Irapuato, por facilitarnos equipo de su laboratorio para la identificación molecular de los hongos. También agradecemos al Lic. en Geografía José Joshua Josimar Silva Cortez, por su apoyo en la elaboración de mapas. DMS es investigador postdoctoral con beca de UC MEXUS CONACYT.

## LITERATURA CITADA

- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu L, Ramo-Prado JM, Luna-Rodríguez M. 2015. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Botanical Sciences* 93(3):669-678. <https://doi.org/10.17129/botsci.142>
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10(189). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
- Casillas-Isordia R, Flores-de la Rosa F, Can-Chulim A, Luna-Esquivel G, Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Guerrero L, Luna-Rodríguez M. 2017. *Fusarium* sp. associated with *Vanilla* sp. rot in Nayarit Mexico. *Journal of Agricultural and Biological Science* 12(2):43-50. <https://hortintl.cals.ncsu.edu/articles/fusarium-sp-associated-vanilla-sp-rot-nayarit-mexico>
- Gabriel J, Ortuño N, Vera M, Castro C, Narváez W, Manobanda M. 2017. Manual para evaluación de daños de enfermedades en cultivos agrícolas. Primera Edición. Grupo COMPAS. Jipijapa, Ecuador. 53 p.
- Leslie JF, Summerell B. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Wiley Blackwell Publishing. Iowa, USA. <https://www.wiley.com/en-us/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>

# CP-Elvia 3, new white maize variety resistant to tar spot complex for Mexican subtropical areas

## CP-Elvia 3, nuevo maíz blanco resistente al complejo de la mancha de asfalto para subtrópico de México

Carlos De León-García de Alba, Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230. Autor para correspondencia: cdeleon@colpos.mx.

Recibido: 8 de Mayo, 2020.

Aceptado: 06 de Julio, 2020.

De León-García de Alba C. 2020. CP-Elvia 3, new white maize variety resistant to tar spot complex for Mexican subtropical areas. Mexican Journal of Phytopathology 38(3): 485-490.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2005-1

Primera publicación DOI: 03 de Agosto, 2020.

First DOI publication: August 03, 2020.

**Resumen.** En la producción de maíz, el agricultor se encuentra ante la alternativa de sembrar semilla comercial de maíz híbrido o de polinización libre, incluyendo variedades mejoradas o nativas. La semilla de maíz híbrido es costosa y es necesario comprarla en cada nuevo ciclo de siembra, mientras que una variedad mejorada de polinización libre ofrece varias ventajas ya que puede sembrarse por varios años, puede competir en rendimiento con los híbridos, es de menor costo y se difunde entre agricultores. Una variedad sintética ofrece ventajas adicionales sobre otras variedades incluyendo uniformidad en floración y fenotipo, mejor rendimiento de grano y resistencia a enfermedades. En éste trabajo se muestra la obtención de la variedad

**Abstract.** In maize production, farmers face the alternative of planting commercial hybrid maize seed or an open pollinated variety including an improved variety or a native local variety. Hybrid maize seed is costly and new seed has to be planted each season, while seed of an improved open pollinated variety can be planted for several years, competes in grain yield with a hybrid, it is of low cost, and can be disseminated between farmers. The advantages of an open pollinated synthetic variety over a normal open pollinated variety are higher grain yield and uniformity in flowering time and phenotype. This work presents activities resulting in obtaining the open pollinated synthetic variety CP-Elvia 3 with good agronomic characters and resistance to the tar spot complex following an  $S_1$  recurrent selection scheme.

**Key words:** synthetic variety,  $S_1$  recurrent selection, tar spot.

The 'tar spot' disease in maize, caused by *Phyllachora maydis*, was initially identified in samples from Mexico (Maublanc, 1905;

sintética de maíz de grano blanco CP-Elvia 3, con buen comportamiento agronómico y resistente al complejo de mancha de asfalto y que se obtuvo mediante un programa de selección recurrente de familias S<sub>1</sub>.

**Palabras clave:** variedad sintética, selección recurrente de familias S<sub>1</sub>, mancha de asfalto.

La enfermedad del maíz ‘mancha de asfalto’ causada por *Phyllachora maydis*, fue inicialmente identificada en muestras originarias de México (Maublanc, 1905; CIMMYT, 2004). Actualmente, se ha propuesto el “complejo mancha de asfalto”, debido a la asociación etiológica de los hongos *Phyllachora maydis* y *Monographella maydis* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). La enfermedad, en etiología simple o como complejo, se ha diseminado o reemergido por todo México y en otros países tanto en áreas productoras de maíz de clima cálido y húmedo como en regiones subtropicales y hasta 2600 msnm (Hock *et al.*, 1989; Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020); pero su daño principal se presenta en cultivos de maíz de las costas de Tabasco, Veracruz, Jalisco, Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Guerrero y Jalisco, además se reportan daños en otras regiones no costeras del altiplano de México como Morelos, México e Hidalgo, pero su distribución puede ser aún más extensa (Hock, 1991). Por otra parte, *Coniothyrium phyllachorae* también se encuentra asociado al ‘complejo mancha de asfalto’ considerado como hiperparásito de *Phyllachora* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). La enfermedad, en cualquiera de su condición etiológica, causa pérdidas de producción de acuerdo a la susceptibilidad y la etapa fenológica del maíz en que se presenta. La enfermedad, en condición de complejo, inicia con la presencia de *P. maydis*, con la producción

(CIMMYT, 2004). Currently, the name of “tar spot complex” has been proposed, due to the etiological association of the fungi *Phyllachora maydis* and *Monographella maydis* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). The disease, in a simple etiology or as a complex, has spread throughout Mexico and in other countries, in maize-producing areas with warm weather, cultivated in subtropical regions as high as 2600 masl (Hock *et al.*, 1989); yet its main damage is found in maize grown in the coasts of Tabasco, Veracruz, Jalisco, Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Michoacán and Guerrero, as well as in other non-coastal regions of the Mexican highlands, such as Morelos, the State of Mexico and Hidalgo, although its distribution can be more extensive (Hock, 1991). On the other hand, *Coniothyrium phyllachorae* is also related to the ‘asphalt spot complex,’ considered a hyperparasite of *Phyllachora* (Garrido-Ramírez, E. Com. Personal, 2020). The disease, in any of its etiological conditions, causes yield losses, depending on the susceptibility of the cultivar planted and the phenological stage of the maize plant when the infection occurs. The disease, under the condition of a complex, begins with the presence of *P. maydis*, with the production of a hard, raised, shiny, black spots on the maize leaves, with the appearance of asphalt, followed by the appearance of *M. maydis* around the asphalt spot (Quiroga-Madrigal *et al.*, 2017). The development of the foliar infection spreads from the lower leaves to the higher ones, and in advanced stages of development after flowering, the infection results in a severely blighted foliage (Figure 1A). A severe infection may affect the development and quality of the grain (Figure 1B).

As an alternative to minimize the effects of the tar spot on maize grain yield, attempts were made to generate synthetic, open-pollinated maize varieties with good agronomic characters and

de una manchita negra, brillante, levantada y dura sobre hojas de maíz, con apariencia al asfalto, seguida de la aparición de *M. maydis* alrededor de la mancha de asfalto (Quiroga-Madrugal *et al.*, 2017). El desarrollo de la infección foliar avanza de hojas inferiores hacia las superiores y, en estados avanzados de desarrollo del cultivo después de floración, la infección resulta en un follaje severamente atizado (Figura 1A). Infección severa puede afectar la formación y calidad del grano (Figura 1B).

Como alternativa para minimizar los efectos de la mancha de asfalto en el rendimiento de grano de maíz, se buscó generar variedades sintéticas de polinización libre de maíz con buenas características agronómicas y resistencia genética a la enfermedad. La resistencia genética se considera la forma más eficiente y económica de control de esta y otras enfermedades de los cultivos (Pandey y Gardner, 1992).

El programa de mejoramiento para desarrollar germoplasma de maíz con caracteres agronómicos

genetic resistance to the disease. Genetic resistance is considered the most efficient and inexpensive way to control this and other crop diseases (Pandey and Gardner, 1992).

The breeding program to develop maize germplasm with desirable agronomic traits and genetic resistance to the tar spot complex began with the development of a maize population of white endosperm with a wide genetic base. This base population was formed in 2008, by recombining 37 different white grain maize genotypes with adequate agronomic traits, including commercial hybrids and improved and native varieties collected in Mexican highlands. These materials were recombined in isolated plots for two cycles to achieve genetic stability. The recombination plots were established in a farmer's field located at the *ejido* of Santa Teresa Tiloxtoc, in Valle de Bravo, State of Mexico (19° 43' N, 98° 53' W, 1700 masl). After the second recombination cycle ( $C_0$ ) an  $S_1$  recurrent selection program was initiated (Pandey



**Figura 1. Signos y síntomas del ‘complejo mancha de asfalto’; A) signos y síntomas en hojas de maíz y B) daños en mazorca de maíz (Fotos: C. De León).**

**Figure 1. Signs and symptoms of the ‘tar spot complex’; A) signs and symptoms on maize leaves and B) damage on maize ear (Photos: C. De León).**

deseables y resistencia genética a la mancha de asfalto, se inició con la integración de una población de maíz de amplia base genética de endospermo blanco. Esta población base de grano blanco, se formó en 2008, recombinando 37 diferentes genotipos de maíz de grano blanco con buen comportamiento agronómico incluyendo híbridos comerciales, variedades mejoradas y nativas colectadas en el altiplano de México. Estos materiales se recombinaron en lotes aislados por dos ciclos para lograr su estabilidad genética. Los lotes de recombinación se establecieron en terreno de un agricultor en el ejido de Santa Teresa Tiloxtoc, en Valle de Bravo, Estado de México (19° 43' N, 98° 53' W, 1700 msnm). Después del segundo ciclo de recombinación ( $C_0$ ) se inició un programa de selección recurrente de familias  $S_1$  (Pandey y Gardner, 1992), autofecundando aproximadamente 400 plantas deseables y generando líneas  $S_1$  en cada ciclo de mejoramiento. En el  $C_3$  de mejoramiento, se sembró semilla de familias  $S_1$  seleccionadas, bajo la modalidad de mazorca por surco, en un vivero establecido en lote de un agricultor en Metztlán, Hidalgo (20° 45' N; 98° 39' W; 900-2700 msnm), en donde la enfermedad mancha de asfalto se presenta en forma severa en condiciones naturales. Así, las líneas se evaluaron y seleccionaron por resistencia a la mancha de asfalto en condiciones de incidencia severa de campo.

En éste vivero, se seleccionaron siete grupos de 10-12 líneas  $S_1$  con sincronía en días a floración masculina y femenina (días a floración femenina – días a floración masculina), altura de planta y mazorca (índice de altura = producto de dividir altura de mazorca entre altura de planta), aspecto de planta, desarrollo fenológico, tiempo a cosecha y resistencia a enfermedades foliares que se midieron con valores de severidad de 1 (no daño) a 5 (daño severo) por severidad de daño en el follaje ocasionado por mancha de asfalto y enfermedades

and Gardner, 1992), self-pollinating approximately 400 desirable plants and generating  $S_1$  lines in each breeding cycle. In the  $C_3$  breeding cycle, seed of selected  $S_1$  families were planted, ear to row, in a breeding nursery established in farmer's field in Metztlán, Hidalgo (20° 45' N; 98° 39' W; 900-2700 masl), where the tar spot disease appears severely under natural infection. In these conditions, the lines were evaluated and selected by resistance to the tar spot complex under severe natural field conditions.

In this nursery, seven groups of 10-12  $S_1$  lines were selected with synchronized days to male and female flowering (days to female flowering – days to male flowering should be equal to zero), plant and ear height (height index = product of the division between ear height and plant height), plant aspect, phenological development, time until harvest and resistance to foliar diseases measured with severity values of 1 (no damage) to 5 (severe damage) by severity of damage to the foliage caused by asphalt spot and diseases such as common rust, gray spot, *Curvularia*, and others. Each of these seven groups of lines were recombined in a diallel to generate the  $F_1$  of new experimental synthetic varieties which were advanced to  $F_2$  to be included in agronomical trials with other varieties obtained and commercial varieties to measure their agronomic performance, disease resistance and grain yield.

In two yield tests established in 2016 and 2017 in the *ejido* Cinta Larga (CL), in Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' N, 99° 13' W, 2100 masl) with  $F_2$  seed of experimental varieties obtained from lines of the  $C_3$ - $S_1$  cycle, experimental variety CL16-TSR-2 was chosen for its outstanding traits over other materials included in the same trials (Table 1). In 2017, these varieties were also planted in a trial with randomized blocks with three replications in Metztlán, Hidalgo, to evaluate their resistance to tar spot (Table 1). In late 2017, this variety

incluyendo roya común, mancha gris, *Curvularia*, entre otras. Cada uno de éstos siete grupos de líneas se recombinaron en un dialelo para generar la F<sub>1</sub> de nuevas variedades sintéticas experimentales que se avanzaron a F<sub>2</sub> para ser incluidas en ensayos agrónomicos con otras variedades obtenidas e híbridos comerciales y medir su comportamiento agronómico y rendimiento de grano.

En dos ensayos de rendimiento establecidos en 2016 y 2017 en el ejido Cinta Larga (CL) en Mixquiahuala, Hidalgo (20° 13' N, 99° 13' W, 2100 msnm) con semilla F<sub>2</sub> de variedades experimentales obtenidas de líneas del ciclo C<sub>3</sub>-S<sub>1</sub>, la variedad experimental CL16-TSR-2 fue seleccionada por sus caracteres sobresalientes sobre otros materiales incluidos en los mismos ensayos (Cuadro 1). En 2017, estas mismas variedades se sembraron en un ensayo en bloques al azar con tres repeticiones en Metztitlán, Hidalgo, para evaluar su resistencia a la mancha de asfalto (Cuadro 1). A fines de 2017, ésta variedad se propuso ante el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semilla (SNICS)

was proposed to the National Seed Inspection and Certification Service (SNICS) for its registration and approval as the new variety CP-Elvia 3, which was given to the Colegio de Postgraduados, which was granted the title of Breeder Num. 2167 for its distribution and commercialization (Figure 2).

The synthetic maize variety CP-Elvia 3 (CL16-TSR-2) (Table 1) has a high grain yield (72% higher than the commercial control), it has a good floral synchrony, medium plant height, and its seed is affordable (approximately half the cost of a hybrid seed), it can be replanted for several years, its seed is easily disseminated between farmers and it is genetically resistant to the tar spot complex.

The impact of this project on society is the increase in the income of farmers, due to the low cost of the seed and the increase in grain yield due to its good behavior and resistance to the disease avoiding its dissemination in maize producing areas.

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

**Cuadro 1. Comportamiento agronómico de la variedad sintética de maíz blanco CP-Elvia 3 (CL-17). Segundo ensayo para registro en SNICS.**

**Table 1. Agronomic characters of the synthetic white maize variety CP-Elvia 3 (CL-17). Second trial for registration in SNICS.**

| Genealogía | Origen (CL-16) | Sincronía floral    | Índice de altura | Aspecto de planta (1-5) <sup>2</sup> | Aspecto de mazorca (1-5) | Rendimiento de grano (t ha <sup>-1</sup> ) | Severidad mancha asfalto (1-5) (Metztitlán, Hidalgo) |
|------------|----------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| CL16-INS   | 2 #            | 3.0 ab <sup>y</sup> | 0.5 a            | 2 a                                  | 1.8 a                    | 6.9 ab                                     | 2.7 b                                                |
| IBS 1      | 5 #            | 3 ab                | 0.46 a           | 2 a                                  | 1.8 a                    | 7.4 ab                                     | 4.0 bc                                               |
| ITSR 1     | 7 #            | 3.6 b               | 0.46 a           | 2.3 a                                | 2 a                      | 8.6 ab                                     | 3.3 bc                                               |
| ITSR 2     | 8 #            | 2.6 ab              | 0.46 a           | 1.8 a                                | 2 a                      | 7.6 ab                                     | 1.5 a                                                |
| CL16-TSR   | 12-2#          | 1.8 a               | 0.69 a           |                                      |                          | 12.4 a                                     | 1.1 a                                                |
| CL16-TSR-2 | 12-1#          | 2.2 a               | 0.71 a           |                                      |                          | 11.6 a                                     | 1.8 a                                                |
| Testigo    | BG1384W        |                     | 0.67 a           |                                      |                          | 8.9 ab                                     | 3.2 bc                                               |
| Promedio   |                | 2.7                 | 0.56             |                                      |                          | 7.78                                       |                                                      |
| DMS (5%)   |                | 1.24                | 0.28             | 1.52                                 | 1.52                     | 4.33                                       |                                                      |
| CV (%)     |                | 0.65                | .009             | 0.28                                 | 0.28                     | 20.3                                       |                                                      |

<sup>y</sup>Separación de medias por Tukey (Valores seguidos por letras similares indican no diferencias entre ellas). <sup>2</sup>1= muy bueno; 5 = muy malo / <sup>y</sup>Mean separation using Tukey (Values followed by same letters indicate no differences between them). <sup>2</sup>1= very good; 5= very bad.

para su registro y aprobación como la nueva variedad CP-Elvia 3, la cual fue entregada al Colegio de Postgraduados al que se le asignó el título de Obtentor No. 2167 para su distribución y comercialización (Figura 2).

La variedad sintética de maíz CP-Elvia 3 (Cuadro 1) es de alto rendimiento de grano (72% mayor que el testigo comercial), tiene buena sincronía floral, tiene planta de altura media y su semilla es de bajo costo (aproximadamente la mitad del costo de semilla híbrida), se puede volver a sembrar por varios años, facilita la diseminación de su semilla entre agricultores y posee resistencia genética al complejo de la mancha de asfalto.

El impacto de éste proyecto hacia la sociedad, es el incremento de ingreso del agricultor debido al bajo costo de la semilla y al incremento de la productividad del maíz por su buen rendimiento y resistencia a la enfermedad que puede evitar su diseminación en áreas productoras de maíz.



**Figura 2. Semilla de la variedad sintética CP-Elvia 3.**  
**Figure 2. Seeds of the synthetic variety CP-Elvia 3.**

## LITERATURA CITADA

- CIMMYT. 2004. Enfermedades de maíz. Una guía para identificación en el campo. 4ª ed. CIMMYT, El Batán, México.
- Hock J, Kranz J y Renfro BL. 1989. El “complejo mancha de asfalto” de maíz, su distribución geográfica, requisitos ambientales e importancia económica en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7: 129-135.
- Hock J. 1991. Requisitos ambientales para el desarrollo del “complejo de la mancha de asfalto” que ataca al maíz en México. *Phytopathology* 81: 643-645.

- Quiroga-Madrigal RR, Garrido-Ramírez ER, Rosales-Esquinca MA y Salazar-Pinacho WM. 2017. Manejo integrado del complejo mancha de asfalto del maíz en México. Manual técnico. Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 39 p.
- Maublanc A. 1904. Espèces nouvelles de Champignons inferius. *Bulletin Societe Mycologie Francaise* 20: 72.
- Pandey S. and Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Advances Agronomy* 28: 1-87.