

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

Mexican Journal of Phytopathology

Volumen 30, Número 1, 2012



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

La Revista Mexicana de Fitopatología (ISSN-0185-3309) está incluida en ISI-Thomson Scientific Master Journal List, REDALYC, LATINDEX, AGRIS, BIOSIS, PERIODICA, Review of Plant Pathology y en Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del CONACyT.

Política Editorial

La Revista Mexicana de Fitopatología (RMF) es una revista internacional que se publica semestralmente por la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF). Se distribuye a 61 bibliotecas dentro de México y 93 más en 57 países. Publica artículos de investigación original concernientes a aspectos básicos y aplicados de fitopatología. Se incluyen tópicos generales relacionados con estudios de protección vegetal, así como de hongos, bacterias virus y nematodos fitopatógenos. Artículos de revisión, notas fitopatológicas, descripción de variedades y cartas al editor, también pueden someterse para su publicación. Todos los manuscritos se deben preparar en español o en inglés y enviarse al Editor en Jefe. La guía para autores se encuentra en la página de la SMF (www.sociedadmexicanadefitopatologia.org) y aparecerá en el primer número de cada volumen. La comunicación será exclusivamente a través del autor para correspondencia. Para su publicación, los escritos deberán ser revisados y aprobados por árbitros y editores especializados. Los trabajos publicados aparecerán en español e inglés, sin costo por la traducción. El cargo de publicación por página es de \$500 pesos mexicanos. La página a color (una o varias fotos) tiene un costo de \$750 pesos mexicanos. El costo de sobretiros o separatas adicionales es de \$50 pesos mexicanos cada uno si se ordenan más de cinco y de \$70 menos de cinco (incluye envío por correo ordinario). La suscripción anual de la RMF es de \$600 pesos individual y de \$1,000 pesos para compañía, biblioteca o institución; para extranjeros es de US\$60 individual y US\$100 para compañía, biblioteca o institución, lo cual incluye costos de envío por correo aéreo. Los manuscritos o cualquier tipo de dibujos o fotografías sometidas a la RMF y aceptados para publicación serán propiedad de la SMF.

Editorial Policy

The Mexican Journal of Phytopathology (MJP) is an international journal published biannually by the Mexican Society of Phytopathology, AC [Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. (SMF)]. It is distributed to 61 libraries in Mexico and 93 more in 57 countries. It publishes original research studies concerning basic and applied aspects of plant pathology. General topics included are related to plant protection studies, as well as fungi, bacteria, viruses and pathogenic nematodes. Review articles, phytopathological notes, description of varieties and letters to the editor, may also be submitted for publication. All manuscripts should be prepared in English or Spanish and sent to Editor in Chief. The Author's Guide can be found on the SMF webpage (www.sociedadmexicanadefitopatologia.org) and will appear in the first issue of each volume. Communication will be exclusively through the corresponding author. For its publication, the manuscripts must be reviewed and approved by specialist reviewers and editors. Published papers will appear in Spanish and English at no cost for the translation. The publication charge per page is \$500 pesos. Color pages (one or more photos) cost \$750 pesos. The cost of additional reprints is \$50 pesos if you order more than five and \$70 pesos for less than five (includes shipping by regular mail). Annual subscription to the journal is \$600 pesos for individuals and \$1,000 pesos for companies, libraries or institutions; the charge to foreigners is USD\$60 for individuals and USD\$100 for companies, libraries or institutions, which includes airmail shipping. Manuscripts or any type of drawings, photographs or slides submitted to the MJP and accepted for publication are property of the SMF.

Correspondencia: Carretera Matamoros-Reynosa, km 61, Río Bravo, C.P. 88900, Tam., México.
Teléfono/Fax: (899) 9341045; correo y página de la SMF: revmexfitopatologia@prodigy.net.mx,
<http://sociedadmexicanadefitopatologia.org/>

Revista Mexicana de Fitopatología
Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C.

Editor en Jefe (Editor in Chief)

Arturo Díaz Franco. INIFAP, México

Editores Adjuntos (Senior Editors)

Silvia Patricia Fernández Pavía. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Emma Zavaleta Mejía. Colegio de Postgraduados, México

Miguel Ángel Apodaca Sánchez. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte, México

María Cristina Julia Pérez Reyes. UNAM, México

Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP, México

Comité Editorial Internacional (International Editorial Advisory Board)

R. Kenneth Horst. Cornell University, USA

Eduardo R. French. Programa Internacional de la Papa (Retirado), Perú

Rodrigo Valverde. Louisiana State University, USA

Charles L. Wilson. USDA-ARS, Appalachian Fruit Research Station, USA

André Lévesque. Agriculture and Agri-Food, Canada

Rafael M. Jiménez Díaz. Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, España

Terence L. Robinson. Cornell University, USA

Kenneth Evans. Rothamsted Research, USA

Louis K. Prom. USDA-ARS Southern Plains Research Center, USA

Liliana Aragón Caballero. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú

Rodrigo Rodríguez-Kábana. Auburn University, USA

Anna Maselli. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Venezuela

Editores Asociados (Associate Editors)

Isidro Humberto Almeyda León. INIFAP

Luis Pérez Moreno. Universidad Autónoma de Guanajuato

Raúl Rodríguez Guerra. INIFAP

Rodrigo Valverde. Louisiana State University

Jean-Guillaume Bertault. Institut National de la Recherche Agronomique

Guillermo Fuentes Dávila. INIFAP

Damaris Godines Vidal. Colegio de Posgraduados

Daniel Nieto Ángel. Colegio de Posgraduados

Javier Ireta Moreno. INIFAP

Emma Zavaleta Mejía. Colegio de Posgraduados

Didiana Gálvez López. INIFAP

Comité Editorial Administrativo (Editorial and Business Staff)

Arturo Díaz Franco

Ivonne Aracely Sáenz Ortega

Noé Montes García

Laura Dolores Guzmán Ureña

María de Jesús Yáñez Morales

Perla Montes Rodríguez

Javier Ireta Moreno

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGIA

Volumen 30, número 1, 2012

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS (Scientific articles)

Respuesta *in vitro* de Aislados de *Fusarium oxysporum* a la Aplicación de Isotiocianatos. {*In vitro* Response of *Fusarium oxysporum* Isolates to Isothiocyanates Application}. Ramos GM, Hernández LM, Barrera NLL, Bautista BS, Troncoso RR y Bosquez ME.

Rizobacterias Aisladas del Trópico Húmedo con Actividad Antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, Evaluación Cuantitativa e Identificación Molecular. {Quantitative Evaluation and Molecular Identification of Rhizobacteria from Tropical Region, Antagonistic Against *Colletotrichum gloeosporioides*}. Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ.

Detección del Virus Tristeza de los Cítricos Mediante Anticuerpos Contra la Proteína Recombinante p25 de la Cápside Bajo un Sistema de Inmunoimpresión. {Detection of *Citrus tristeza virus* with Antibodies Developed to the Recombinant p25 Capsid Protein by Direct Tissue Blot Immunoassay}. Iracheta CMM, Arrieta GLC y Rocha PMA.

Influencia del Tipo de Muestra en la Inmunodetección del Virus del Mosaico de la Malanga. {Sample-Type Influence on Dasheen Mosaic Virus Immunodetection}. González VRE, González RJE y Cabrera MD.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN (Review articles)

Mecanismos de Defensa del Chile en el Patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. {Chili Defense Mechanisms in the *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* Pathosystem}. Castro RA, Fernández PSP y Osuna AP.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS (Phytopathological notes)

Cambios Morfológicos en Células de Chile CM334 Inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. {Morphological Changes in Cells of Chilli CM334 Inoculated with *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*}. Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI, Zavaleta ME, Mora AMA y Guevara OL.

Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (*Opuntia ficus-indica*) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio. {Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladodio}. Suaste DA, Rojas MRI, Zavaleta ME y Pérez BD.

Análisis de la Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Banano a los Fungicidas Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin. {Sensitivity Analysis *in vitro* of *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka of Banana to the Fungicides Benomyl, Propiconazole and Azoxystrobin}. Manzo SG, Carrillo MH, Guzmán GS y Orozco SM.

Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en Nemátodos de Vida Libre Asociados a la Rizósfera de Papas Cultivadas en la Región del Cofre de Perote, Veracruz, México. {Effect of *Paecilomyces lilacinus* in Free-Living Nematodes to the Rhizosphere Associates Potatoes Grown in the Cofre of Perote Region, Veracruz, Mexico}. Carrión G y Desgarenes D.

DESCRIPCIÓN DE VARIEDADES (Description of varieties)

'Sáwali Oro C2008', Nueva Variedad de Trigo Cristalino para el Noroeste de México. {'Sáwali Oro C2008', New Durum Wheat Cultivar for Northwest Mexico}. Figueroa LP, Fuentes DG, Valenzuela HV, Chávez VG, Félix FJL y Mendoza LJA.

INFORMACIÓN PARA AUTORES

**Guía para Autores
Guide for Authors**

In vitro Response of *Fusarium oxysporum* Isolates to Isothiocyanates Application

Respuesta *in vitro* de Aislados de *Fusarium oxysporum* a la Aplicación de Isotiocianatos

Margarita Ramos García, Mónica Hernández López, Laura Leticia Barrera Necha, Silvia Bautista Baños*, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carr. Yautepec-Jojutla km 6 San Isidro, Calle CEPROBI No. 8, Yautepec, Mor., CP 62731, México; **Rosalba Troncoso Rojas**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Apdo. Postal 1735, Carr. a la Victoria km 0.6 Col. Ejido La Victoria, Hermosillo, Son., CP 83000, México; **Elsa Bosquez Molina**, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186 Michoacán y la Purísima, Col. Vicentina, CP 09340, México, D.F. Correspondencia: e-mail: sbautis@ipn.mx

(Recibido: Mayo 16, 2011 Aceptado: Julio 06, 2011)

Ramos GM, Hernández LM, Barrera NLL, Bautista BS, Troncoso RR y Bosquez ME. 2012. *In vitro* response of *Fusarium oxysporum* isolates to isothiocyanates application. Revista Mexicana de Fitopatología 30:1-10

Resumen. Algunas cepas de *Fusarium oxysporum* son patógenas en diferentes especies vegetales durante sus etapas pre y postcosecha y son responsables de serias pérdidas económicas. El manejo de este hongo es generalmente mediante la ayuda de químicos peligrosos al medio ambiente. Otros compuestos biodegradables como los isotiocianatos (ITCs) han demostrado su potencial nematocida, bactericida y fungicida. En esta investigación, el efecto fungitoxico *in vitro* de los ITCs de alilo, bencilo, fenilo, feniletilo y propilo a concentraciones de 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, y 2.0 μL^{-1} se evaluaron sobre varias cepas de *F. oxysporum* aisladas de cormos de gladiolo, semillas de jatropha, hojas de mango y frutos de papaya y coahuayote. El crecimiento micelial diario y la germinación conidial de estos cinco aislados se evaluaron en diferentes períodos de incubación. Para verificar la respuesta fungicida o fungistática de los ITCs, estos se sembraron únicamente en medio nutritivo. En general, los conidios de *F. oxysporum* fueron más sensibles que el micelio a los ITCs. Al final del período de incubación, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el crecimiento micelial de los hongos tratados con los ITC comparados con los no tratados. Los aislados de *F. oxysporum* más sensibles al ITC de bencilo fueron los que se obtuvieron de hojas de mango y frutos de coahuayote. Los aislados de mango también fueron sensibles a ITC de feniletilo. A concentraciones entre 1.0 a 2.0 μL^{-1} , el ITC de alilo también suprimió el crecimiento de *F. oxysporum* aislados de frutos de papaya y coahuayote. Con excepción del ITC de fenilo, en el aislamiento del fruto de coahuayote, la germinación

conidial de *F. oxysporum* no ocurrió bajo la influencia de los ITCs restantes al mismo tiempo que el tratamiento control alcanzó una germinación del 100%. En general, la concentración aplicada no influyó sobre el crecimiento de los hongos. Una vez que la fuente de los ITCs se quitó de las cajas Petri, el crecimiento y la germinación de los hongos se reinició. En conclusión, los ITCs probados fueron diferentes en su bioactividad mientras que el micelio y los conidios de los diferentes aislados de *F. oxysporum* variaron en susceptibilidad y tolerancia a estos compuestos.

Palabras clave adicionales: Carica mexicana, C. papaya, Gladiolus sp., Jatropha curcas, Mangifera indica.

Abstract. Some strains of *Fusarium oxysporum* are pathogenic to different plant species during their pre- and postharvest stages and are responsible for serious economic losses. Management of this fungus is usually with the aid of environmentally-harmful chemicals. However, other biodegradable compounds such as isothiocyanates (ITCs) have demonstrated their nematocidal, bactericidal and fungicidal potential. In this research, the *in vitro* fungitoxic effect of ITCs of allyl, benzyl, phenyl, phenylethyl and propyl at concentrations of 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μL^{-1} was tested on various isolates of *F. oxysporum* obtained from gladiolus corms, jatropha seeds, mango leaves, papaya and coahuayote fruit. Daily mycelial growth and conidial germination of these five isolates was evaluated at different incubation period. To verify the fungistatic or fungicidal response, the ITCs were removed and the fungi were re-grown only in nutrient media. As average, conidia of *F. oxysporum* were more sensitive to the ITCs than mycelium. At the end of the incubation period, there were significant differences ($P < 0.05$) in mycelia growth of the ITC-treated fungi compared to the untreated ones. The *F. oxysporum* isolates that were the most sensitive to the benzyl

ITC were those obtained from mango leaves and coahuayote fruit. The mango isolate was also very sensitive to phenylethyl ITC. At concentrations ranging from 1.0 to 2.0 $\mu\text{l L}^{-1}$, the allyl ITC also suppressed the growth of *F. oxysporum* isolated from papaya and coahuayote fruit. Except for the phenyl ITC in the coahuayote fruit, conidial germination of *F. oxysporum* did not occur under the influence of the remaining ITCs, whilst in the control treatment germination reached 100%. As average, the concentration applied did not influence the growth of the fungi. Once the source of the ITCs was removed from the Petri plate re-growth and germination took place in all fungi. In conclusion, the ITCs tested differed in bioactivity and the mycelium and conidia of the different *F. oxysporum* isolates varied in their susceptibility and tolerance to these compounds.

Additional keywords: *Carica mexicana*, *C. papaya*, *Gladiolus* sp., *Jatropha curcas*, *Mangifera indica*.

Résumé. Certaines souches de *Fusarium oxysporum* sont pathogènes de différentes espèces végétales avant et après leur récolte, et sont responsables de graves pertes économiques. La gestion de ce champignon passe souvent par l'utilisation de produits chimiques dangereux pour l'environnement. Toutefois, d'autres composés biodégradables tels que les isothiocyanates (ITCs) ont montré leur potentiel nématocide, bactéricide et fongicide. Dans cette recherche, l'effet fongitoxique *in vitro* des ITCs allyle, benzyle, phényle, phényléthyle et propyle à des concentrations de 0, 0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5 et 2,0 $\mu\text{l L}^{-1}$ a été évalué sur plusieurs isolats de *F. oxysporum* obtenus à partir de bulbes de glaïeuls, de graines de jatropha, de feuilles de manguier, de fruits de la papaye et de fruits du coahuayote. La croissance quotidienne du mycélium et la germination des conidies des cinq isolats ont été évalués à différentes périodes d'incubation. Pour vérifier la réponse fongicide ou fongistatique, le champignon a été repiqué dans un milieu nutritif exempt des ITCs. En moyenne, les conidies de *F. oxysporum* étaient plus sensibles que le mycélium à des ITCs. À la fin de la période d'incubation, il y avait des différences significatives ($P < 0,05$) entre la croissance du mycélium de champignons traités avec des ITCs par rapport aux non traités. Les isolats de *F. oxysporum* les plus sensibles au benzyle ITC étaient ceux obtenus à partir des feuilles de manguier et de fruits de coahuayote. Les isolats de manguier étaient également très sensibles au phényléthyle ITC. A des concentrations entre 1,0 et 2,0 $\mu\text{l L}^{-1}$, l'allyle ITC a également supprimé la croissance de *F. oxysporum* isolé de la papaye et du coahuayote. A part pour l'ITC phényle dans le fruit de coahuayote, la germination des conidies de *F. oxysporum* n'a pas eu lieu sous l'influence d'ITC rémanent alors que le traitement contrôle atteint 100% de germination. En moyenne la concentration appliquée n'affecte pas la croissance des champignons. Une fois que la source d'ITCs a été retirée des boîtes de Pétri, la germination et croissance des champignons ont eu lieu. En conclusion, les ITCs examinés diffèrent dans la bioactivité, et le mycélium et les conidies de différents isolats de *F.*

oxysporum varient dans leur sensibilité et tolérance à ces composants.

Mots-clés supplémentaires: *Carica mexicana*, *C. papaya*, *Gladiolus* sp., *Jatropha curcas*, *Mangifera indica*.

Fusarium oxysporum has been implicated in a number of serious diseases in horticultural produce worldwide. *Fusarium* or vascular wilt is the major disease caused by this phytopathogen in several different hosts. This fungus also causes root, stem and corm rots under field or greenhouse conditions and pink or yellow molds of fruits during postharvest storage (Beckman, 1987; Herrera and Ulloa, 1998). Overall, infected plants are usually stunted; their leaves turn pale green to golden yellow and later wilt, wither, die and drop off progressively whilst in fruit and vegetables, *F. oxysporum* is acquired during preharvest life and once ripening progresses this fungus causes internal and external extensive rotting (Leslie and Summerell, 2006; Snowden, 1990). The use of synthetic fungicides has been the main source of control of *F. oxysporum*. Nevertheless, their intense application and frequently misuse have generated resistance in this fungus, becoming less effective. Due to the importance of this fungus, other methods for controlling are evaluated.

Isothiocyanates (ITCs) are phytochemicals sulphur-containing with the general formula $\text{R-N}=\text{C}=\text{S}$. Isothiocyanates occur naturally as glucosinolate conjugates in various vegetables (broccoli, cauliflower, turnips etc.) and other botanical families. They are responsible for the typical flavor of these vegetables. Pal Vig *et al.* (2009), reported a wide range of phytopathogenic fungi sensitive to different ITCs. Among them the literature reports that the allyl, benzyl, butenyl, propenyl, 2-phenylethyl, and methyl ITCs have fungitoxic properties. Similarly, for soil-borne fungi, the efficacy of pure isothiocyanates application has been extensively reported. Studies of the suppressing activity of various *Brassica* species on the fungus *Fusarium sambucinum* were strongly associated with allyl ITC production of the macerated leaves (Mayton *et al.*, 1996).

An array of soil microorganism, including five species of *Fusarium*, was tested against various types of ITCs, resulting in a marked inhibition by 50 and 90% in the presence of 2-phenylethyl ITC (Smith and Kikegaard, 2002). Congruent to these authors the sensitivity to this ITC varied according to genus, being the least tolerant in those belonging to *Sclerotinia* and *Gaeumannomyces*.

In others studies, a significant inhibition of mycelial growth was reported for *Rhizoctonia solani* when nutrient media was amended with allyl ITC at 50 $\mu\text{l L}^{-1}$ (Dhingra *et al.*, 2004). In postharvest studies, the ITCs have also proven to be effective in controlling a variety of fungi.

Conidial germination of *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer* was completely inhibited when treated with some ITCs (Mari *et al.*, 1993; 2008). Mycelial growth of *Alternaria alternata* was completely inhibited when exposed to a mixture of various ITCs such as allyl, benzyl, phenyl and phenylethyl (Troncoso *et al.*, 2005a). It has

also been reported that response to these natural substance differs according to isolate. In regard to *F. oxysporum*, little is known about their sensitivity to isothiocyanates. Smolinska *et al.* (2003), studied the *in vitro* response of four isolates of *F. oxysporum* which varied across isolate and the ITC tested.

Thus, this paper reports the results of the inhibitory effects of five different ITCs at different concentrations on the mycelial growth and conidial germination of *F. oxysporum* isolated from gladiolus corms, jatropha seeds, mango leaves, papaya and coahuayote fruit.

MATERIALS AND METHODS

Fungal cultures. *Fusarium oxysporum* isolates were obtained from gladiolus (*Gladiolus* spp.) corms (*F. oxysporum* f. sp. *gladioli*), jatropha seeds (*Jatropha curcas*), mango leaves (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*) and coahuayote (*Carica mexicana*) fruit showing symptoms provoked by this causal agent. Identification of *F. oxysporum* isolates was according to Nelson *et al.* (1983). The typical reproductive structures of *F. oxysporum* were observed such as micro and macro conidia (5-12 to 2.2-3.5 μL^{-1}), conidiophores and chlamydospores. Once monoconidial cultures were obtained, tests were carried out to verify the pathogenicity of each isolate. Fungal cultures were maintained in PDA for 10 days at 20°C.

Isothiocyanates assays. The pure ITCs tested in this study were those of allyl, benzyl, phenyl, phenylethyl and propyl (Aldrich Chemical Co., St. Louis and Alfa Aesar, Johnson Matthey Co.) at concentrations of 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 μL^{-1} . The application of the ITCs was carried out following the methodology reported by Troncoso *et al.* (2005b). Plugs of 5 mm of diameter were cut from the five actively growing *F. oxysporum* isolates. They were placed in the center of 9 cm-diameter Petri plates containing PDA. The ITCs were pipetted according to the above concentrations into 3 cm-diameter sterile filter paper discs (Whatman # 1). The discs were placed in the cover of the inoculated Petri plates and after sealing them were placed upside down and incubated at 20°C. Control Petri plates consisted of growing each isolate only in PDA.

Variables evaluated. For mycelial development, daily radial measurements of growth were taken until the fungus reached the end of the plate which was eight days for coahuayote isolate, nine for jatropha, 12 days for gladiolus ones and 13 days for mango and papaya isolates. For germination testing, conidia were harvested by scraping off the agar of each of the five *F. oxysporum* 10 day-old cultures. The number of spores mL^{-1} of the filtrate was adjusted to 10^5 . Aliquots of 50 μL of the above spore suspension were placed onto 20-mm diameter PDA disks. Then, discs with each isothiocyanate were placed in the middle of the Petri plate. After the given 7 h incubation period, germination was stopped by adding lactophenol-safranin. Data were evaluated as percentage germination.

Evaluation of the fungicidal or fungistatic effect on treated mycelia and conidia. To evaluate a possible re-growth of *F. oxysporum* isolates after ITC-treatments,

small portions of mycelia taken from the edge of each *F. oxysporum* isolate previously treated with the ITCs were placed again in the center of Petri plates of 5 cm of diameter containing only PDA. Treated spores and nonfixed ones with lactophenol-safranin were also placed upside down in Petri plates with PDA discs; both mycelia and spores were incubated at 25°C.

Statistical analysis. Treatments were arranged in a completely factorial design. For each isolate, five Petri plates and six PDA discs per treatment were considered as an experimental unit for mycelial growth and germination, respectively. Mean and standard deviations were calculated. Data of the final mycelial growth were subjected to ANOVA and means comparison by Tukey test at $P < 0.05$. Square root transformation was carried out to fulfil the ANOVA assumptions. Experiments were repeated twice and data were pooled since they were very similar.

RESULTS

Daily mycelial growth. Different responses of *F. oxysporum* were observed according to isolate, type of ITC and concentration. As seen in Figure 1, daily growth of *F. oxysporum* incubated in the presence of allyl ITC varied according to the isolate tested. Except for the *F. oxysporum* obtained from gladiolus corms, the best concentrations to delay mycelial growth ranged from 0.1 to 2.0 μL^{-1} . The most sensitive isolates were those from coahuayote and papaya fruit since no growth was observed at the highest concentration during the eight and 13 day of incubation periods. A delay in the onset of growth from four to six days was observed in the isolates obtained from coahuayote fruit and mango leaves. In regard to benzyl ITC (Figure 2), the most sensitive *F. oxysporum* isolates were those obtained from mango and coahuayote, since growth was completely suppressed during the entire incubation period at all concentrations. The least sensitive *F. oxysporum* isolate was that obtained from gladiolus corms. In Figure 3 it is observed that except for the gladiolus isolate, the application of phenyl ITC delayed the initial growth in the remaining *F. oxysporum* isolates tested. In comparison with the control, most isolates had lower mycelial growth at concentrations up to 0.1 μL^{-1} . The application of phenylethyl ITC completely inhibited the growth of *F. oxysporum* from mango at all concentrations during the 13-day incubation period (Figure 4), followed by a lower inhibition in the papaya and coahuayote isolates held at concentration up to 0.1 μL^{-1} . Gladiolus isolate did not respond to the application of this ITC. Figure 5 shows that development of *F. oxysporum* from gladiolus corms was delayed for up to four days and slowed down at the highest concentration of 2.0 μL^{-1} . Except for the mango isolate, the growth of coahuayote, papaya and jatropha isolates was affected by propyl ITC but they were not completely inhibited.

Final mycelial growth. At the end of the incubation period, mycelial growth of *F. oxysporum* from the isolates tested was significantly different ($P < 0.05$) among the treatments compared with the control (Table 1). Overall, there was not a specific pattern associated with mycelial inhibition and ITC concentration. In some instances, such

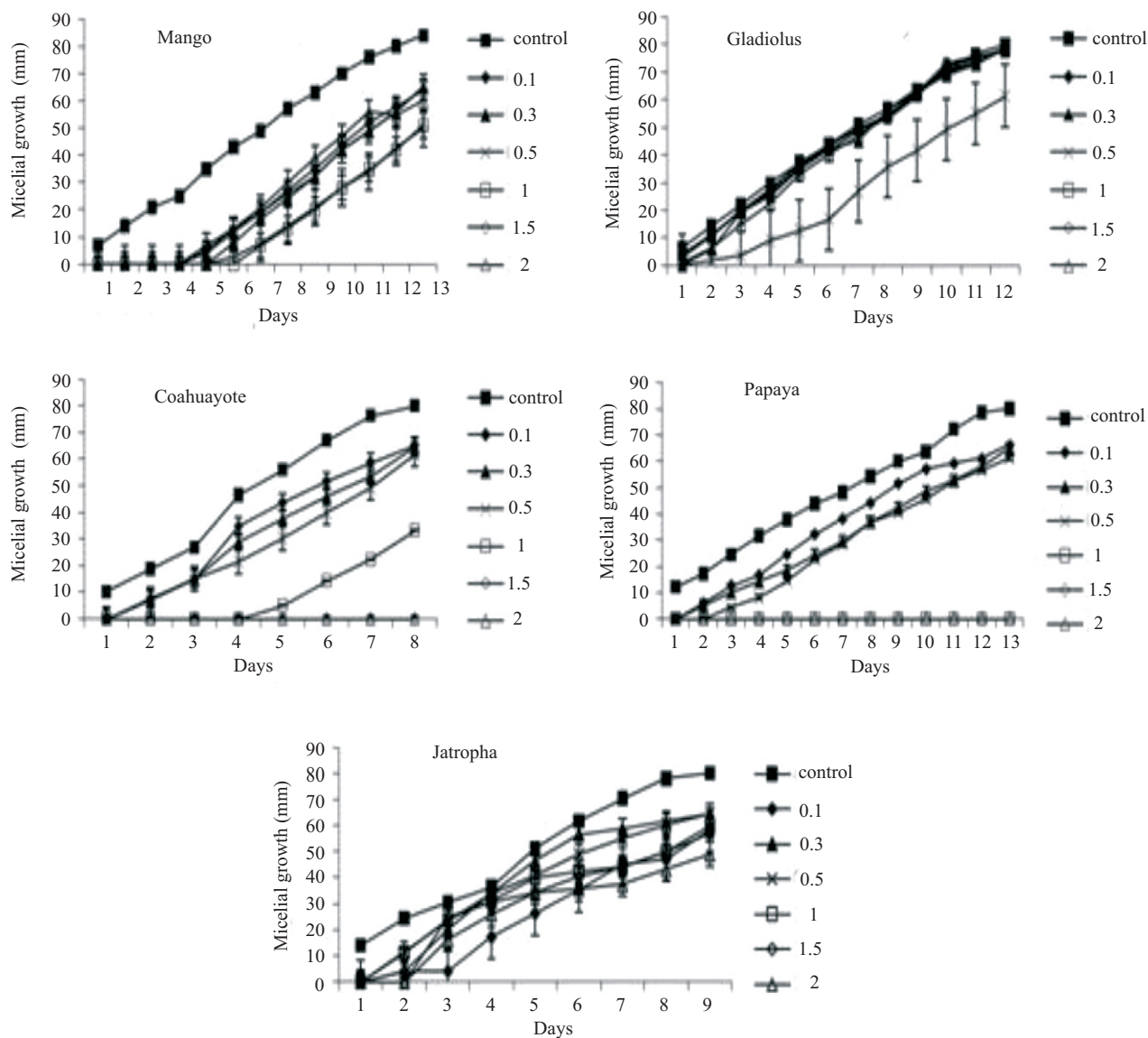


Figure 1. Daily mycelial growth of various *Fusarium oxysporum* isolates subjected to different concentrations of ally ITC for a given incubation time.

as that of the isolate obtained from coahuayote fruit, mycelial inhibition decreased as concentration increased in all ITCs tested. Except for the propyl ITC, this similar pattern was observed with *F. oxysporum* isolated from papaya fruit. Growth suppression up to 50% was rarely registered.

Conidial germination. With respect to the conidial germination of the five isolates tested, a complete inhibition was shown for most ITCs at all concentrations, whilst the untreated isolates had 100% germination (data not shown). Germination took place only in *F. oxysporum* isolated from coahuayote fruit when treated with phenyl ITC. In this

treatment, germination decreased as ITC concentration increased. It ranged from 47% (at $0.1 \mu\text{L}^{-1}$ concentration) to 5.3% (at $2.0 \mu\text{L}^{-1}$ concentration).

Evaluation of the fungicidal or fungistatic effect.

F. oxysporum mycelia and conidia of the five isolates previously subjected to the ITCs treatments followed normal growth and germination once they were placed in PDA Petri plates.

DISCUSSION

The present study showed that effectiveness of the ITCs varied across *F. oxysporum* isolates, fungi

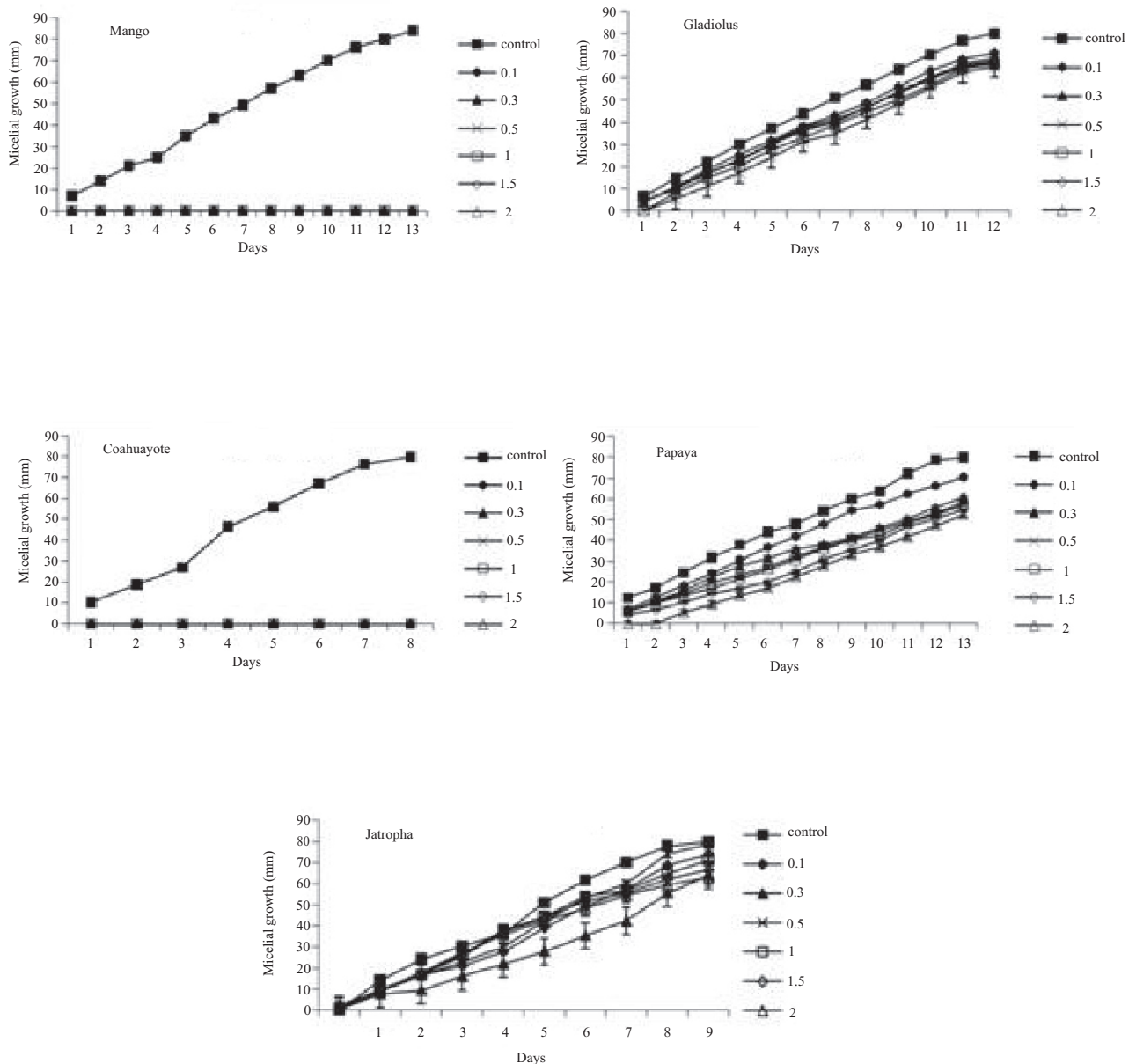


Figure 2: Daily mycelial growth of various *F. oxysporum* isolates subjected to different concentrations of benzyl ITC for a given incubation time.

development stage and ITC type tested. Overall, the most sensitive isolates to the ITCs were those obtained from mango and coahuayote and the highest toxicity was present in the benzyl and phenylethyl ITCs, followed by the allyl ITC on papaya and coahuayote isolates. We observed that while fungi were in contact with the benzyl and phenylethyl ITCs, there was a complete inhibition of growth. In the case of the allyl ITC, only the highest concentrations stopped growth. Coinciding with our results, Sarwar *et al.* (1998),

reported that the aromatic benzyl and 2-phenylethyl ITCs suppressed growth by 50% on various fungi such as *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Bipolaris* and *Gaeumannomyces*. In other studies, higher inhibition of the germ tube elongation was recorded when two species of *Alternaria* were treated with benzyl compared to the inhibition reported with the allyl ITC (Sellam *et al.*, 2007). The toxicity of these ITCs may be associated to their chemical structure. Previous studies revealed that aromatic forms are more biologically

Table 1. Summary of the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* i isolated from various hosts and treated with various ITCs.

Isothiocyanate and concentration ($1L^{-1}$)	Host				
	Gladiolus corms	Jatropha seeds	Mango leaves	Papaya fruit	Coahuayote fruit
Control	80 ^a	80 ^a	80 ^a	80 ^a	80 ^a
Allyl					
0.1	78.6 ^b	58.1 ^c	64.3 ^{bc}	66.3 ^b	65.1 ^b
0.3	78.3 ^b	64.5 ^b	65.0 ^b	64.9 ^{bc}	64.4 ^b
0.5	71.3 ^c	64.4 ^b	65.0 ^b	61.1 ^c	61.6 ^{bc}
1.0	78.5 ^b	59.6 ^{bc}	51.1 ^c	0.0 ^d	33.0 ^d
1.5	77.7 ^{bc}	56.9 ^d	50.0 ^e	0.0 ^d	0.0 ^e
2.0	78.0 ^b	48.9 ^c	59.5 ^d	0.0 ^d	0.0 ^e
Bencyl					
0.1	71.2 ^b	74.8 ^c	0.0 ^b	70.4 ^b	0.0 ^b
0.3	67.7 ^c	64.2 ^f	0.0 ^b	60.8 ^c	0.0 ^b
0.5	66.9 ^{cd}	78.8 ^b	0.0 ^b	58.4 ^{cd}	0.0 ^b
1.0	66.3 ^{cd}	71.2 ^d	0.0 ^b	57.2 ^d	0.0 ^b
1.5	67.3 ^{cd}	66.5 ^e	0.0 ^b	54.7 ^e	0.0 ^b
2.0	68.9 ^c	63.1 ^{fg}	0.0 ^b	52.5 ^{ef}	0.0 ^b
Phenyl					
0.1	53.0 ^c	58.4 ^{bc}	34.0 ^b	69.5 ^b	60.2 ^b
0.3	51.3 ^c	53.4 ^d	30.0 ^{bc}	68.2 ^b	59.9 ^b
0.5	39.3 ^d	58.6 ^{bc}	26.0 ^d	67.3 ^c	56.6 ^{bc}
1.0	58.9 ^b	60.3 ^b	19.0 ^e	65.4 ^d	55.5 ^{cd}
1.5	42.8 ^d	56.6 ^{ef}	18.0 ^e	50.8 ^e	55.5 ^{cd}
2.0	36.6 ^{de}	53.0 ^{de}	14.0 ^f	45.3 ^f	36.6 ^c
Phenylethyl					
0.1	76.1 ^b	64.6 ^f	0.0 ^b	50.3 ^b	66.9 ^b
0.3	76.7 ^b	70.0 ^d	0.0 ^b	49.3 ^{bc}	63.8 ^{bc}
0.5	76.7 ^b	80.0 ^b	0.0 ^b	48.6 ^c	62.8 ^{bc}
1.0	75.7 ^{bc}	80.0 ^b	0.0 ^b	47.4 ^{cd}	56.9 ^d
1.5	75.2 ^{bc}	69.2 ^c	0.0 ^b	45.4 ^e	56.6 ^d
2.0	75.2 ^{bc}	76.2 ^c	0.0 ^b	44.4 ^e	55.9 ^d
Propyl					
0.1	78.3 ^{bc}	77.1 ^b	78.0 ^c	57.6 ^g	79.5 ^b
0.3	77.1 ^d	77.3 ^b	78.0 ^c	60.4 ^f	78.9 ^b
0.5	79.3 ^b	77.3 ^b	81.0 ^b	62.1 ^e	45.2 ^{bc}
1.0	78.0 ^{bc}	67.1 ^c	81.0 ^b	64.1 ^d	70.9 ^d
1.5	79.1 ^b	63.8 ^d	79.0 ^{bc}	66.2 ^{bc}	68.2 ^{de}
2.0	41.6 ^c	62.5 ^{de}	89.0 ^b	67.6 ^b	66.0 ^f

*Average of five replicates; means separation within columns by Tukey's multiple test ($P < 0.05$) after square root transformation.

active than aliphatic forms due to their higher penetrability, and increasing volatility (Pal Vig *et al.*, 2009). Contrary to other studies (Smolinska and Horbowicz, 1999), the inhibitory effect of the ITCs on the *F. oxysporum* isolates tested in our investigation was not usually dependent on the concentration applied. Moreover, despite the promising inhibition of the ITCs on mycelia and conidia found in this

research, we observed that the fungitoxic activity of the ITCs tested was transitory since re-growth of all *F. oxysporum* isolates was observed once the fungi were removed from the source of inhibition. Similar results were reported by Smolinska *et al.* (2003), in which the toxic effects of various ITCs were also only for a limited time over various strains of *F. oxysporum*. However, in further

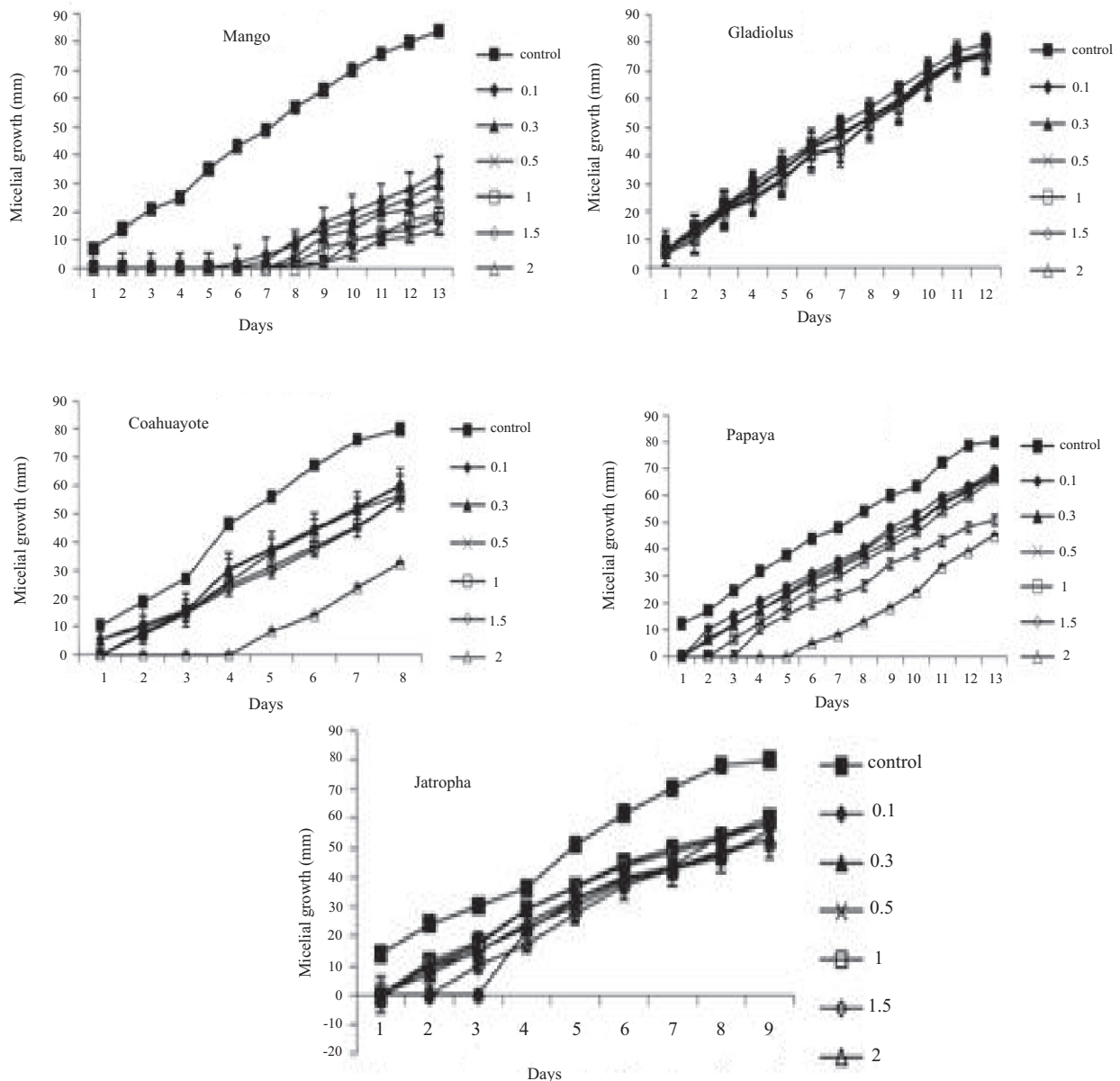


Figure 3. Daily mycelial growth of various *Fusarium oxysporum* isolates subjected to different concentrations of phenyl ITC for a given incubation time.

studies carried out in our laboratory we were able to obtain a permanent toxic effect in higher concentrations or in combination with chitosan (data not shown).

The different reaction of *F. oxysporum* mycelia and conidia to ITC exposure are, to some extent, probably due to the morphology involved in mycelia and conidia. The hyphae wall is perhaps thicker than the conidia wall; hence, the volatile penetration in these structures was easier. Other mechanisms involved maybe associated with the sensibility of conidia and hyphae to exogenous materials. Similar

results were reported with conidia of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Inyang *et al.*, 1999). In that study, the exposure of 1 μ l of 100% v/v of the ITCs of phenylethyl, 2-chlorophenyl and phenyl consistently inhibited conidia germination during the incubation period of this fungus while mycelium growth always took place. In other studies, Mari *et al.* (2008), reported that the effect of various ITCs tested was evident in a shorter period on conidial than mycelial development in *Monilinia laxa* causal agent of brown rot disease in stonefruit. In our observations, we also

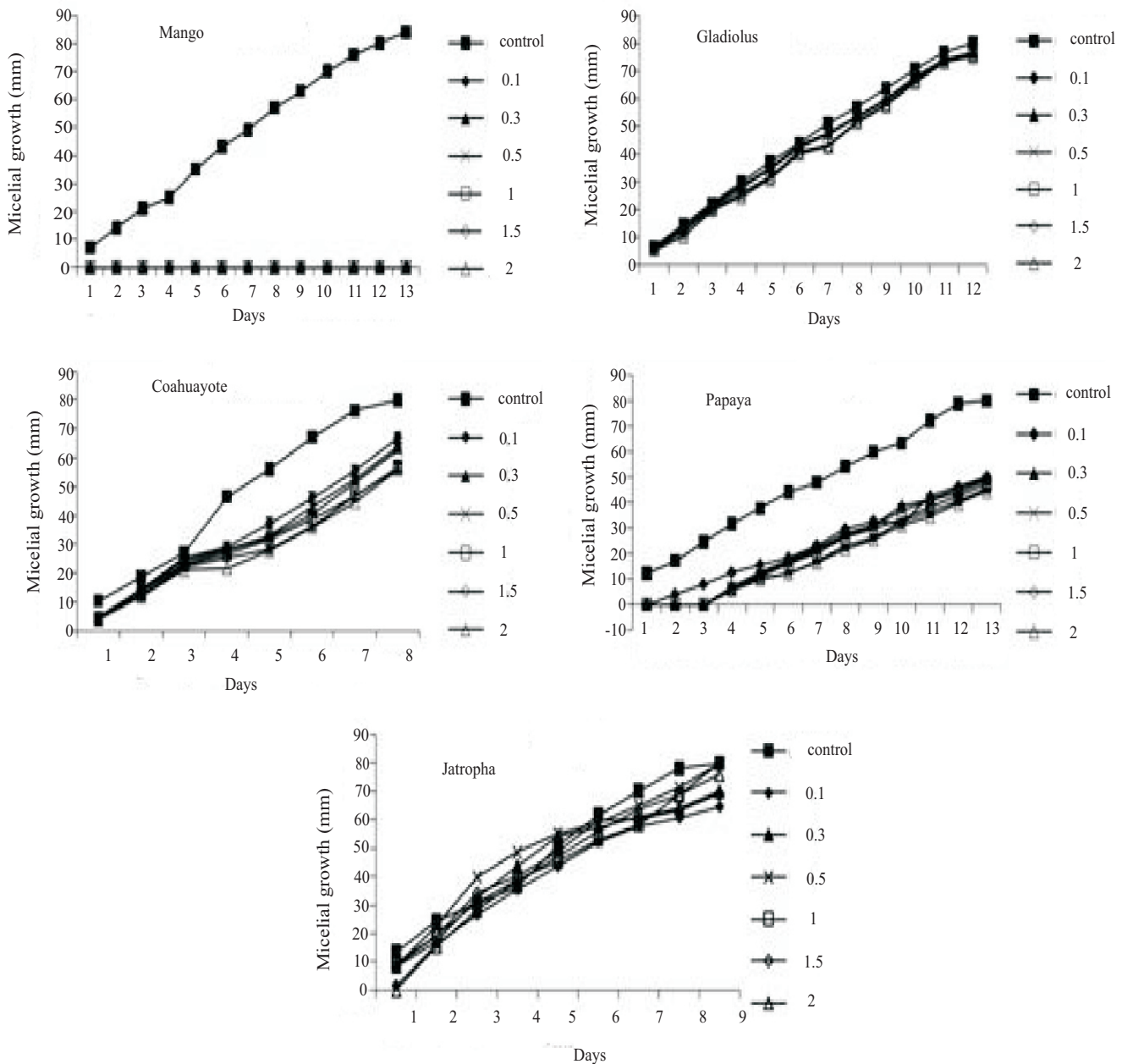


Figure 4. Daily mycelial growth of various *Fusarium oxysporum* isolates subjected to different concentrations of phenylethyl ITC for a given incubation time.

confirm that the ITCs differ in bioactivity, and that the mycelium and conidia of the different *F. oxysporum* isolates also varied in their susceptibility and tolerance to these compounds.

LITERATURACITADA

Beckman CH. 1987. The nature of wilt diseases of plants. St. Paul MN. American Phytopathology Society.

Dhingra OD, Costa MLN and Silva GJ Jr. 2004. Potential of allyl isothiocyanate to control *Rhizoctonia solani* seedling damping off and seedling blight in transplant protection. Journal Phytopathology 152:352-357.

Herrera T and Ulloa M. 1998. El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada. Fondo de Cultura Económica-UNAM. México, D.F. 552p.

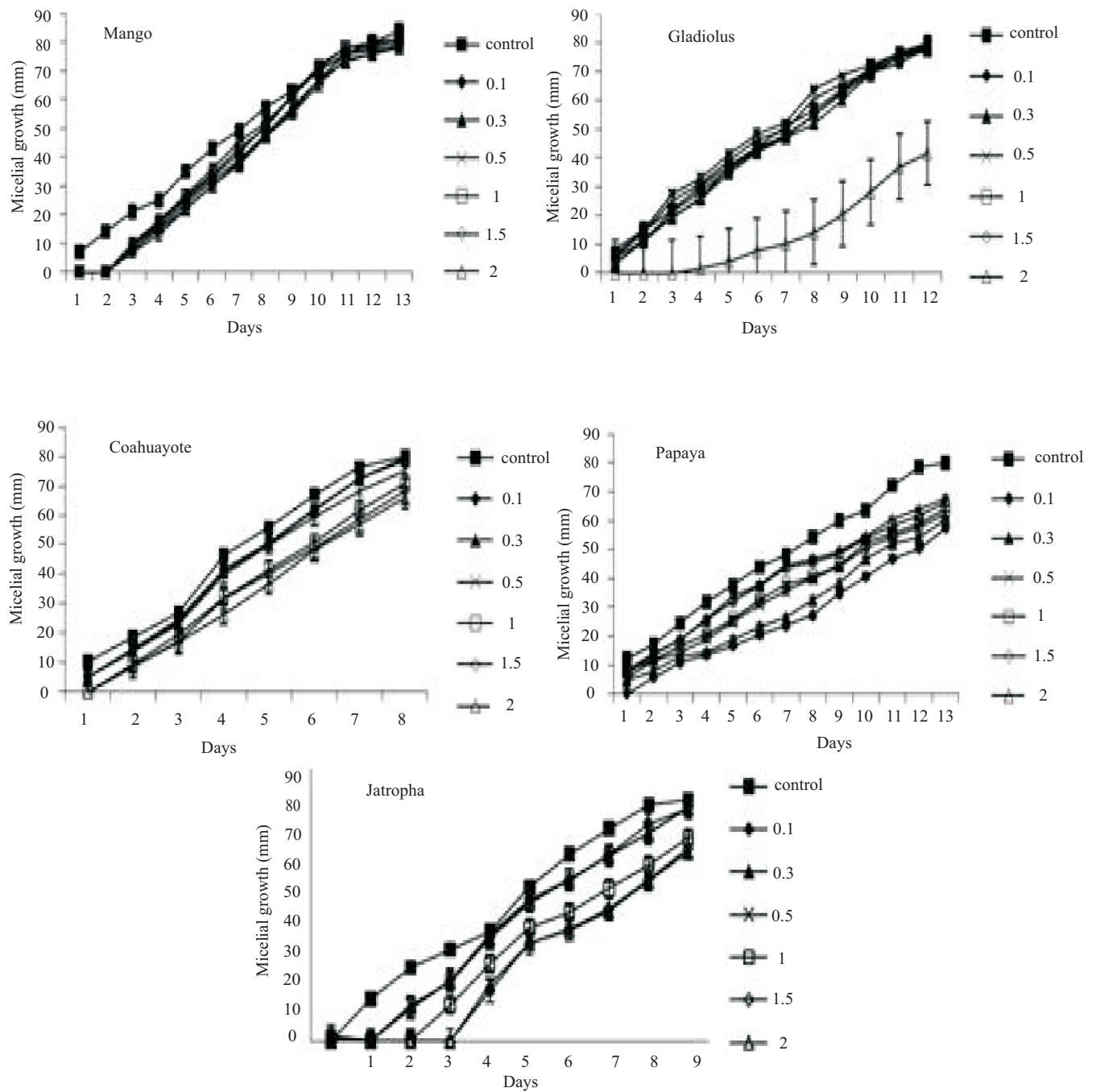


Figure 5. Daily mycelial growth of various *Fusarium oxysporum* isolates subjected to different concentrations of propyl ITC for a given incubation time.

Inyang EN, Butt TM, Doughty KJ, Todd AD and Archer S. 1999. The effects of isothiocyanates on the growth of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its infection of the mustard beetle. *Mycology Research* 103:974-980.

Leslie JF and Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing IOWA USA.

388p.

Mari M, Iori R, Leoni O and Marchi A. 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Annal Applied Biology* 123:155-164.

Mari M, Leoni O, Bernardi R, Neri F and Palmieri S. 2008. Control of brown rot stonefruit by synthetic and

- glucosinolate derived isothiocyanates. *Postharver Biology and Technology* 47:61-67.
- Mayton HS, Olivier C, Vaughn SF and Loria R. 1996. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193p.
- Pal Vig A, Rampal G, Singh T and Arora F. 2009. Bio protective effects of glucosinolates – A review. *LWT-Food Science Technology* 42:1561-1572.
- Sarwar M, Kikegaard JA, Wong PTW and Desmarchelier JM. 1998. Biofumigation potential of brassicas III. *In vitro* toxicity of isothiocyanate to soil-borne fungal pathogens. *Plant and Soil* 201:103-112.
- Sellam A, Iacomi Vasilescu B, Hudhomme P and Simoneau P. 2007. *In vitro* antifungal activity of brassinin, camalexin, and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicola* and *Alternaria brassicaceae*. *Plant Pathology* 56:296-301.
- Smith B and Kikegaard JA. 2002. *In vitro* inhibition of soil microorganisms by 2-phenylethyl isothiocyanate. *Plant Pathology* 51:585-593.
- Smolinska U and Horbowicz M. 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 147:119-124.
- Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR and James RL. 2003. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. *Plant Disease* 87:407-412.
- Snowdon AL. 1990. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. Vol. 1 General Introduction and Fruits. CRC Press London UK. 302p
- Troncoso R, Sánchez Estrada A, Ruelas C, García HS and Tiznado Hernández ME. 2005a. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. *Journal Science Food Agricultural* 85:1427-1434.
- Troncoso R, Espinoza C, Sánchez Estrada A, Tiznado ME and García HS. 2005b. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research Technology* 38:701-708

Rizobacterias Aisladas del Trópico Húmedo con Actividad Antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, Evaluación Cuantitativa e Identificación Molecular

Quantitative Evaluation and Molecular Identification of Rhizobacteria from Tropical Region, Antagonistic Against *Colletotrichum gloeosporioides*

Aracely Macedo Castillo, Aida Martínez Hernández y Joel Lara Reyna. Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, km 17.5 Carretera Haltunchén-Edzná, Sihochac, Champotón, Camp., México. Correspondencia: jlara@colpos.mx

(Recibido: Junio 27, 2011 Aceptado: Diciembre 05, 2011)

Macedo CA, Martínez HA y Lara RJ. 2012. Rizobacterias aisladas del trópico húmedo con actividad antagónica sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, evaluación cuantitativa e identificación molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 30:11-30.

Resumen. Un total de 278 aislamientos bacterianos obtenidos de la rizósfera de cultivos tropicales fueron evaluados *in vitro* para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Sólo 31 aislamientos mostraron actividad antagónica con diferentes grados de inhibición. Ensayos cualitativos en confrontación dual, resultaron en la selección de ocho aislamientos con mayor capacidad de inhibición. Para evaluar cuantitativamente la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, se estableció un método basado en estandarizar el inóculo inicial de ambos microorganismos y en digitalizar diariamente el área de crecimiento, tanto de la bacteria como la del fitopatógeno creciendo bajo condiciones de confrontación dual o sin antagonistas. El método permitió comparar la capacidad de inhibición de los ocho aislamientos contra la cepa comercial GB03 de *Bacillus subtilis*; considerando el área de crecimiento del hongo, el crecimiento máximo de las colonias, el tiempo en que inicia el antagonismo, la tasa promedio de crecimiento del hongo, el porcentaje de inhibición, y la zona de inhibición en cada confrontación. Los aislamientos fueron identificados molecularmente mediante secuenciación parcial del gene ribosomal ARNr 16S. Los aislamientos pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*. Estos parámetros permitieron identificar cuatro aislamientos que poseen el mayor potencial para ser evaluados en campo.

Palabras clave adicionales: gene ribosomal, ARNr 16S, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Abstract. A total of 278 bacterial isolates from the rhizosphere of tropical crops were evaluated for its potential to inhibit *in vitro* the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. From these, 31 isolates showed antagonistic activity. Dual confrontation qualitative tests for the 31 isolates resulted in the selection of eight isolates antagonist for *C. gloeosporioides*. To evaluate quantitatively the growth inhibition of *C. gloeosporioides*, we established a method by standardizing the initial inoculum of the antagonistic bacteria and the pathogen while scanning on a daily basis the growth area of both organisms either growing under confrontation or without antagonism. This method allowed the comparison of the ability of inhibition of each strain against a commercial strain by measuring the fungus growth area, the maximum growth of the colonies, the initiation of the antagonism, the average of the daily growth rate of the fungus, the percentage of inhibition, and the inhibition zone in each confrontation. All together, the method allowed an objective determination of the potential as antagonist agents of each isolate. Furthermore the eight isolates were molecularly identified by sequencing the ribosomal gene 16S rRNA, resulting in the identification of genera belonging to *Bacillus* and *Burkholderia*.

Additional keywords: ribosomal gene, 16S rRNA, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Résumé. Un total de 278 isolats bactériens obtenus à partir de la rhizosphère de cultures tropicales a été évalué *in vitro* pour déterminer leur capacité à inhiber la croissance de *Colletotrichum gloeosporioides*. Seulement 31 isolats ont montré une activité antagoniste avec différents degrés d'inhibition. Les tests qualitatifs de confrontation duelle ont abouti à la sélection des huit isolats avec les capacités d'inhibition les plus. Pour évaluer quantitativement l'inhibition de la croissance de *C. gloeosporioides* a été établie une méthode basée sur la standardisation d'un inoculum initial de chacun des deux organismes et sur la numérisation quotidienne de la zone de croissance, autant

Las bacterias son el tipo más abundante de microorganismos del suelo, debido a que pueden crecer rápidamente y

tienen la capacidad de utilizar un amplio número de fuentes de carbono o nitrógeno. La gran mayoría de las bacterias del suelo interactúan específicamente con la raíz (Lynch, 1991). Esto se debe principalmente a que muchos tipos de compuestos son exudados por la raíz en forma de secreciones (aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, carbohidratos complejos, flavonoides, proteínas y mucílago), que son utilizados como nutrientes por las bacterias que colonizan la rizósfera (Chaboud, 1983; Lynch, 1991; Montesinos, 2002). Así, el ambiente de la rizósfera es ideal para la interacción de los microorganismos con la raíz dando como resultado no sólo una gran diversidad de microorganismos presentes, sino una gran competencia entre la comunidad microbiana por alcanzar un nicho en la rizósfera (de Boer *et al.*, 2003). Muchos de aquellos microorganismos que tienen la capacidad de colonizar estos nichos, presentan propiedades que les permiten inhibir la presencia de otros microorganismos. La inhibición del crecimiento de hongos por bacterias nativas del suelo ha sido reconocida como un tipo de antagonismo, documentada y evaluada en diversos laboratorios del mundo (Kajimura *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2002; Cornelis y Matthijs, 2002; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). A pesar del beneficio ecológico derivado del uso de controladores biológicos, la utilización de bacterias como agentes de control biológico a escala comercial es mínima (comparada contra insecticidas químicos) en América latina. Los suelos del sureste mexicano, una zona ecológica tropical altamente diversa, es una zona no evaluada en la búsqueda de aislamientos bacterianos con potencial de utilización como agentes de control natural, que tengan efecto antagonista en contra de fitopatógenos responsables de enfermedades que atacan los cultivos. Desde el punto de vista geológico, la península de Yucatán es una gran roca caliza recientemente emergida del lecho marino, por lo que el material parental de los suelos es calizo en más del 60% (INECOL, 2000), siendo distinto al de la selva tropical de otras regiones del mundo. Por lo tanto, la microbiota edáfica que se desarrolla en la rizósfera de la vegetación adaptada a esos suelos podría presentar características únicas. La microbiota de los suelos calizos de la Península de Yucatán ha sido poco estudiada.

La antracnosis, es una de las enfermedades más importantes del mango (Fitzell *et al.*, 1984; Ploetz, 1999; Nelson, 2008). En México, esta enfermedad se encuentra en todos los estados donde se cultiva mango, provocando daños durante la floración, fructificación y postcosecha (Claridades Agropecuarias, 2010). El agente etiológico, de acuerdo con la literatura, es el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Sin embargo, Phoulivong *et al.* (2010), basado en cinco secuencias génicas, reportan un alto porcentaje en identificación errónea de cepas aisladas en Laos y Tailandia.

En el presente documento, se presenta los resultados del aislamiento, evaluación e identificación molecular de bacterias nativas de la rizósfera de plantas de uso agrícola en el estado de Campeche, las cuales mostraron actividad inhibitoria al crecimiento de *C. gloeosporioides*. Adicionalmente, se propone una metodología alternativa para evaluar cuantitativamente el antagonismo entre

des bactéries que du phytopathogène sous des conditions de confrontation duelle. La méthode a permis de comparer la capacité d'inhibition des huit isolats contre la souche commerciale de *Bacillus subtilis* GB03, en considérant la zone de la croissance fongique, la croissance maximale des colonies, l'instant du début de l'antagonisme, le taux moyen de croissance du champignon, le pourcentage d'inhibition, et la zone d'inhibition dans chaque confrontation. Par séquençage partiel du gène ribosomique ARNr_{16S}, les isolats ont été moléculairement identifiés comme appartenant au genre *Bacillus* et *Burkholderia*. Ces paramètres ont permis d'identifier quatre isolats potentiellement plus adaptés à une expérimentation sur le terrain.

Mots-clés supplémentaires: gène ribosomique 16S ARNr, *Bacillus*, *Burkholderia*.

Bacteria are the most abundant type of soil microorganisms because they can grow rapidly, also because of their ability to use a large number of either carbon or nitrogen sources. The vast majority of soil bacteria interact specifically with the root (Lynch, 1991). This is mainly due to many types of compounds that are exuded by the root as secretions (amino acids, sugars, organic acids, complex carbohydrates, flavonoid, proteins and mucilage), which are used as nutrients by the bacteria colonizing the rhizosphere (Chaboud, 1983; Lynch, 1991; Montesinos, 2002). Thus, the rhizosphere environment is ideal for the interaction of microorganisms with the root, resulting not only into a great diversity of microorganisms being revealed, but also into a great competition among the microbial community to achieve a niche in the rhizosphere (de Boer *et al.*, 2003). Many of those microorganisms that have the ability to colonize such recesses also have the adequate properties which allow them to inhibit the presence of other microorganisms. Fungal growth inhibition by an indigenous soil bacterium has been recognized as some kind of antagonism, documented and evaluated in several laboratories around the world (Kajimura *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 2002; Cornelis and Matthijs, 2002; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). Despite the environmental benefit derived from the proper use of environmental controls, bacteria usage as biological control agents on a commercial scale is minimal (if compared to chemical insecticides) in Latin America. The soils of southeastern Mexico, a highly diverse tropical ecological zone, is an area with a lack of assessment in the search for bacterial isolates with a potential use as natural control agents, which have an antagonistic effect against pathogens responsible for crop diseases. The Peninsula of Yucatan, from a geological point of view, is a limestone seabed recently emerged, so the calcareous soils parent material is over 60% (INECOL, 2000), being different from other jungle tropical regions. Therefore, the soil micro biota developed in the vegetation rhizosphere adapted to these soils could indeed reveal unique characteristics. The micro biota of the calcareous soils from the Yucatan Peninsula has been very little studied.

microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El material vegetal se colectó en tres municipios del estado de Campeche (México) en zonas recién abiertas a la producción agrícola (Cuadro 1). Se colectaron raíces de plantas seleccionadas de forma aleatoria en cultivos de papaya *Carica papaya* (Cayal, Campeche); arroz *Oryza sativa* (Palizada, Campeche); y caña de azúcar *Saccharum officinarum* (Champotón, Campeche). Un total de 30 muestras de raíces de cada especie se colectaron en bolsas de papel, se transportaron al

Anthracoze is one of the major mango diseases (Fitzell *et al.*, 1984; Ploetz, 1999; Nelson, 2008). This disease is present in all of the Mexican states where mango is grown, causing damage during flowering, fruiting and post-harvest stage (Claridades Agropecuarias, 2010). According to literature, the etiologic agent is the *C. gloeosporioides* plant pathogenic fungus. Nevertheless, a high misidentification percentage of isolated strains in Laos and Thailand were reported by Phoulivong *et al.* (2010), based on five gene sequences.

The present study is aimed to present bacteria isolation, evaluation and identification from the native

Cuadro 1. Aislamientos bacterianos obtenidos de raíces de plantas cultivadas en el estado de Campeche, México.
Table 1. Bacterial isolates obtained from roots of plants grown in the state of Campeche, Mexico.

Cultivo	Número	Aislamientos	Municipio
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	116	Pa001 - Pa116	Campeche
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	71	Ar001 - Ar71	Palizada
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	91	Ca001 - Ca091	Champotón
Total	278	-	-

laboratorio en una hielera para mantener las muestras frescas, y se procesaron el mismo día de colecta.

Aislamiento de bacterias. Se utilizó la siguiente metodología: Las raíces de las especies vegetales se lavaron superficialmente con agua destilada estéril. Se maceraron 10g de las raíces previamente cortadas en trozos pequeños, para liberar la mayor parte de bacterias adheridas a la raíz, se depositaron en tubos cónicos de plástico estériles con 15mL de agua destilada estéril con 15% de Tween®20 (Promega). La suspensión se homogenizó con un agitador mecánico vortex durante un tiempo de 10 a 30 seg. Se dejaron en reposo durante 10 min y se agitaron durante 30 seg con vortex. A partir de las suspensiones se hicieron diluciones seriales desde 1/10 hasta 1/1000 con agua destilada estéril. Posteriormente fueron sembrados 200µl de cada dilución en cajas Petri con medio sólido LB (Luria-Bertani). Las cajas se incubaron a 28°C durante toda la noche para el desarrollo de colonias bacterianas. Las colonias que presentaron diferente morfología y coloración se reaislaron en cajas Petri sembrando un máximo de 10 aislamientos por caja.

Discriminación preliminar de aislamientos con actividad antagonista. Todos los aislamientos fueron evaluados en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, mediante ensayos de confrontación y estimación cualitativa. El aislamiento identificado de *C. gloeosporioides*, fue proporcionado por el Dr. Jairo Cristobal Alejo, quién lo obtuvo a partir de cultivos comerciales de mango en Hunucmá (Yucatán). Segmentos de medio LB de 1 cm² aproximadamente, con micelio de *C. gloeosporioides* de siete días de edad, se depositaron al centro de una caja Petri con medio PDA fresco. En cada caja inoculada con el hongo se sembraron

plants rhizosphere for agricultural use in the state of Campeche, which has revealed a *C. gloeosporioides* growth inhibitory activity. Additionally, an alternative methodology to quantitatively evaluate the microorganism antagonism is proposed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. The plant material was collected in three municipalities from the state of Campeche (Mexico), in newly opened areas for agricultural production (Table 1). Plant roots were collected, randomly selected from *Carica papaya* cultures (Cayal, Campeche), *Oryza sativa* rice (Palizada, Campeche) and *Saccharum officinarum* sugar cane (Champoton, Campeche). A total of 30 root samples of each species were collected in paper bags, transported to the laboratory in a cooler to keep the samples fresh, and processed the same day of collection.

Bacterium isolation. The methodology used was: The roots of the plants were washed superficially with distilled water. A total of 10g of the roots were macerated after having them cut in small pieces, in order to release the majority of the bacteria adhering to the root; afterwards, they were placed in small sterile conical tubes with 15mL sterile distilled water with 15% of Tween®20 (Promega). The suspension was homogenized with a vortex mechanical stirrer for 10 to 30 sec. They were allowed to stand for 10 min and stirred for 30 sec with a vortex. Serial dilutions from 1/10 to 1/1000 were made from the suspensions with sterile distilled water. Subsequently, a total of 200µl from each dilution were planted in Petri dishes with LB agar (Luria Bertani). The dishes were then incubated at 28°C overnight to develop bacterial colonies. The colonies presenting different color and morphology were re-isolated in Petri dishes sowing up to 10 isolates per dish.

cuatro diferentes aislamientos bacterianos en cada punto cardinal (Figura 1A). Las cajas se incubaron a 28°C durante ocho días. Se consideró como potenciales antagonistas aquéllos aislamientos que causaron algún grado de inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, alrededor de la zona de crecimiento de las colonias bacterianas. Previamente, se verificó que no hubiera alguna ventaja en el crecimiento de los aislamientos bacterianos y fúngicos en medio LB o PDA.

Evaluación individual de aislamientos bacterianos. Los aislamientos que provocaron inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*, fueron evaluados nuevamente confrontando cada aislamiento por separado contra el hongo fitopatógeno. El ensayo de confrontación se realizó conforme a una escala cualitativa (Opelt y Berg

Isolates preliminary discrimination with antagonistic activity. All isolates were evaluated according to their ability to inhibit mycelia growth of the *Colletotrichum gloeosporioides* phytopathogenic fungus throughout confrontation tests and qualitative assessment. The identified *C. gloeosporioides* isolate was provided by Dr. Jairo Cristobal Alejo, who got it from mango commercial cultures in Hunucma (Yucatan, Mexico). The LB medium segments of approximately 1 cm² with seven days *C. gloeosporioides* mycelium were placed at the center of a Petri dish with fresh PDA medium. Four different bacterial isolates were sown in each inoculated dish with the fungus at each cardinal direction (Fig. 1A). The dishes were incubated at 28°C for eight days. The isolates considered as potential antagonists were those causing some degree of

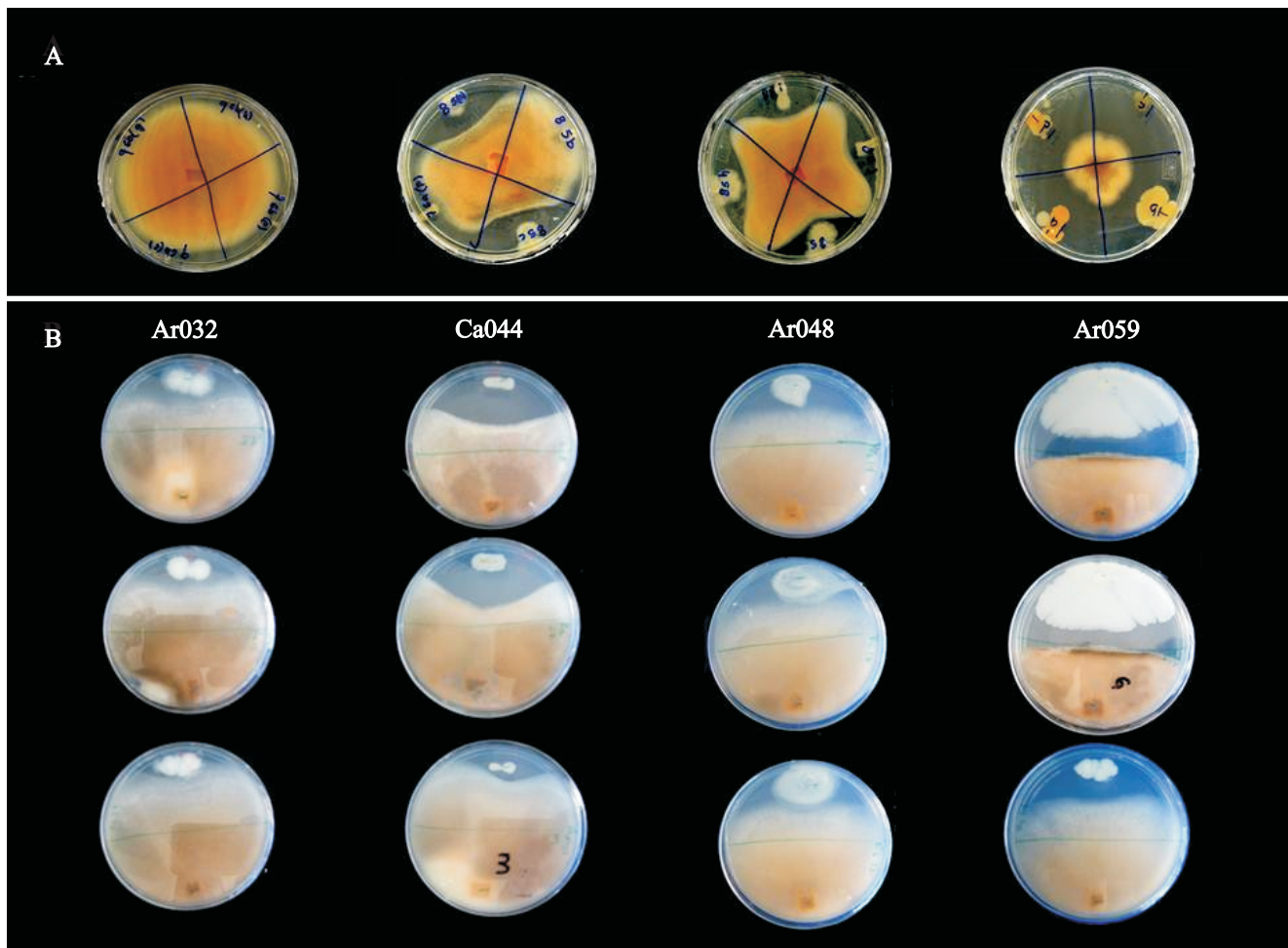


Figura 1. A. Discriminación masiva para seleccionar aislamientos bacterianos que provocan inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. Se ejemplifican grados de antagonismo observados: sin ningún efecto (caja a la izquierda), e inhibición del crecimiento en varios grados (cajas a la derecha). B. Ensayo cualitativo de confrontación dual de *C. gloeosporioides* frente a cuatro de los ocho aislamientos bacterianos preliminarmente seleccionados por su efecto antagonístico; ejemplificando comportamientos heterogéneos (la variabilidad observada) entre repeticiones.

Figure 1. A. Mass discrimination to select bacterial isolates causing *C. gloeosporioides* growth inhibition. The observed antagonism degrees are exemplified: no effect (left box), and growth inhibition in several degrees (right boxes). B. Dual confrontation qualitative essay of *C. gloeosporioides* against four of the eight bacterial isolates preliminarily selected for their antagonistic effect, illustrating heterogeneous behavior (the observed variability) among repetitions.

2004; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). En esta escala, se establecieron cuatro niveles de antagonismo de acuerdo a la distancia entre el borde de la colonia del hongo, y el de la colonia bacteriana, medida en línea recta entre ambos microorganismos: +, < 5 mm; ++, 5.1 a 10 mm; +++; 10.1 a 15mm; +++++, > 15.1mm. Cada aislamiento se evaluó por triplicado en medio LB (Figura 1B). La inhibición del crecimiento se midió al día 23 en todos los experimentos, tiempo en que *C. gloeosporioides* tarda en cubrir la caja Petri creciendo sin confrontación (testigo sin antagonistas).

Evaluación cuantitativa del antagonismo. Cajas Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA se inocularon en un extremo, a 1 cm de distancia del borde de la caja, con círculos de 0.785 cm² de medio PDA que contenían micelio joven de *C. gloeosporioides*. Los inóculos se cortaron con sacabocados a partir de la periferia de una colonia de 10 días de edad, para garantizar el mismo estado fisiológico. Por otra parte, los aislamientos bacterianos al ser evaluados, fueron crecidos en LB líquido durante toda la noche. El número de células de cada cultivo fue determinado midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU 530) a 600 nm (DO_{680nm}), y se cuantificó el número de células sembrando una dilución para calcular las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹). Con este valor, se ajustó la DO_{680nm} para que cada cultivo bacteriano tuviera una concentración aproximada de 10⁶ células l⁻¹. Se inocularon 10 µl⁻¹ de cada aislamiento en el extremo contrario a donde se inoculó el hongo. Las confrontaciones, realizadas por triplicado, se incubaron a 28°C. El crecimiento de ambos organismos fue documentado diariamente mediante la digitalización del área de crecimiento que cubrió cada colonia durante 23 días, tiempo previamente estimado en que el hongo cubre el diámetro total de la caja Petri cuando crece sin antagonistas (testigo) (Figura 2). La digitalización se realizó por la parte superior de la caja Petri con un escáner HP 5770[®]. El escáner se ajustó con la opción de captura “calidad fotográfica” del menú principal, y a la más alta resolución (1200 dpi); las imágenes se guardaron con formato “jpg”. Las imágenes digitalizadas se transformaron en imágenes de alto contraste (blanco y negro) con el software Adobe Photoshpe v 6.0. El cálculo del área en cm² del crecimiento diario se realizó mediante el programa de distribución libre Image Tools V 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) de la siguiente manera: el programa se calibró con una imagen de tamaño conocido en mm, utilizando la herramienta “distance” del menú “analysis”; posteriormente se abrió el archivo de la imagen de alto contraste; en el menú “preferences” se seleccionó la opción “object analysis” y “área”; finalmente con la herramienta “área” se calculan automáticamente las áreas reconocidas en la imagen (solo las de alto contraste), el programa envía los datos a un hoja de cálculo. Como testigo positivo del antagonismo contra *C. gloeosporioides* se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* GB03 (BsGB03), ingrediente activo del biofungicida comercial KODIAK[®] (Brannen y Kenney, 1997). Para evaluar el grado de antagonismo de cada aislamiento bacteriano se

inhibición de *C. gloeosporioides* mycelia growth around the bacterial colonies growth area. It had been previously shown that there is no advantage derived from the growth of bacterial and fungal isolates in LB medium or PDA.

Bacterial isolates Individual evaluation. The isolates that caused *C. gloeosporioides* growth inhibition were evaluated once again confronting each isolate separately against the plant pathogenic fungus. The comparison test was performed in accordance to a qualitative scale (Opelt and Berg 2004; Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008). There were four levels of antagonism on this scale according to the distance between the edge of the fungus colony and the edge of the bacterial colony, measured in a straight line between the two microorganisms: +, < 5 mm; ++, 5.1 at 10 mm; +++; 10.1 at 15mm; +++++, > 15.1mm. Each isolate was tested in triplicate in an LB medium (Fig. 1B). Growth inhibition was measured after 23 days in all experiments, which was the time that it takes to *C. gloeosporioides* to cover the Petri dish growing up without confrontation (control without antagonists).

Antagonism quantitative assessment. Petri dishes of a 9 cm diameter with a PDA medium were inoculated at one end 1 cm away from the edge of the dish, with circles of 0.785 cm² PDA medium, containing *C. gloeosporioides* young mycelium. The inoculum was cut with punches from the periphery of a 10 days bacterial colony, looking forward to ensure the same physiological state. Moreover, the bacterial isolates to evaluate were grown in liquid LB overnight. The number of cells l⁻¹ for each culture was determined by measuring the optic density in a spectrophotometer (Beckman Coulter DU 530) at 600 nm (DO_{680nm}), having the number of cells measured by seeding a dilution aiming to estimate the units of forming colonies per millimeter (UFC mL⁻¹). The DO_{680nm} became adjusted after getting such value for each bacterial culture to have an approximated concentration of 10⁶ cells l⁻¹. A total of 10 µl were inoculated from each isolate at the opposite end from where the fungus had been inoculated. The confrontations performed in triplicate were incubated at 28°C. The growth of both organisms was documented on a daily basis by the growth area scanning that covered each colony for 23 days, which is the time that had been previously estimated for the fungus to cover the overall dish diameter when grown without antagonist (control) (Figure 2). The scanning was performed by the upper part of the Petri dish with a HP 5770[®] scanner, which was adjusted with the option of capturing “photographic quality” from the main menu, having the highest resolution (1200 dpi) images saved to “jpg” format. The scanned images were transformed into high-contrast images (black and white) with Adobe Photoshop v 6.0. The area daily growth calculation in cm² was carried out using the free distribution program Image Tools V 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>). It was used as follows: The program was calibrated by measuring with an image of known size in mm using “distance” from the “analysis” menu; after that, the file of the image of high contrast was opened; subsequently, the “object analysis”

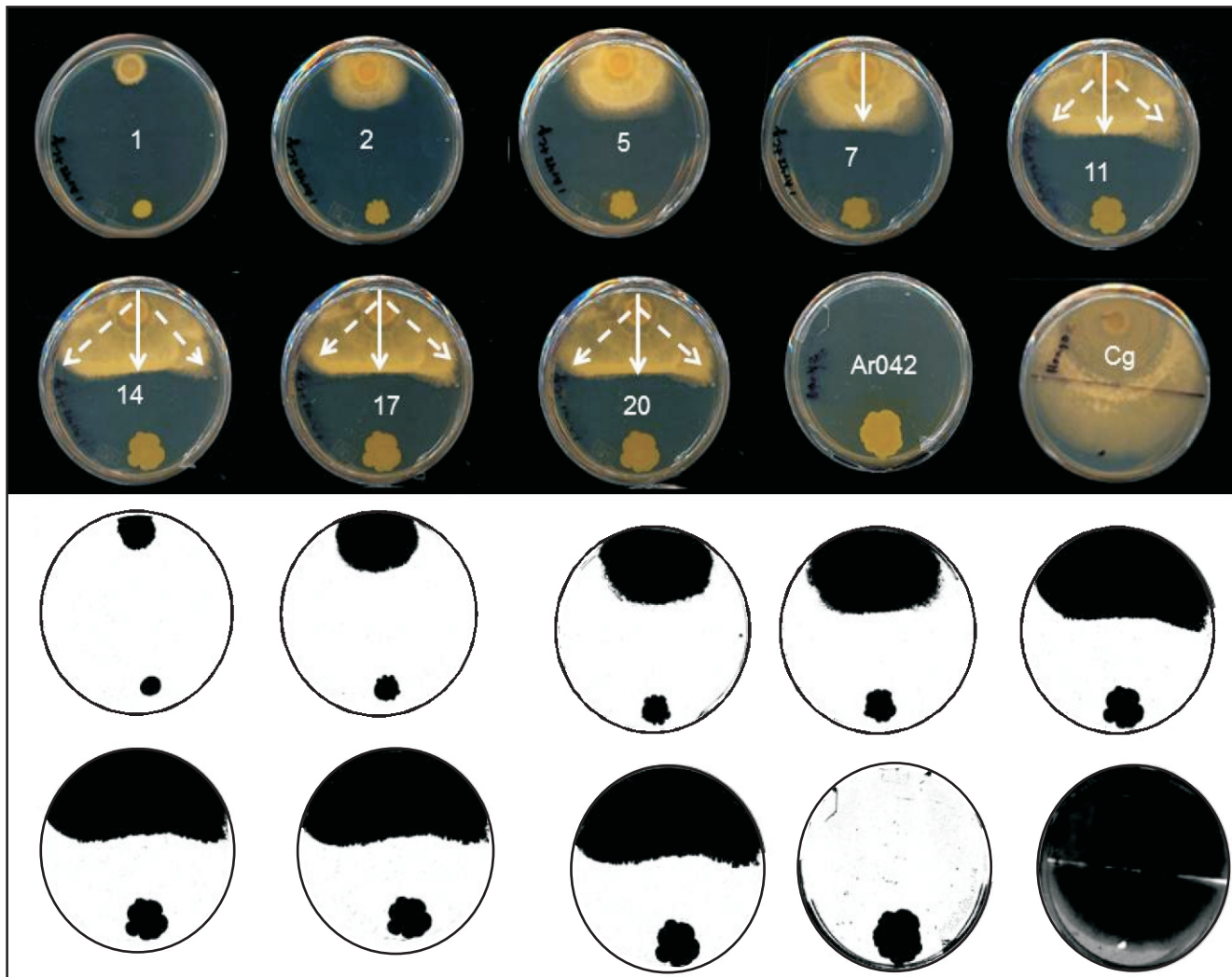


Figura 2. A. Imágenes de la dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* y de un aislamiento bacteriano (Ar042) en confrontación. Los números corresponden al día del registro. Se muestra el tamaño alcanzado al final del experimento (23 días) por *C. gloeosporioides* (Cg) y Ar042 creciendo en forma aislada. Las flechas continuas indican cómo el crecimiento frontal se detiene, y las flechas discontinuas muestran cómo continúa la colonización hacia los lados. B. Digitalización de la imagen del crecimiento de los microorganismos, confrontados o creciendo independientemente, a lo largo del experimento.

Figure 2. A. Images of *C. gloeosporioides* growth dynamics from a bacterial isolate (Ar042) in confrontation. The numbers correspond to the day of registration. The size reached by *C. gloeosporioides* (Cg) and Ar042 at the end of the experiment (23 days) growing in isolation is shown. How the frontal growth stops is indicated by the arrows, and how the colonization continues sideways is indicated by the broken arrows. B. Image scanning of the microorganisms growth, either confronted or growing independently throughout the experiment.

consideraron los siguientes parámetros; midiendo o calculando cada uno de ellos de forma independiente, tanto bajo condiciones de confrontación con cada aislamiento, como con la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación: área cubierta en cm^2 por *C. gloeosporioides* medida diariamente y al finalizar el experimento (23 días); tasa promedio de crecimiento del hongo, en $\text{cm}^2\text{día}^{-1}$; porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del hongo; zona de inhibición en cm^2 . Las curvas de crecimiento fueron construidas en base al promedio de las áreas cubiertas por *C. gloeosporioides* en cada triplicado, medidas diariamente. La tasa promedio de crecimiento se calculó promediando el incremento diario en

was opened from the “preferences” option, as well. Finally, with the “area” tool, the areas recognized in the image were calculated automatically (only those in high contrast). The program sent the data to a spreadsheet. The *Bacillus subtilis* strain GB03 (BsGB03), a KODIAK® commercial fungicide active ingredient (Brannen and Kenney, 1997), was used as a positive control against *C. gloeosporioides*. The parameters considered to evaluate each bacterial isolate antagonism degree were as follows: by either measuring or calculating each one of them independently, under confrontation conditions with each strain, such as those revealed by the BsGB03 control strain; without confrontation: area covered

el área cubierta por el hongo, promediado entre los 23 días de duración del experimento. El porcentaje de crecimiento del hongo en confrontación con respecto a su crecimiento sin antagonistas (100%) fue calculado al finalizar el experimento (23 días). El porcentaje de crecimiento del hongo, sustraído con respecto al 100% (hongo creciendo sin antagonistas), corresponde al valor de porcentaje de inhibición. La zona de inhibición es el área intermedia entre los bordes de las colonias confrontadas, en la cual no crece ninguno de los dos organismos. Los datos de crecimiento se analizaron mediante un diseño completamente al azar con medidas repetidas donde el modelo lineal fue $Y=B+T+e$, donde: Y son las variables medidas (área), B es el efecto de tratamiento de antagonismo de la bacteria, T el tiempo de medición y “e” el error del efecto estudiado. La comparación se realizó mediante el método de T múltiple del paquete estadístico SAS®.

Identificación molecular mediante secuenciación del ARNr 16S. Se realizó un PCR en colonia utilizando un método comúnmente utilizado: los aislamientos crecieron durante toda la noche en 3 mL de LB líquido, en agitación a 150 rpm, a 28°C. Las células se centrifugaron durante 2 min a 12 000 rpm, lavadas dos veces con agua ultrapura estéril, y resuspendidas en 1 ml de agua ultrapura estéril. Para la reacción de amplificación se utilizó 1 µl de una dilución 1/1000 de la suspensión celular, mezcla de reacción Platinum® PCR SuperMix (conteniendo Taq DNA Polimerasa recombinante Platinum®, dNTP's y buffer de Magnesio), y los iniciadores 63f: cag gcc taa cac atg caa gtc y 1387r: ggg cgg wgt gta caa ggc diseñados contra la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) (Marchesi *et al.*, 1998), los cuales generan un fragmento de aproximadamente 1,300 pb. Los productos de amplificación se secuenciaron por ambos extremos (5' y 3') utilizando el mismo par de iniciadores. Las dos secuencias generadas a partir de cada aislamiento se alinearon entre sí utilizando el algoritmo ClustalW del programa MegAlign (DNASTAR Inc.) para identificar la zona de empalme entre ambas, y generar una sola secuencia consenso; cada secuencia consenso fue comparada mediante la herramienta BLASTN contra la base de datos de nucleótidos “nucleotide collection” (nr/nt) del GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), para encontrar secuencias homólogas que nos indicaran la identidad de las bacterias. Alineamientos comparando los consensos contra las secuencias de algunas de las especies con las que presentó homología en el análisis de BLAST se generaron con CLUSTALW. El análisis para mostrar en árboles filogenéticos (fenogramas) los agrupamientos entre las secuencias de ARNr 16S de los aislamientos bacterianos y las secuencias de especies conocidas se generaron con el algoritmo de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987), a través de las herramientas disponibles en el Kyoto University Bioinformatics Center (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

RESULTADOS

Aislamientos bacterianos con capacidad antagonista. Un total de 278 aislamientos bacterianos

by *C. gloeosporioides* in cm² measured on daily basis, and at the end of the experiment (23 days); measuring the fungus average growth rate in cm²day⁻¹ calculating the fungus growth inhibition percentage; measuring the inhibition area in cm². The growth curves were built based upon the areas covered by *C. gloeosporioides* in each triplicate, measured on a daily basis. The average growth rate was calculated by averaging the daily increase in the area covered by the fungus, averaged amongst the 23 days of the experiment. The percentage of fungal growth in confrontation, with regards to its growth without antagonists (100%), was calculated at the end of the experiment (23 days). The fungus growth percentage, removed with regards to a 100% (fungus growing without antagonists), corresponds to the inhibition percentage. The inhibition zone is the intermediate area amongst the edges of the confronted colonies, which did not grow in any of the organisms. Growth data were analyzed by a completely randomized design with repeated measures; the linear model was $Y=B+T+e$, where Y stands for the measured variables (area), B is the bacteria antagonism treatment, T the measurement of time, and “e” the error effect under study. The comparison was performed using the T multiple statistic package SAS®.

Molecular identification by ARNr 16S sequencing. A PCR was performed in the colony by a method commonly used: The isolates were grown overnight in 3 mL of liquid LB, stirring at 150 rpm at 28°C. The cells were centrifuged for 2 min at 12 000 rpm, washed twice with sterile ultrapure water, and re-suspended in 1 mL of sterile ultrapure water. A total of 1 µl from a 1/1000 dilution of the cell suspension were used for the amplification reaction, as well as a reaction mixture Platinum® PCR SuperMix (containing Taq DNA Polymerase recombinant Platinum®, dNTP's and magnesium buffer), and the indicators 63f: cag gcc taa cac atg caa gtc and 1387r: ggg cgg wgt gta caa ggc designed against the 16S subunit of the ribosomal ARN (ARNr 16S) (Marchesi *et al.*, 1998), which generated a fragment of approximately 1,300 pb. The amplification products were sequenced from both ends (5' and 3'), using the same pair of primers. Both of the generated sequences from each isolate were aligned with each other using the ClustalW algorithm from the MegAlign program (DNASTAR Inc.), aiming to identify the junction area between them, generating a single consensus sequence, thus; each consensus sequence was compared using the BLASTN tool against the “nucleotide collection” (nr/nt) nucleotide database of the GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), in order to find homologous sequences indicating the bacteria identity. Alignments comparing the consensus against some of the species sequences showing homology in the BLAST analysis were generated with the CLUSTALW. The analysis utilized to show clusters between the ARNr 16S of the bacterial isolates and the sequences of known species in phylogenetic trees (phenograms) were generated with the Neighbor-joining algorithm (Saitou and Nei, 1987), by means of the tools available at the Kyoto University Bioinformatics Center (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

fueron recuperados de la rizósfera de tres cultivos establecidos en zonas productoras del estado de Campeche: se obtuvieron 116 aislamientos de papaya, 71 aislamientos de caña de azúcar y 91 aislamientos de arroz (Cuadro 1). En la evaluación preliminar de la capacidad para inhibir el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, sólo 31 de los 278 aislamientos inhibieron el crecimiento del hongo. Distintos aislamientos bacterianos ejercieron diferentes grados de inhibición del crecimiento del hongo (Figura 1A). En esta primera etapa de discriminación el análisis fue diseñado para evaluar una gran cantidad de aislados bacterianos, por lo que el efecto de cada aislado se registró solamente como positivo, si ejerció algún grado de inhibición sobre el crecimiento del hongo; o como negativo, si no ejerció ninguna inhibición. En los casos en los que no hubo inhibición (247 aislamientos), el hongo creció sobre la colonia bacteriana como se observa en la primer caja de la Figura 1A.

Evaluación cualitativa de antagonismo. Mediante ensayos de confrontación dual se estableció la capacidad individual de cada uno de los 31 aislamientos preseleccionados para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* comparando, al final del experimento, la distancia entre los bordes de las colonias en cada confrontación (Prapagdee *et al.*, 2008). Este tipo de experimentos permite establecer diferencias métricas entre confrontaciones y comparar cualitativamente el antagonismo entre los aislamientos bacterianos. Los resultados de esta evaluación se presentan en el Cuadro 2. Ocho de los aislamientos bacterianos (Ar009, Ar038, Ar042, Ar059, Ar061, Ca039, Ca044, Pa106) mostraron una mayor capacidad para inhibir el crecimiento del hongo. Sin embargo, al evaluar las repeticiones de *C. gloeosporioides*

RESULTS

Bacterial isolates with antagonistic capacity. A total of 278 bacterial isolates were recovered from the rhizosphere of three crops grown in the state of Campeche: the number of isolates obtained were 116 from papaya, 71 from sugarcane and 91 from rice (Table 1). Only 31, out of the 278 isolates, reached to inhibit fungus growth in the preliminary assessment of the ability to inhibit the *C. gloeosporioides* mycelia growth. Different fungal growth inhibition degrees were exerted by the different bacterial isolates (Fig. 1A). A large number of bacterial isolates were designed to be evaluated in this first stage of discrimination analysis; as a result, each isolate was labeled as positive only if a growth inhibition degree had been exerted over the fungal growth, or as negative if no inhibition had been exerted at all. The fungus grew over the bacterial growth in those cases where no inhibition had been revealed (247 isolates), as it can be observed in the first Petri dish on Fig. 1A.

Antagonism qualitative assessment. The individual capacity of each of the 31 isolates preselected to inhibit *C. gloeosporioides* growth comparing, at the end of the experiment, the distance among the edges of the colonies in each comparison was established by using dual confrontation tests (Prapagdee *et al.*, 2008). This type of experiment allows identifying metric differences among confrontations and it aids to perform a qualitative comparison among the bacterial isolates. The results of this evaluation are presented in Table 2. A greater ability to inhibit fungal growth was revealed by eight of the bacterial isolates (Ar009, Ar038, Ar042, Ar059, Ar061, Ca039, Ca044, and Pa106). However, some inconsistencies were observed, in both size and shape of the bacterial colony

Cuadro 2. Evaluación cualitativa de aislamientos bacterianos por confrontación dual para determinar el grado de inhibición a *C. gloeosporioides*.

Table 2. Qualitative assessment of bacterial isolates by dual confrontation to determine the degree of inhibition of *C. gloeosporioides*.

Aislamiento	Origen	Inhibición*	Aislamiento	Origen	Inhibición*
<i>Pa106</i>	papaya	++++	<i>Ar038</i>	arroz	++++
<i>Ca036</i>	caña	++	<i>Ar039</i>	arroz	+
<i>Ca039</i>	caña	++++	<i>Ar040</i>	arroz	+
<i>Ca041</i>	caña	++	<i>Ar041</i>	arroz	+++
<i>Ca042</i>	caña	++	<i>Ar042</i>	arroz	++++
<i>Ca044</i>	caña	++++	<i>Ar043</i>	arroz	++
<i>Ar001</i>	arroz	++	<i>Ar044</i>	arroz	+++
<i>Ar009</i>	arroz	++++	<i>Ar048</i>	arroz	++
<i>Ar013</i>	arroz	++	<i>Ar049</i>	arroz	+++
<i>Ar014</i>	arroz	++	<i>Ar056</i>	arroz	+
<i>Ar017</i>	arroz	+	<i>Ar057</i>	arroz	++
<i>Ar032</i>	arroz	++	<i>Ar058</i>	arroz	++
<i>Ar033</i>	arroz	+	<i>Ar059</i>	arroz	++++
<i>Ar034</i>	arroz	++	<i>Ar060</i>	arroz	++
<i>Ar036</i>	arroz	++	<i>Ar061</i>	arroz	++++
<i>Ar037</i>	arroz	++			

*Escala de inhibición (Vandamme *et al.*, 2007; Prapagdee *et al.*, 2008): < 5 mm (+); 5.1 a 10 mm (++); 10.1 a 15 mm (+++); > 15.1 mm (++++). En cursivas se señalan los aislamientos con mayor efecto.

creciendo en confrontación dual con un mismo aislamiento bacteriano, se observaron algunas inconsistencias ya sea en el grado de inhibición observado, o bien en el tamaño y forma de la colonia bacteriana. Como ejemplo, en la Figura 1B se muestran tres repeticiones del efecto antagonista de cuatro distintos aislamientos (Ar032, Ca044, Ar048, Ar059). Debido a que la cantidad de inóculo inicial de los microorganismos durante la confrontación no fue controlada, el tamaño de las colonias bacterianas variaron entre repeticiones; como se aprecia en el caso de las aislamientos Ca044, Ar048 y Ar059, cuyas colonias variaron claramente de tamaño en al menos una de las repeticiones. Con esta metodología no es posible determinar el grado de variación entre las colonias. En algunos casos, adicionalmente a la variación en el tamaño de la colonia, también se observaron variaciones en la distancia entre los bordes de las colonias confrontadas (Ca044); pero en otros casos, aunque el tamaño de la colonia varió, no se apreciaron diferencias cualitativas en la distancia entre los bordes (Ar059). En casos como Ar032 y Ar048 fue difícil asignar un valor para la distancia entre las colonias confrontadas ya que la forma de las colonias bacterianas es irregular y el borde del micelio es difuso. Por la inconsistencia encontrada entre las repeticiones, se realizaron ajustes a esta metodología para: controlar la cantidad de inóculo de bacterias y hongo al inicio del experimento, homogenizar el estado de desarrollo del micelio inoculado, y para obtener datos cuantitativos comparativos entre los aislamientos a evaluar.

Evaluación cuantitativa del antagonismo de los cultivos bacterianos contra *C. gloeosporioides*. El antagonismo de los ocho aislamientos hacia el crecimiento de *C. gloeosporioides* fue evaluado de forma cuantitativa a través del seguimiento diario del crecimiento de los organismos confrontados; tomando como referencia los crecimientos del hongo y de la bacteria creciendo en forma independiente (Figura 2); como se puede observar en la figura, la imagen editada en alto contraste refleja fielmente la imagen digitalizada original. El registro realizado permitió observar el día en que el crecimiento del micelio del hongo se disminuye hacia la colonia (considerando la Figura 3). A partir de ese momento la colonia del hongo comienza a “achatare” y crece sólo hacia las zonas laterales, fuera de la influencia de la actividad antagónica de los aislados bacterianos (Figura 2A). Esto ocurrió en el día siete en el caso de Ar042, ejemplo mostrado en la Figura 2. En el caso del testigo donde el hongo crece sin antagonistas, la colonia se desarrolló continuamente hasta cubrir por completo el medio de cultivo en el día 23. La digitalización (Figura 2B) permitió convertir la zona cubierta por las colonias, tanto por la bacteria como por el hongo, a un dato preciso de área en cm^2 , y calcular los parámetros utilizados en este trabajo para comparar la capacidad de los ocho aislamientos como antagonistas; así como hacer un análisis estadístico del fenómeno. La dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* en presencia de los ocho aislamientos bacterianos, de la cepa testigo BsGB03, o del hongo creciendo sin antagonistas, se muestra en la Figura 3. Las curvas de crecimiento del hongo en presencia de los antagonistas bacterianos se separan claramente de la curva

when evaluating *C. gloeosporioides* repetitions growing in confrontation with a single dual bacterial isolation. As an example, three repetitions of the antagonistic effect of four different isolates (Ar032, Ca044, Ar048, and Ar059) are shown in Fig. 1B. The size of the bacterial colonies differed among repetitions because the amount of microorganisms initial inoculums during the comparison was not controlled, as seen in the case of the Ca044, Ar048 and Ar059 isolates, whose colonies clearly varied in size at least in one of the repetitions. Consequently, it is not possible to determine the variation degree among colonies with this particular methodology. Moreover, in some cases, variations in distance among the edges of the colonies faced (Ca044) were also observed, in addition to the variation in the size of the colony; nonetheless, in other cases, despite of the variation in colony size, no qualitative differences were observed in the distance among the edges (Ar059). It was hard to assign a value, in cases as Ar032 and Ar048, for the distance among the faced colonies, since the shape of the bacterial colonies was irregular and the edge of the mycelium was diffused. Due to the inconsistency revealed among repetitions adjustments to this methodology were performed in order to control the amount of bacteria inoculums and fungus at the beginning of the experiment, homogenize the state of development of the inoculated mycelium, and to obtain quantitative data by comparing the isolates to evaluate.

Antagonism quantitative evaluation of the bacterial cultures against *C. gloeosporioides*. The antagonism of the eight isolates towards the growth of *C. gloeosporioides* was evaluated quantitatively through daily monitoring of the confronted organisms, with reference to the growth of fungus, as well as the bacteria to grow independently (Figure 2). As shown in the figure, the original scanned image is accurately reflected by the edited image in high contrast. Such record made it possible to observe the day on which the mycelium growth stopped, interrupting the frontal growth towards the antagonist bacterial colony. The fungus colony began to “flatten” from that very moment, starting to grow only to the sides, outside the influence of the bacterial isolates antagonistic activity (Figure 2A). This occurred on the 7th day in the case of Ar042, example shown in Figure 2. Regarding the case of the witness where the fungus grew without antagonists, the colony developed itself continuously to have the culture medium fully covered by day 23.

It was allowed by the scanning (Figure 2B) to turn the area covered by the colonies, for both the bacteria and the fungus, into a data of a precise area in cm^2 , as well as to calculate the parameters used in the study hereby to compare the ability of the eight isolates as antagonists, and to perform a statistical analysis of the phenomenon. The *C. gloeosporioides* growth dynamics in the presence of eight bacterial isolates from the control strain BsGB03, or the fungus growing without antagonists, is shown in Figure 3. The fungus curves growth in the presence of bacterial antagonists is clearly separated from the curve where the fungus grows without antagonists; this is evident, for all isolates, from the 10th day. As shown in the digitalized

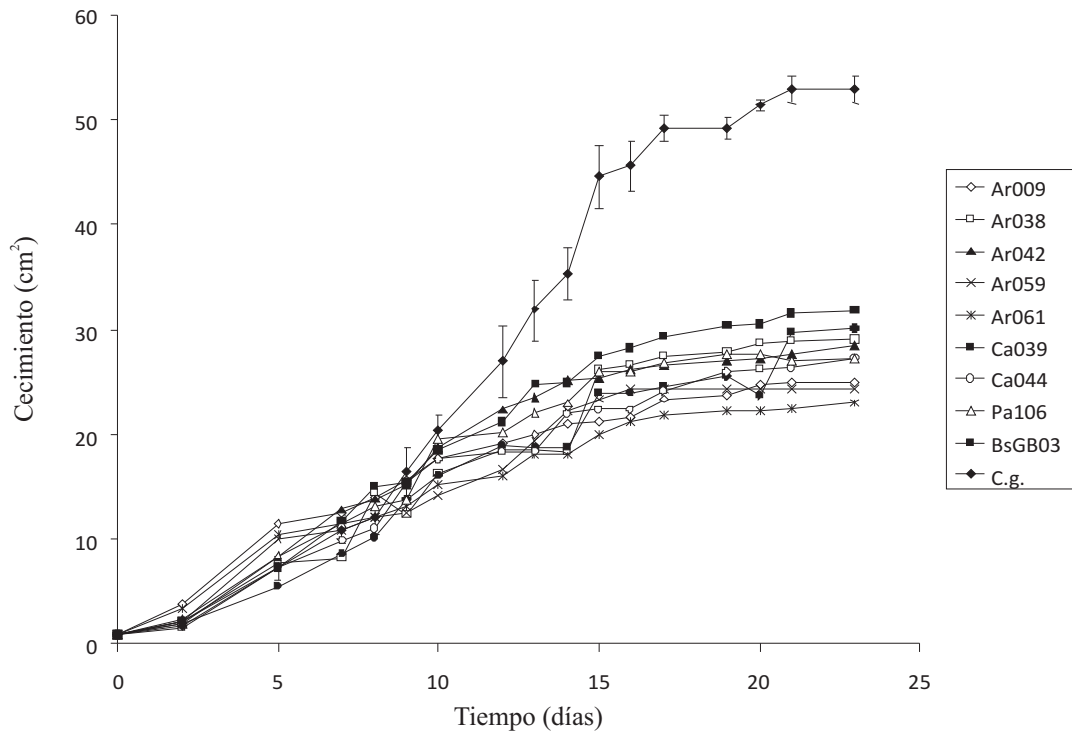


Figura 3. Dinámica del crecimiento de *C. gloeosporioides* creciendo en presencia de ocho aislamientos bacterianos, la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación (Cg). Las áreas cubiertas por el crecimiento de *C. gloeosporioides* en tres repeticiones fueron cuantificadas (cm²) con el ImageTool a partir de imágenes digitalizadas. Debido a la densidad de datos se presentan únicamente los valores de la desviación estándar de *C. gloeosporioides* creciendo sin antagonistas.

Figure 3. Growth dynamics of *C. gloeosporioides* growing in the presence of eight bacterial isolates, the control strain BsGB03, or without confrontation (Cg). The areas covered by *C. gloeosporioides* growth in three replicates were quantified (cm²) with the Image Tool from scanned images. Only the *C. gloeosporioides* growing standard deviation values are presented without antagonists.

donde el hongo crece sin antagonistas; esto es evidente, para todos los aislamientos, a partir del día 10. En las imágenes digitalizadas se observó que la interrupción del crecimiento frontal y “achatamiento” de la colonia del hongo ocurrió entre el día siete y nueve, dependiendo del aislamiento (datos no mostrados). En la Figura 4A y el Cuadro 3 se muestra el área final alcanzada por *C. gloeosporioides* creciendo en confrontación dual con cada uno los ocho aislamientos bacterianos, y en los testigos. En todos los casos el área de crecimiento del hongo es significativamente menor ($p < 0.001$) al crecer en confrontación con respecto al testigo creciendo sin antagonistas. Los aislamientos Ar061 y Ar059 son los que más efecto tuvieron sobre el crecimiento del hongo. Todos los aislamientos mostraron tener mayor efecto inhibitorio que la cepa comercial BsGB03 utilizada como testigo. El porcentaje de inhibición ejercida por cada aislamiento bacteriano sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* se muestra en el Cuadro 3. Los aislamientos bacterianos que causaron mayor porcentaje de inhibición fueron Ar061, Ar059 y Ar009; con valores de 56.7, 54.2 y 52.8% de inhibición, respectivamente. La cepa testigo BsGB03 sólo inhibió el 39.9 % del crecimiento del hongo, valor inferior al obtenido con cualquiera de los aislamientos nativos evaluados.

images, it is observed that, depending on the isolation, both the interruption and “flattening” of the fungus colony took place between the 7th and the 9th day (data not shown). The final area reached by *C. gloeosporioides* is shown growing in dual confrontations with each one of the eight bacterial isolates, as well as in controls. The area of fungal growth is significantly lower ($p < 0.001$) in all cases, as these are grown in confrontation to the control which is growing with no antagonists. The Ar061 and Ar059 isolates had the greatest effect on the fungus growth. A higher inhibitory level than the BsGB03 commercial strain, used as control, was revealed by all of the isolates. The inhibition percentage for each bacterial isolate exerted on *C. gloeosporioides* growth is shown on Table 3. The bacterial isolates causing the highest inhibition percentage were Ar061, Ar059 and Ar009; with values of 56.7, 54.2 and 52.8% inhibition, respectively. The BsGB03 control strain only reached to inhibit 39.9% of the fungus growth, which is below the values obtained by any of the native isolates tested.

A change in growth rate is implied by the change in the slope of the fungus growth curves confronted by the antagonistic bacteria (Figure 3). As it is shown in Fig. 4B, this value decreased in all cases by the effect derived from the antagonistic bacteria. Highly significant differences

Cuadro 3. Área total final (cm²) alcanzada a los 23 días por *C. gloeosporioides* y los aislamientos bacterianos; creciendo individualmente o en confrontación dual.

Table 3. Final total area (cm²) achieved at 23 days for *C. gloeosporioides* and bacterial isolates, growing singly or in dual confrontation.

Aislamiento	H	Inhibición de <i>C. gloeosporioides</i> (%)	B	B*	Zona de inhibición**
Ar038	29.0 ± 4.0	45.1	5.9 ± 0.8	3.0 ± 0.03	31.6 ± 2.8
Ca039	30.0 ± 2.6	43.2	8.5 ± 2.8	7.8 ± 0.6	25.8 ± 1.2
Ca044	27.2 ± 1.5	48.5	13.0 ± 1.4	13.6 ± 2.6	26.1 ± 0.8
Pa106	27.2 ± 2.3	48.7	6.1 ± 1.2	10.3 ± 0.2	22.8 ± 1.9
Ar009	25.0 ± 6.8	52.8	4.3 ± 0.6	3.00 ± 1.00	35.6 ± 3.4
Ar042	28.4 ± 2.5	46.2	4.00 ± 0.5	2.2 ± 0.3	33.0 ± 2.3
Ar059	24.2 ± 0.81	54.2	50.6 ± 1.6	31.4 ± 2.0	8.0 ± 1.0
Ar061	22.9 ± 2.0	56.7	51.5 ± 2.5	12.1 ± 1.2	28.6 ± 1.7
Bs GB03	31.8 ± 1.9	40	5.1 ± 0.6	6.3 ± 1.4	25.5 ± 1.3
<i>C. gloeosporioides</i> *	52.9 ± 1.3	-	-	-	-

H: *C. gloeosporioides* creciendo en confrontación con cada aislamiento bacteriano.

B: Aislamiento bacteriano creciendo individualmente.

B*: Aislamiento bacteriano creciendo en confrontación dual.

* Área total de hongo, al final del experimento creciendo sin confrontación.

** Área que no es cubierto por el crecimiento de los microorganismos.

El cambio en la pendiente de las curvas de crecimiento del hongo confrontado con las bacterias antagonistas (Figura 3), implica un cambio en la tasa de crecimiento. La Figura 4B muestra que, en todos los casos, este valor disminuyó por efecto de las bacterias antagonistas. El análisis estadístico, mostró diferencias ($p < 0.001$) en la tasa de crecimiento del hongo confrontado con todos los aislamientos bacterianos, con relación al testigo sin confrontación. *C. gloeosporioides* creció a una tasa promedio de 2.69 cm² día en ausencia de antagonistas, mientras que el crecimiento del hongo en confrontación varió entre 0.88 y 1.42 cm² día⁻¹. Las menores tasas promedio de crecimiento se observaron en confrontación con Ar061 y Ar059, seguidas por Ar009, Pa106, Ar042, Ca044 y la cepa testigo BsGB03. El aislamiento Ar061 fue el que más inhibió el crecimiento del hongo, disminuyendo su tasa de crecimiento a 0.88 cm² día⁻¹ (tres veces menor que en el testigo). En la Figura 5 se muestra una imagen, al final de la evaluación, de una repetición de los experimentos de confrontación dual de *C. gloeosporioides* contra cada uno de los ocho aislamientos bacterianos, y los testigos. Conforme con los análisis anteriores, se observa que el tamaño de la colonia de *C. gloeosporioides* es menor en cualquiera de los ensayos de confrontación que cuando crece sin antagonistas. Adicionalmente se observa que la coloración de la colonia fúngica también se alteró en respuesta a la confrontación con algunos aislamientos; y que hay gran variación en el tamaño de las diferentes colonias bacterianas, así como en el área sin crecimiento entre los bordes de ambas colonias (zona de inhibición). Los valores del área cubierta por las colonias bacterianas, y los de las zonas de inhibición, se reportan en el Cuadro 3. Ar061 y Ar059, los dos aislamientos que mostraron mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de

were revealed by the statistical analysis ($p < 0.001$), in the fungus growth rate when confronted with all of the bacteria isolates with regards to the control without confrontation. A 2.69 cm² day⁻¹ average growth rate was revealed as well by *C. gloeosporioides* in the absence of antagonists, whereas the fungus growth in comparison varied between 0.88 and 1.42 cm² day⁻¹. The lowest average growth rates were observed in comparison with Ar061 and Ar059, followed by Ar009, Pa106, Ar042, Ca044 and the control strain BsGB03. The Ar061 was the most inhibiting isolation of the fungus growth, having its growth declining to 0.88 cm² day⁻¹ three times lower than in the control). An image of a repetition, at the end of the evaluation, of the *C. gloeosporioides* dual confrontation experiments against each of the bacterial isolates and witnesses, is shown in Figure 5. Consistent with previous analyses, it is clear that the size of the *C. gloeosporioides* colony is lower in any of the confrontation tests as when it is grown without antagonists. Additionally, it was observed that the fungal colony coloration was also altered in response to the confrontation with some isolates, and that there was a great variation in the size of individual bacterial colonies, as well as in area without any growth among the edges of both colonies (inhibition zone). The values of the area covered by the bacterial colonies and the inhibition zones are reported in Table 3. Both Ar061 and Ar059, which were the two isolates revealing a higher inhibitory effect on *C. gloeosporioides* growth (Figure 4) had an invasive behavior, generating large colonies that competed against the fungus colony for the available space, as well as a comparatively small inhibition zone (Figure 5).

Conversely, the largest inhibition zones were observed on Ar009, Ar038 and Ar042 isolates (35.6, 31.6 and 33.0 cm², respectively). The colonies of these three

C. gloeosporioides (Figura 4), presentaron un comportamiento invasivo, generando colonias extensas que compiten con la del hongo por el espacio disponible, así como una zona de inhibición relativamente pequeña (Figura 5). Por el contrario, las zonas de inhibición más extensas se observaron con los aislamientos Ar009, Ar038 y Ar042 (35.6, 31.6 y 33.0 cm², respectivamente). Las colonias de esos tres aislamientos bacterianos fueron las de menor tamaño, cubriendo áreas de 3.0, 3.0 y 2.2 cm², respectivamente (Cuadro 3); áreas de 10 a 14 veces menos extensas que la cubierta por Ar059. El análisis conjunto de todas las curvas de crecimiento, tanto de *C. gloeosporioides* como de las bacterias, confrontados o sin confrontación, no permitió identificar dos diferentes tipos de comportamiento entre los ocho aislamientos analizados. En un grupo de aislamientos, conformado por Ar009, Ar038, Ar042, Ca039, Ca044 y Pa106, los cuales desarrollan una colonia relativamente pequeña y generaron una amplia zona de inhibición (Figura 5), la pendiente de la curva de crecimiento del fitopatógeno se modificó alrededor del día siete, reduciendo su tasa de crecimiento, alcanzando la fase estacionaria de la curva prematuramente con respecto al crecimiento del hongo sin confrontación y disminuyó de forma importante el área final cubierta por el hongo. En cambio, las curvas de crecimiento de la bacteria, en presencia y en ausencia de *C. gloeosporioides*, indicaron que el hongo no tiene efecto, o tuvo un efecto inhibitorio mínimo (Ar038), sobre el crecimiento de las bacterias. Ejemplos de esa respuesta se muestran en la Figura 6A (cepa testigo BsGB03) y Figura 6B (Ar042). En el otro grupo de aislamientos, conformado por Ar061 y Ar059, cuya colonia creció de forma invasiva cubriendo por completo el área disponible en la caja Petri cuando se sembraron individualmente (Figura 6C), mostraron una zona de inhibición poco extensa (Figura 5), las curvas de crecimiento, tanto del fitopatógeno como de su antagonista, se modificaron al crecer en confrontación con respecto a cuándo crecieron de forma aislada; como se muestra, para el caso de Ar059 (Figura 6C). La presencia del hongo en la confrontación dual inhibe el crecimiento de Ar061 y Ar059 (Cuadro 3).

Identificación molecular de aislamientos bacterianos. Los iniciadores universales reportados previamente (Marchesi *et al.*, 1998), amplificaron un fragmento de ARNr 16S de aproximadamente 1300 pb a partir de los ocho aislamientos seleccionados. Las secuencias consenso fueron depositadas en el GenBank con el número de acceso presentado en el Cuadro 4. Mediante el análisis BLAST se encontró que las secuencias de los diversos aislamientos presentaron una alta identidad (99%), con secuencias previamente reportadas para el género *Burkholderia* (*Pseudomonas*) o *Bacillus* (Cuadro 4). Para establecer con más precisión la posible identidad, a nivel de especie de las bacterias aquí caracterizadas, secuencias de diversas especies de *Burkholderia* o *Bacillus* homólogas en un 99% a nuestras secuencias consenso, se alinearon y posteriormente se agruparon mediante un análisis filogenético generando el fenograma presentado en la Figura 7. El agrupamiento de las secuencias de ARNr 16S

bacterial isolates were the smallest, covering areas of 3.0, 3.0 and 2.2 cm², respectively (Table 3), which were areas 10 to 4 times smaller than that covered by Ar059. The combined analysis of all of the growth curves, from both *C. gloeosporioides* and bacteria, either with or without confrontation, were not sufficient to identify the two different types of behavior among the eight tested isolates: The slope of the growth curve of the phytopathogen became modified around day seven in a group of isolates formed by Ar009, Ar038, Ar042, Ca039, Ca044 and Pa106, which developed a relatively small colony, and generated a large inhibition zone (Figure 5), reducing its growth rate and reaching the curve stationary phase prematurely with regards to the fungus growth without confrontation, decreasing the final area covered by the fungus, significantly. Nevertheless, it was not indicated by the bacteria growth curves in the presence and absence of *C. gloeosporioides* that the fungus does neither have nor had a minimal inhibitory effect (Ar038) on bacteria growth. Examples of this behavior are shown on Figure 6 (BsGB03 control strain) and on Figure 6B (Ar042). The growth curves of both the plant pathogen and its antagonists became clearly modified as those grew in confrontation with regards to the point where they were grown in isolation, as shown for the Ar059 case, in the other group of isolates formed by Ar061 and Ar059 (Table3), whose colony grew invasively, fully covering the area available in the Petri dish when grown individually (Fig. 6C), and showing a very extensive inhibition zone.

Bacterial Isolates molecular identification. A fragment of ARNr 16S, of approximately 1300 bp from the eight selected isolates, was amplified by the universal primers previously reported (Marchesi *et al.*, 1998). The consensus sequences were deposited in the GenBank under the access number shown in Table 4. It was revealed, by BLAST analysis, that the sequences of several isolates had a high identity (99%) with sequences previously reported for the *Burkholderia* (*Pseudomonas*) or *Bacillus* genus (Table 4). Sequences from diverse *Burkholderia* or *Bacillus*, 99% homologous to our consensus, were aligned and then pooled

Cuadro 4. Identificación de aislamientos bacterianos por homología del ARNr 16S.

Table 4. Identification of bacterial isolates by 16S rRNA homology.

Aislamiento	GenBank	Mejor Hit	Homología ^x
Ar009	JF 962418	<i>Burkholderia</i>	99%
Ar038	JF 962419	<i>Burkholderia</i>	99%
Ar042	JF 962416	<i>Bacillus</i>	99%
Ar059	JF 962417	<i>Bacillus</i>	99%
Ar061	JF 962420	<i>Burkholderia</i>	99%
Ca039	JF 962422	<i>Bacillus</i>	99%
Ca044	JF 962421	<i>Bacillus</i>	99%
Pa106	JF 962423	<i>Bacillus</i>	99%

^xLa homología es con referencia al género mencionado (p.ej. 99% similar a *Burkholderia*).

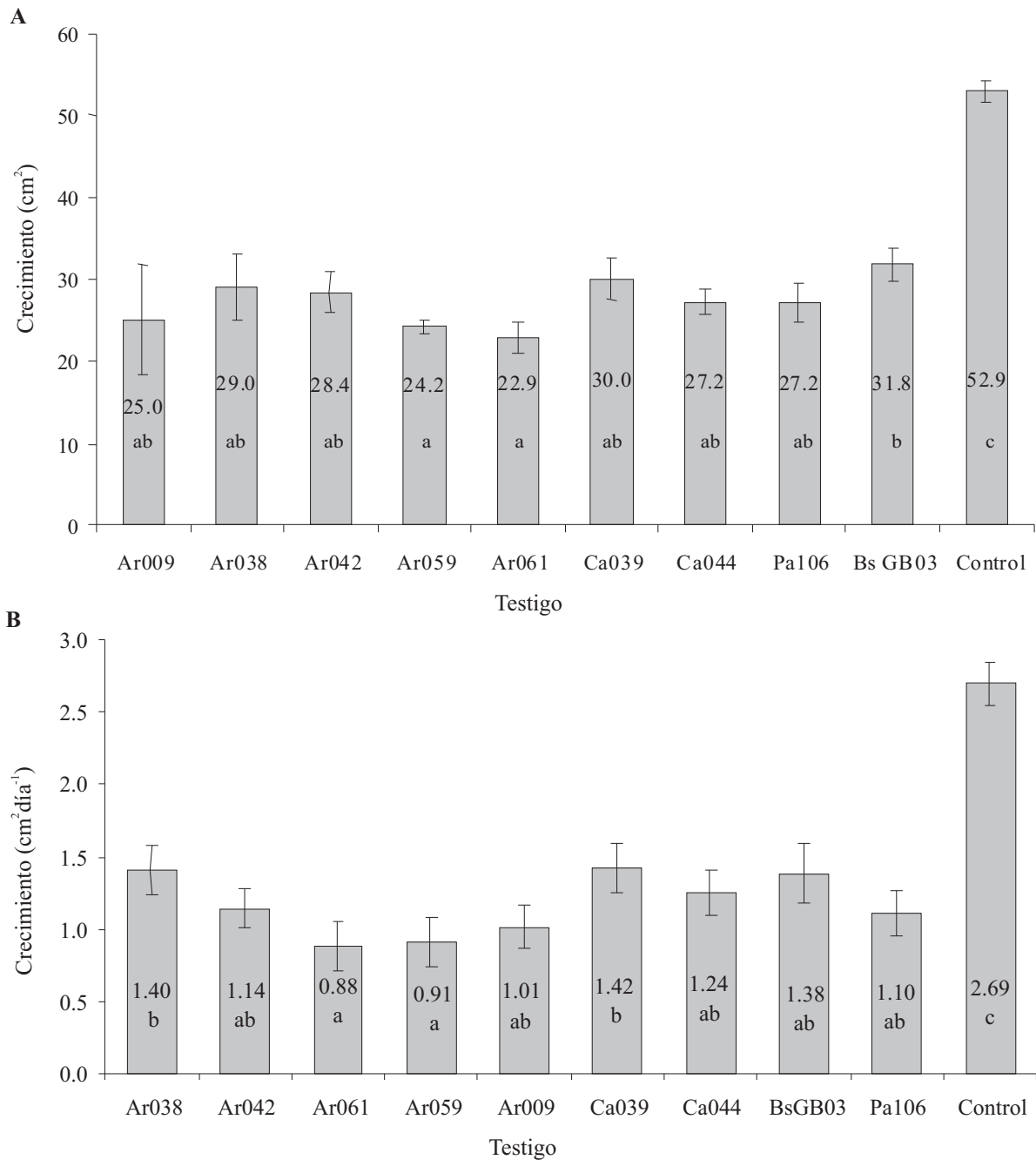


Figura 4. Cuantificación del efecto de aislamientos bacterianos sobre el crecimiento *C. gloeosporioides*. A. Área de crecimiento total de *C. gloeosporioides* al final de la evaluación con los ocho aislamientos, comparando con la cepa testigo BsGB03, o creciendo sin antagonistas (Cg). B. Tasa promedio de crecimiento diario de *C. gloeosporioides* confrontado con los ocho aislamientos bacterianos, la cepa testigo BsGB03, o sin confrontación. Los valores dentro de las columnas corresponden al área total final (cm²) o a la tasa de crecimiento (cm²día⁻¹), (A y B, respectivamente). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.001$).

Figure 4. Quantification of the bacterial isolation effect on *C. gloeosporioides* growth. A. Area of *C. gloeosporioides* total growth at the end of the evaluation with the eight isolates, compared to the BsGB03 control strain, or growing without antagonists (Cg). B. Average rate of *C. gloeosporioides* daily growth with the eight bacterial isolates, the BsGB03 control strain, or without confrontation. Values within the columns correspond to the final total area (cm²) or to the growth rate (cm²day⁻¹), (A and B, respectively). Values with the same letter are not significantly different ($p < 0.001$).

muestra que los aislamientos Ar061 y Ar038 quedan ubicados dentro del grupo similar a *Burkholderia lata* y Ar009 es más similar a *Burkholderia cepacia*. Los aislamientos Ar042, Ca039 y Ar059, quedan agrupados dentro del grupo de *Bacillus cereus*; Ca044 queda ubicado dentro del grupo similar a *Bacillus subtilis*; y Pa106 se asocia al grupo de *Bacillus pumilus*. Los cinco aislamientos bacterianos relacionados mediante el análisis molecular a especies del género *Bacillus* presentaron la morfología típica correspondiente a este género en cuanto al crecimiento de la colonia (Figura 5), morfología celular en estado vegetativo, y formación de esporas (datos no mostrados). Es importante mencionar que frecuentemente las colonias de los aislamientos identificados como *Bacillus*, debido a la motilidad de la bacteria, muestran una forma irregular emitiendo lóbulos digitiformes, como es el caso de Pa106 en la Figura 5. Se observó que en este aislamiento, la emisión de estos lóbulos se incrementó en los últimos días de la evaluación (datos no mostrados), ocasionando que los datos de área de la bacteria creciendo en confrontación se muestre como estimulada por la presencia del hongo con respecto a su tamaño creciendo de forma aislada.

DISCUSIÓN

Es difícil establecer la potencialidad de algún aislamiento basado únicamente en la evaluación cualitativa del área de inhibición al final de una confrontación. Tratando de incrementar la exactitud de las mediciones, algunos trabajos reportan el crecimiento radial de las colonias mediante el uso de micrómetros (Tequida *et al.*, 2002); este tipo de medición, asume que el crecimiento radial es una variable constante en todas sus direcciones, sin embargo la colonia desarrollada casi nunca es un círculo perfecto. Ejemplos de esta situación es reportado por Ramos *et al.* (2010), en ambos trabajos evalúan ascomycetes en su actividad antagonista contra *Phytophthora capsici*; aunque miden el radio para calcular el área, tanto de la colonia del hongo como de los ascomycetes, se demuestra el crecimiento irregular de las colonias. A diferencia de lo anterior, en nuestra evaluación, el método de digitalización y la medición de las áreas de crecimiento permitió, independientemente de la forma de la colonia, hacer comparaciones precisas entre aislamientos bacterianos mediante parámetros cuantitativos como: el tamaño de las colonias confrontadas al final de la evaluación, la tasa promedio de crecimiento, el porcentaje de inhibición, y el tamaño final de la zona de inhibición; los cuales consideramos descriptores igualmente importantes para evaluar la potencialidad de algún aislamiento. Estos parámetros nos permitieron establecer, cuantitativa y estadísticamente, que ocho aislamientos bacterianos de la rizósfera de plantas cultivadas en el trópico húmedo, inhiben el crecimiento de *C. gloeosporioides in vitro*, con igual o mayor capacidad que la cepa comercial BsGB03. En términos aplicados, la selección de un aislamiento para su utilización en el control de un patógeno, se basa en su capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno. A nuestro criterio, los aislamientos con mayor potencial para ser evaluados en campo, en orden de importancia son

using a phylogenetic analysis to generate the dendrogram shown in Fig. 7, looking forward to establish a more precise possible identity, at species level, of the bacteria characterized in the study hereby. It was revealed by the grouping of the ARNr 16S sequences that the Ar061 and Ar038 isolates were located within the group similar to *Burkholderia lata*, and that Ar009 was more similar to *Burkholderia cepacia*. The Ar042, Ca039 and Ar059 isolates are grouped within the *Bacillus cereus* group; Ca044 was located within the group similar to *Bacillus subtilis*, and Pa106 was associated to the *Bacillus pumilus* group. A typical morphology was revealed by the five bacterial isolates related by molecular analysis to the *Bacillus* genus species, regarding colony growth and cell morphology, in both vegetative and spore formation (data not shown). It is noteworthy that an irregular shape and finger emitting lobes is often shown by the colonies from the isolates identified as *Bacillus*, as it is the case of Pa106 in Fig. 5. It was observed that for this isolation the issuance of these lobes increased in the last days of evaluation (data not shown), causing the data of the bacterial area growing in confrontation to display itself as stimulated by the presence of the fungus with regards to its size growing in isolation.

DISCUSSION

It is difficult to establish the potential based solely on the inhibition area qualitative assessment at the end of a confrontation. Aiming to increase measurement accuracy, the radial growth of some colonies has been reported to be measured by using micrometers (Tequida *et al.*, 2002). As a consequence, it is assumed by the use of such measurements that the radial growth is a constant variable in all of its directions; however, the developed colony is not likely to make a perfect circle. Examples of this situation are reported by Ramos *et al.* (2010); ascomycetes in their antagonistic activity against *Phytophthora capsici* are evaluated in both of these studies. The irregular growth of the colonies is demonstrated by these studies, even though the radius is measured in order to calculate the area of both the fungus colony and the ascomycetes. Unlike the above, it was allowed by the scanning method and the growth areas measurement, in the study hereby, to make accurate comparisons among bacterial isolates by quantitative parameters, such as: size of the colonies confronted at the end of the evaluation, average growth rate, inhibition percentage and the final size of the inhibition zone, regardless the shape of the colony, which were considered as equally important descriptors to assess the potential for isolation. It was allowed by these parameters to establish, both quantitatively and statistically, that eight bacterial isolates from the rhizosphere of plants grown in the humid tropics reach to inhibit *C. gloeosporioides* growth *in vitro*, with equal or even greater capacity than BsGB03 commercial strain. The isolate selection, in terms applied for its utilization in pathogen control, is based on their ability to inhibit the growth of the pathogen. Considering, based on parameters set forth herein, the isolates with the greatest potential to be evaluated in the field, in order of importance, are Ar009, Ar042, Ar038 and Ca039. The fungus growth rate

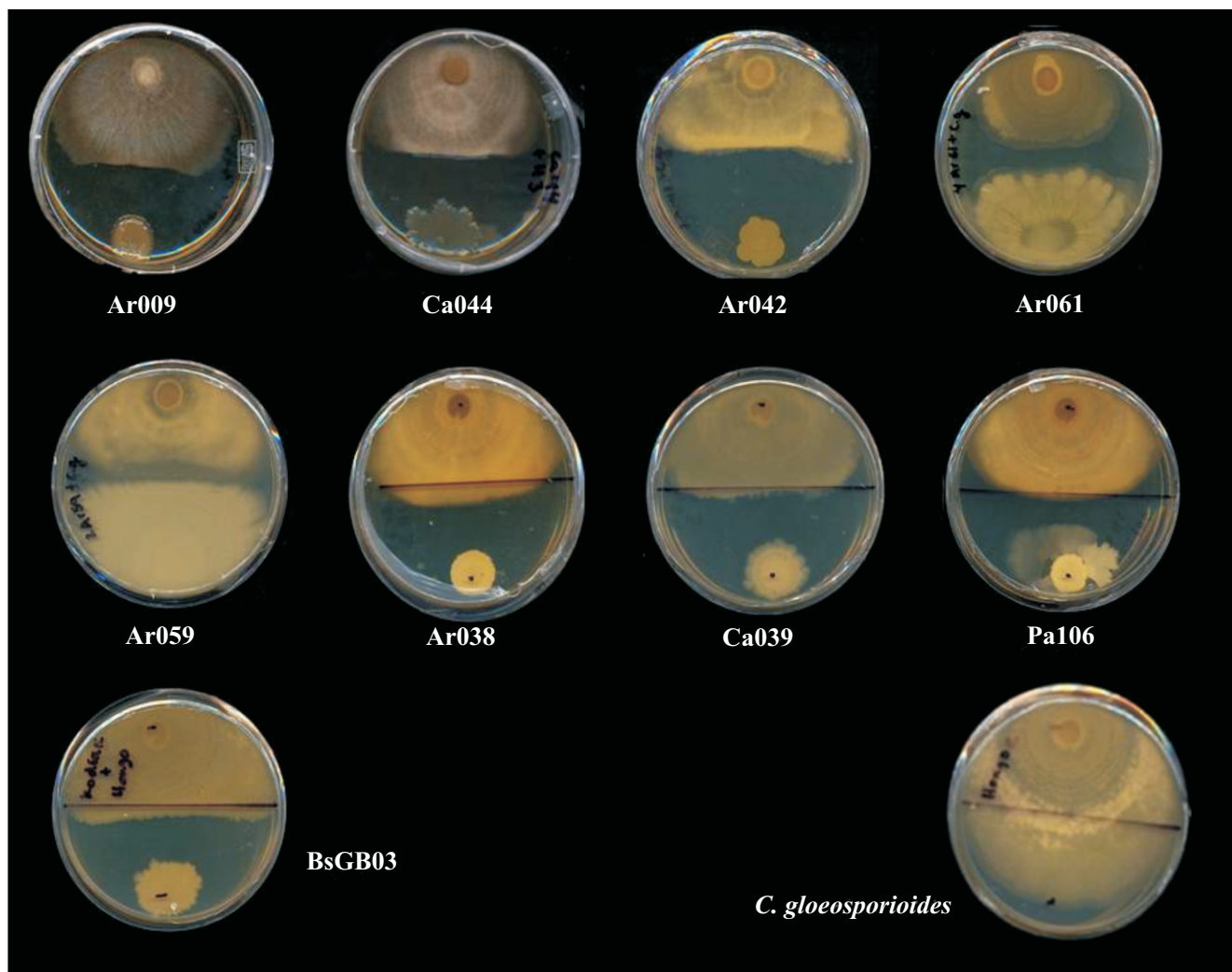


Figura 5. Imagen del efecto inhibitorio de ocho aislamientos bacterianos sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* al final de la evaluación (23 días), comparando con su crecimiento de forma aislada.

Figure 5. Picture of eight bacterial isolates inhibitory effect on *C. gloeosporioides* growth at the end of the evaluation (23 days), comparing with its growth in isolation.

Ar009, Ar042, Ar038 y Ca039. Todos estos aislamientos redujeron la tasa de crecimiento del hongo mostrando mayor inhibición que la cepa comercial; generaron amplias zonas de inhibición (efecto a distancia), sin requerir desarrollar una colonia muy extensa para ejercer su efecto antagonista; y adicionalmente no hay efecto fuerte de antagonismo del hongo sobre las bacterias. La utilidad de estos aislamientos como agentes de control biológico debe ser confirmada con una evaluación en campo.

Entre los mecanismos reportados por bacterias para la inhibición del crecimiento en hongos, se menciona la generación de metabolitos inhibidores liberados al medio circundante, y la inhibición por competencia (de Weger *et al.*, 1986; Juhnke *et al.*, 1987; Besson y Michel, 1990; Eshita *et al.*, 1995). No fue objetivo de este trabajo identificar el mecanismo de inhibición de los aislamientos evaluados. Sin embargo, los resultados observados durante el desarrollo de *C. gloeosporioides* en confrontación con los

was reduced by all of these isolates, generating large inhibition zones (distance effect) showing a greater inhibition than the commercial strain, without needing to develop a larger colony to exert its antagonistic effect; furthermore, there is a lack of a strong fungus antagonistic effect on the bacteria. The service of these isolates as biological control agents must be confirmed by a field evaluation.

The generation of inhibiting metabolites to the surrounding medium, as well as the inhibition by competence, has been reported among the mechanisms for bacteria by fungal growth inhibition (de Weger *et al.*, 1986; Juhnke *et al.*, 1987; Besson and Michel, 1990; Eshita *et al.*, 1995). The present study was not aimed to identify the isolates tested inhibition mechanism. However, it is suggested by the results obtained during *C. gloeosporioides* development in confrontation with the Ar009, Ca044, Ar042, Ar038, Ca039 and Pa106 isolates, that in a clear

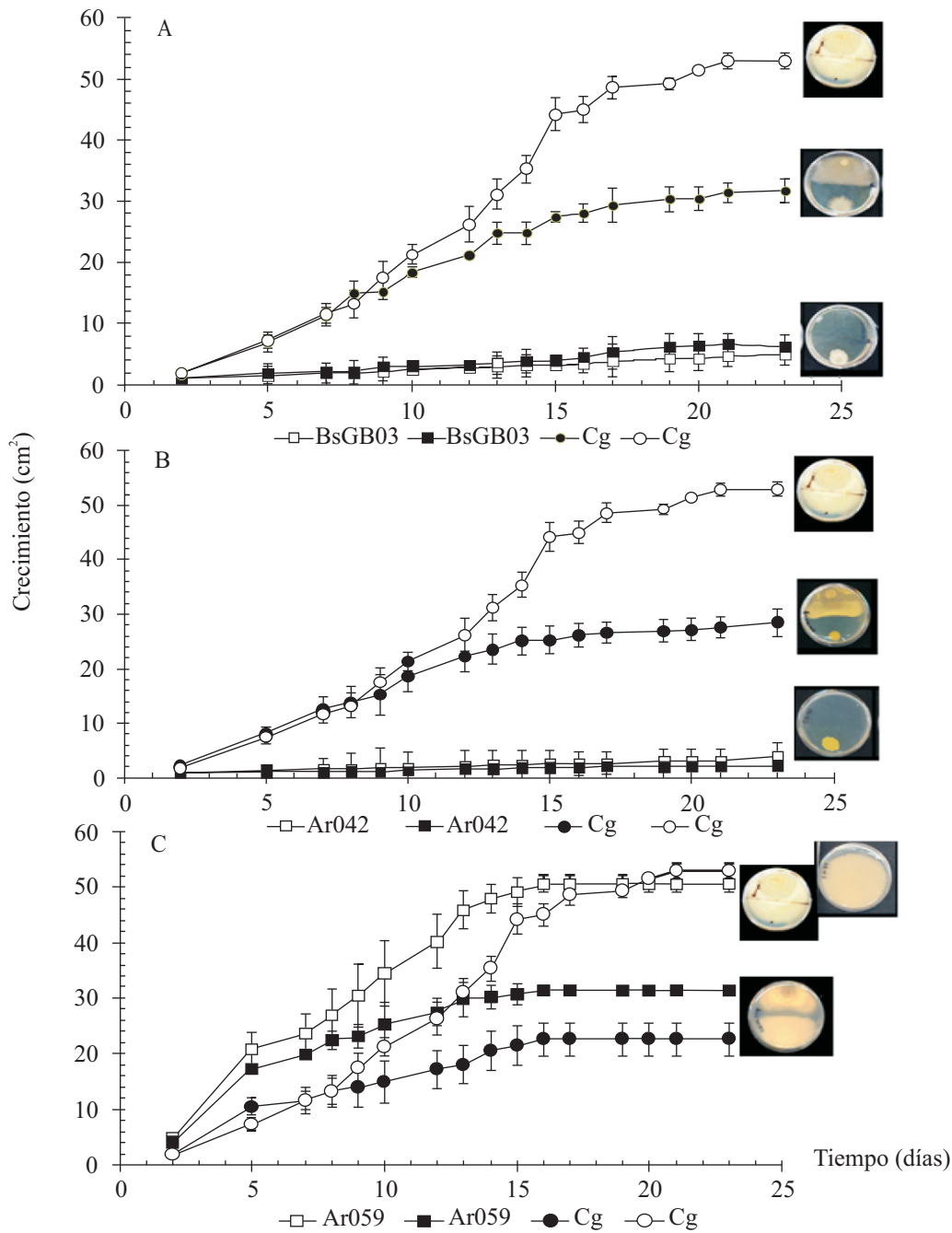


Figura 6. Dinámica de crecimiento de *C. gloeosporioides* y del antagonista creciendo bajo condiciones de confrontación o de forma aislada. Se ejemplifican dos diferentes comportamientos identificados: BsGB03 (A) y Ar042 (B), los cuales no se afectaron por la presencia del hongo; y Ar059 (C), la cual se inhibe al crecer en presencia del hongo. A la derecha de cada curva de crecimiento se muestra la imagen correspondiente al punto final de cada evaluación. Crecimiento de *C. gloeosporioides* sin antagonistas (○); *C. gloeosporioides* en confrontación (●); crecimiento del aislamiento bacteriano (□); aislamiento bacteriano en confrontación (■). Las barras verticales indican el error estándar para cada dato.

Figure 6. Growth dynamics of *C. gloeosporioides* and the antagonist growing under either confrontation or isolation conditions. The identification of two different behaviors, BsGB03 (A) and Ar042 (B), are exemplified, which were not affected by the fungus presence; Ar059 (C), which becomes inhibited as it grows in the presence of the fungus. The image corresponding to the end of each assessment is shown to the right of each growth curve. The *C. gloeosporioides* growth without antagonists (○); *C. gloeosporioides* in confrontation (●); bacterial isolate growth (□); bacterial isolate in confrontation (■). The standard error for each data is indicated by the vertical bars.

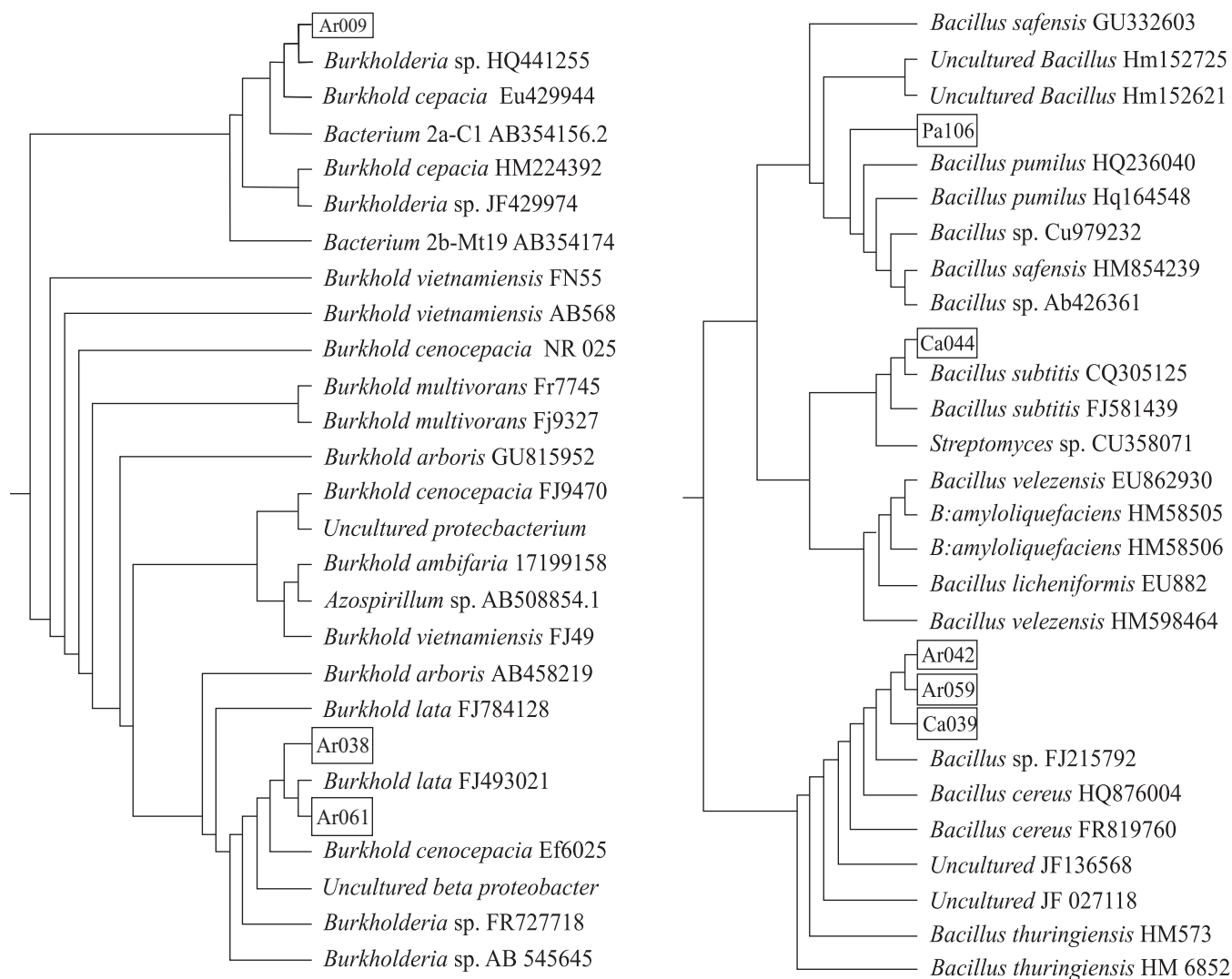


Figura 7. Filograma de los ocho aislamientos bacterianos agrupados por homología con secuencias relacionadas de ARNr 16S de especies conocidas reportadas en el GeneBank. Agrupamiento para secuencias relacionadas con el género *Burkholderia* (izquierda); agrupamiento para secuencias relacionadas con el género *Bacillus* (derecha).

Figure 7. Phylogram of eight bacterial isolates grouped by sequence homology to ARNr 16S sequences of known species reported in the Gene Bank. Grouping for sequences related to the *Burkholderia* genus (left); grouping for sequences related to the *Bacillus* genus (right).

aislamientos Ar009, Ca044, Ar042, Ar038, Ca039 y Pa106 sugieren que el micelio del hongo detiene su crecimiento frontal cuando alcanza la zona de inhibición generada por estos aislamientos, debido a que en dicha zona podría existir una concentración efectiva de metabolitos con la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, secretados por la bacteria antagonista hacia el medio de cultivo. A partir de ese punto el hongo solo puede crecer hacia las zonas laterales, donde los metabolitos inhibidores se encuentran en menor concentración, o no existen. Pa106, al detectar la presencia del hongo (por posibles metabolitos del hongo), responde emitiendo los lóbulos. Este tipo de respuesta se ha descrito para algunas especies de *Bacillus* (Seenesi *et al.*, 2002;

antibiosis effect, the fungus mycelium stops growing when the frontal inhibition zone produced by these isolates is reached, due to the fact that in this area there could be an effective metabolites concentration with the ability to inhibit fungus growth secreted by the antagonistic bacteria to the growth medium. The fungus can only form itself to the sides from that point on, where the metabolites are either an inhibitor in lower concentrations or it is absent. As the presence of the fungus is detected by Pa106 (by possible fungus metabolites) it responds by emitting lobes. Such response has been previously described by some *Bacillus* species (Seenesi *et al.*, 2002; Ingham and Ben-Jacob, 2008) that the genus Pa106 belongs to. The alteration observed in

Ingham and Ben-Jacob, 2008), género al cual pertenece Pa106. La alteración observada en la coloración de las colonias fúngicas crecidas en confrontación con algunos de los aislamientos bacterianos (Figura 5), posiblemente se debe a reacciones diferenciales del hongo ante los distintos metabolitos que produce cada aislamiento. En cambio, Ar061 y Ar059, bacterias de crecimiento invasivo (Figuras 5 y 6), presentaron un posible antagonismo por competencia de nutrientes y/o de espacio, comportamiento reportado ya para otras especies (Lam *et al.*, 2009). En estos dos casos se registró un antagonismo mutuo entre el hongo y los aislamientos, ya que el hongo también ejerció un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las bacterias, este hecho también ha sido reportado (Ansari *et al.*, 2005). La presencia de un halo de inhibición en estas confrontaciones, aunque fue de área muy limitada, muestra que también hay un efecto de antibiosis.

El análisis molecular basado en la comparación de las secuencias bacterianas del gene ribosomal 16S (ARNr 16S) permitió una identificación precisa a nivel de género de los ocho aislamientos antagonistas aquí identificados, indicando que tres de ellos pertenecen al género *Burkholderia* (Ar009, Ar038 y Ar061) y cinco al género *Bacillus* (Ca044, Pa106, Ar042, Ar059 y Ca039). Aunque el gene ARNr 16S es altamente conservado, diferencias mínimas a lo largo de su secuencia son significativas desde el punto de vista biológico, y son suficientes para permitir clasificar los organismos en grupos específicos en base a su homología. El análisis filogenético, mostró que los aislamientos Ar061 y Ar038 son bacterias ubicadas dentro del grupo de *Burkholderia lata*, mientras que Ar009 es más similar a *Burkholderia cepacia*. Los aislamientos Ar042, Ca039 y Ar059, fueron ubicados dentro del grupo de *Bacillus cereus* (Maughan y Van der Auwera, 2011); Ca044 es similar al grupo de *Bacillus subtilis*; y Pa106 se asocia al grupo de *Bacillus pumilus*. Sobre el comportamiento antagonista, las especies aquí referidas del género *Bacillus* han sido ampliamente evaluadas no solo en su capacidad como antagonistas a fitopatógenos, sino como promotoras del crecimiento y del rendimiento en plantas (Besson y Michel, 1990; Sandrin *et al.*, 1990; Eshita *et al.*, 1995; Kajimura *et al.*, 1995). De las especies *B. pumilus* y *B. cereus* hay numerosos reportes como habitantes naturales de la rizósfera de plantas y con antagonismo demostrado hacia hongos fitopatógenos (Eshita *et al.*, 1995). La especie *Burkholderia cepacia* se ha reportado como habitante natural en la endorizósfera de una gran variedad de plantas y con una fuerte actividad antagonista (Whipps y Lynch, 1985; Ramette *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Vandamme *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2008). Actualmente estamos confirmando la identidad a nivel de especie con base en pruebas microbiológicas estándares.

La actividad antagonista *in vitro* de los aislamientos aquí caracterizados, obtenidos a partir de suelos de Campeche, México, pone en evidencia la riqueza del trópico húmedo como fuente de cepas nativas con potencial para ser explotadas comercialmente como controladores naturales de fitopatógenos. Estas cepas pueden ser especialmente útiles en las zonas tropicales debido a su adaptación a las

the color of the fungal colonies grown in confrontation with some of the bacterial isolates (Fig. 5), could be probably due to fungus differential reactions before various metabolites produced by each isolate. Conversely, a possible antagonism by competition of nutrients and/or space was revealed by Ar061 and Ar059 invasive bacteria growth (Figures 5 and 6), which had been previously reported for other species (Lam *et al.*, 2009). A mutual antagonism between the fungus and the isolates was revealed in both of these cases, since the fungus also had an inhibitory effect on bacteria growth; this fact has also been previously reported (Ansari *et al.*, 2005). Although in a very limited area, it was revealed by the presence of an inhibition halo in these confrontations that there is also an antibiosis effect. It was possible, by means of a molecular analysis based on comparing gene ribosomal 16S (ARNr 16S) bacterial sequence, to reach a precise identification of the eight isolates with an antagonist potential at genus level, recognized in this study, indicating that three of them belong to the *Burkholderia* genus, (Ar009, Ar038 and Ar061) and five to the *Bacillus* genus (Ca044, Pa106, Ar042, Ar059 and Ca039). Even though the ARNr 16S gene is highly conserved, small differences along the sequence are significant from a biological point of view, and are sufficient to allow classification of organisms into specific groups based on their homology. It was revealed by the phylogenetic analysis based on the alignment among the sequences obtained, as well as from those homologous sequences obtained from known species, that the Ar061 and Ar038 isolates are bacteria located within the *Burkholderia lata* group, whereas Ar009 is more similar to *Burkholderia cepacia*. The Ar042, Ca039 and Ar059 isolates were located within the *Bacillus cereus* group (Maughan and Van der Auwera, 2011), the Ca044 isolate is similar to the *Bacillus subtilis* group, and Pa106 is associated with the *Bacillus pumilus* group. Concerning an antagonistic behavior, the *Bacillus* species referred herein have been extensively evaluated not only with regards to their capacity as antagonists to phytopathogens, but also as growth and yield promoters for plants (Besson and Michel, 1990; Sandrin *et al.*, 1990; Eshita *et al.*, 1995; Kajimura *et al.*, 1995). There are plenty of reports of *B. pumilus* and *B. cereus* species as natural inhabitants of plants rhizosphere, as well as a proven antagonism towards phytopathogenic fungi (Eshita *et al.*, 1995). The *Burkholderia cepacia* species has been reported as an endorhizosphere natural inhabitant in a wide variety of plants, and with a strong antagonistic activity (Whipps and Lynch, 1985; Ramette *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007; Vandamme *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2008). The identity at species level, based on standard microbiological tests, is currently being confirmed. The wealth of the humid tropics as a source of native strains with potential to be commercially exploited as natural controllers of plant pathogens is recognized by the *in vitro* antagonistic activity of the isolates characterized in the study hereby. These strains may be particularly useful in tropical areas, due to their adaptation to the geo-climatic conditions in this region.

Acknowledgements. The contributions made by Dr.

condiciones geoclimáticas de esta región.

Agradecimientos. Se agradece las aportaciones realizadas por el Dr. Alfredo Sánchez Villareal en la revisión de este manuscrito; al MC. Rosendo Alberto Alcaraz Moreno por su ayuda en el análisis estadístico; y al Dr. Jairo Cristobal Alejo por la donación de la cepa *C. gloeosporioides* utilizada en este trabajo a Fundación avanzada Campeche.

LITERATURA CITADA

- Ansari MA, Tirry L and Moens M. 2005. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. *BioControl* 50:465-475.
- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, van Elsas JD, van Vuurde JW and Azevedo JL. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied Environmental Microbiology* 10:4906-4914.
- Besson F and Michel G. 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. *Microbios* 25:93-99.
- Brannen PM and Kenney DS. 1997. Kodiak® A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal Indian Microbiology and Biotechnology* 3:169-171.
- Chaboud A. 1983. Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime. *Plant Soil* 73: 395-402.
- Cornelis P and Matthijs S. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* 4:787-798.
- de Boer W, Verheggen P, Gunnewiek JAK, Kowalchuk GA and van Veen JA. 2003. Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied Environmental Microbiology* 2:835-844
- de Weger LA, van Boxtel R, van der Burg B, Gruters RA, Geels FP, Schippers B and Lugtenberg B. 1986. Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *Journal of Bacteriology* 165:585-594.
- Eshita SM, Roberto NH, Beale JM, Mamiya BM and Workman RF. 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolation, structures, and antifungal activities of the congeners. *Journal of Antibiotics* 11:1240-1247.
- Fitzell RD, Peak CM and Darnell RE. 1984. A model for estimating infection levels of anthracnose disease of mango. *Annals of Applied Biology* 104: 451-458.
- Instituto Nacional de Ecología México (INECOL). 2000. Programa de manejo reserva de la biosfera de Calakmul. Mexico 273 p.
- 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 Environmental Microbiology* 10: 3121-3129.
- Juhnke ME, Mathre DE and Sands DC. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied Environmental Microbiology* 12: 2793-2799.
- Kajimura Y, Sugiyama M and Kaneda M. 1995. Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2. *Journal of Antibiotics* 10: 1095-1103.
- Ingham CJ and Ben Jacob E. 2008. Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiology* 8:36
- Lam K, Thu K, Tsang M, Moore M and Gries M. 2009. Bacteria on housefly eggs, *Musca domestica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. *Naturwissenschaften* 96: 1127-1132
- Lynch JM. 1991. Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. Pp. 1-10. In: J.M. Lynch (ed.). *The Rhizosphere*. John Wiley & Sons. New York.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ and Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 2:795-799.
- Maughan H and Van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11: 789-797
- Mendes R, Pizzirani KAA, Araujo WL and Raaijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied Environmental Microbiology* 22:7259-7267.
- Nelson S. 2008. Mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Plant Disease* 48:1-9.
- Opelt K and Berg G. 2004. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea coast. *Applied Environmental Microbiology* 11:6569-6579.
- Ploetz R. 1999. Anthracnose: The most important disease in much of the mango-producing world. In: PLP News, The Newsletter of the Plant Pathology Department, The University of Florida, Gainesville 3:1-2.
- Prapagdee B, Kuekulyong C and Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Science* 5:330-337.
- Ramette A, LiPuma JJ and Tiedje JM. 2005. Species

- abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. *Applied Environmental Microbiology* 3:1193-1201.
- Ramos SRU, Gutiérrez SJG, Rodríguez GR, Salcedo MSM, Hernández LCE, Luna OHA, Jiménez BJB, Fraire VS, Almeyda LIH. 2010. Antagonismo de dos Ascomycetos contra *Phytophthora capsici* Leonian, causante de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 75-86.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sandrin C, Peypoux F and Michel G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 4:370-375.
- Senesi S, Celandroni F, Salvetti S, Beecher DJ, Wong ACL, and Ghelardi E. 2008. Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology* 148: 1785–1794.
- Tequida MM, Cortez RM, Rosas-Burgos EC, López SS y Corrales MC. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 84-88.
- Vandamme P, Opelt K, Knöchel N, Berg C, Schönmann S, De Brandt E, Eberl L, Falsen E and Berg G. 2007. *Burkholderia bryophila* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2228–2235.
- Whipps JM and Lynch JM. 1985. Effect of insertion site and metabolic load on the environmental fitness of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Applied Environmental Microbiology* 7:2634-8.

DetECCIÓN DEL VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS MEDIANTE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE p25 DE LA CÁPSIDE BAJO UN SISTEMA DE INMUNOIMPRESIÓN

Detection of *Citrus tristeza virus* with Antibodies Developed to the Recombinant p25 Capsid Protein by Direct Tissue Blot Immunoassay

María Magdalena Iracheta Cárdenas, Lourdes del Carmen Arrieta García, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Ave. Universidad s/n. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, NL, CP 66450, México; Mario A. Rocha Peña, UANL/FCB, Laboratorio de Virología Vegetal. Apdo. Postal 128 F. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, N.L., CP 66450, México. Correspondencia: mario.rochape@uanl.edu.mx

(Recibido: Marzo 26, 2012 Aceptado: Abril 24, 2012)

Iracheta CMM, Arrieta GLC y Rocha PMA. 2012. Detección del virus tristeza de los cítricos mediante anticuerpos contra la proteína recombinante p25 de la cápside bajo un sistema de inmunopresión. Revista Mexicana de Fitopatología 30:31-42.

Resumen. El virus tristeza de los cítricos *Citrus tristeza virus* (CTV) es de distribución mundial y ocasiona una de las enfermedades de mayor importancia económica en el cultivo de los cítricos. El análisis masivo de muestras de cítricos para la detección del CTV se lleva a cabo en forma rutinaria mediante la técnica serológica ELISA, o a través de su variante de inmunopresión directa en membranas de nitrocelulosa. En el presente trabajo se evaluó el empleo de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante p25 del CTV para la detección del virus bajo un sistema inmunopresión en membranas de nitrocelulosa, empleando plantas de cítricos sanas y plantas con infección natural en el campo. Con la combinación de anticuerpos desarrollados en cabra (CB) anti-CTV y de conjugado comercial anti-IgG de cabra acoplada a fosfatasa alcalina, se obtuvo una reacción positiva con plantas infectadas por el CTV y negativa con plantas sanas. Asimismo, la combinación de anticuerpos CB anti-CTV conjugados con biotina y empleando avidina-AP como conjugado comercial, fue igualmente efectiva para discriminar plantas sanas e infectadas por el CTV. Adicionalmente, los anticuerpos CB anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV mostraron resultados comparables con los kits comerciales de inmunopresión de Plant Print y Agdia para la detección del CTV.

Palabras clave adicionales: Biotina, conjugados enzimáticos, estreptavidina.

Abstract. *Citrus tristeza virus* (CTV) is widespread and causes one of the most economical important viral diseases of citrus. The large scale analysis of citrus samples for CTV detection is conducted routinely by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or its variant named direct tissue blot immunoassay (= immunoprinting). In this study, we evaluated the use of polyclonal antibodies developed to recombinant p25 CTV coat protein for virus detection under an immunoprinting system by using healthy and field CTV infected citrus samples. The combination of goat (CB) anti-CTV/IgG anti-goat-AP conjugate provided a positive reaction with CTV infected plants, and negative with healthy citrus. In addition, the combination of goat CB anti-CTV coupled with biotin, plus avidin-AP as commercial conjugate was equally effective in discriminating CTV infected from healthy citrus. Furthermore, antibodies developed to the recombinant p25 CTV coat protein, either untagged or biotin conjugated showed comparable results with commercially available immunoprinting kits for CTV detection by Plant Print and Agdia.

Additional keywords: Biotin, enzyme conjugates, streptavidin.

Résumé. Le Citrus Tristeza Virus (CTV) est répandu dans le monde entier et provoque une maladie d'importance économique notable dans la culture des agrumes. L'analyse massive d'échantillons d'agrumes pour détecter le CTV est effectuée régulièrement par la technique sérologique ELISA, ou à travers sa variante d'immunoprinting directe en membranes de nitrocellulose. La présente étude a évalué l'utilisation d'anticorps développés contre la protéine recombinante p25 du CTV afin de détecter le virus dans un système d'immunotransfert sur des membranes de nitrocellulose, en utilisant des plants d'agrumes sains et

El virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV; familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es de distribución mundial y es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia de cultivos de cítricos. El daño más dramático se presenta en árboles de naranja, toronja y mandarina injertados en patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium*), así como en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) independiente del portainjerto utilizado o de que sean plantadas directo de semilla (Rocha *et al.*, 1995, 1998).

La detección en México del CTV es regulada a través de la Norma Oficial Mexicana No. 031 (SAGARPA, 2001) y es operada por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de cada estado citrícola. El análisis masivo de muestras de cítricos se lleva a cabo rutinariamente mediante la técnica serológica ELISA, o a través de su variante de inmunopresión directa en membranas de nitrocelulosa (DTBIA = direct tissue blot immunoassay). Desde el establecimiento de la Campaña de detección del CTV en 1995 (SAGAR, 1997) se han detectado plantas infectadas por el CTV en 20 entidades citrícolas del país (SAGARPA, 2006). No obstante la ausencia de síntomas de declinamiento en el campo, la presencia de plantas infectadas por el CTV representa una condición de peligro latente ya que la mayoría de las plantaciones con cítricos están injertadas en patrón de naranjo agrio, el cual es hipersensible a este virus. Asimismo, en la zona costera del Pacífico existen plantaciones extensivas de limón mexicano las cuales son vulnerables a infecciones por el CTV, lo cual también representa un factor de riesgo para esta agroindustria. Aunado a lo anterior la presencia en gran parte del territorio nacional del agente transmisor más eficiente del CTV, el pulgón café *Toxoptera citricida* (SAGARPA, 2006) agrava más la situación para la citricultura nacional en general con respecto a epifitias futuras por el CTV.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado anticuerpos contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV (Iracheta *et al.*, 2008); tales anticuerpos son de reacción poliespecífica contra una gama de aislamientos del CTV con propiedades biológicas diversas y de orígenes geográficos distintos; asimismo, han mostrado ser eficientes mediante la técnica ELISA en el análisis masivo de muestras a nivel de campo y comparables con kits comerciales disponibles para la detección del CTV (Iracheta *et al.*, 2009).

Partiendo que la Campaña Nacional de detección del CTV se basa en la técnica serológica ELISA en su modalidad de inmunopresión, se planteó el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos: 1) Evaluar la reactividad específica de los anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante de la cápside p25 bajo el sistema de inmunopresión para la detección del CTV, ya sea solos o conjugados con biotina y estreptavidina; y 2) demostrar la funcionalidad de los anticuerpos anti-p25 solos o marcados y compararlos contra los anticuerpos utilizados en kits comerciales de inmunopresión de Print Print de España y Agdia de Estados Unidos.

infectés naturellement sur le terrain. Grâce à la combinaison d'anticorps développés chez la chèvre (CB) anti-CTV et le conjugué commercial anti-IgG de chèvre couplé à la phosphatase alcaline, une réaction positive a été obtenue avec des plantes infectées par le CTV, et une réaction négative avec des plantes saines. Par ailleurs, la combinaison d'anticorps CB anti-CTV conjugués avec la biotine, en utilisant l'avidine-AP comme conjugué commercial, était également efficace pour discriminer les plantes saines et celles infectées par le CTV. De plus, les anticorps CB anti-CTV développés contre la protéine recombinante p25 de capsid du CTV ont montré des résultats comparables avec des kits commerciaux d'immunoprinting de Plant Print et Agdia pour détecter le CTV.

Mots clés supplémentaires: biotine, conjugués enzymatiques, streptavidine.

Citrus tristeza virus (CTV) (family *Closteroviridae* genus *Closterovirus*), is distributed worldwide, and it is the causal agent of one of the most important diseases of citrus. The most dramatic damage takes place in orange trees, grapefruit and mandarin grafted on sour orange rootstock (*Citrus aurantium*), as well as in Mexican lime trees (*Citrus aurantifolia*) regardless of the rootstock or planted directly from the seed (Rocha *et al.*, 1995, 1998).

The detection of CTV in Mexico is regulated by the Mexican Official Standard No. 031 (SAGARPA, 2001), and it is operated by the Plant Protection Board in each state where citrus is grown. The large scale analysis of citrus sampling is routinely performed either by the ELISA serological technique, or by its direct immunoprinting variant in nitrocellulose membranes (DTBIA = direct tissue blot immunoassay). Infected plants by CTV have been detected in 20 citrus states nationwide (SAGARPA, 2006) since the CTV detection campaign established in 1995 (SAGAR, 1997). Even with the absence of decline symptoms in the field, the presence of CTV infected plants represents a permanent latent risk condition, because of most the citrus plantations are grafted on sour orange rootstock, which is hypersensitive to this virus. Likewise, there are extensive plantations of Mexican lime in the Pacific coast vulnerable to CTV infection, which also represents a risk factor for such citrus commodity. Furthermore, the presence of the most efficient insect vector, the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* in much of the citrus regions nationwide (SAGARPA, 2006), adds a risk factor for the entire national citrus industry, with regards to the occurrence of future CTV epidemics.

Antibodies against the CTV capsid p25 recombinant protein have been developed in our laboratory (Iracheta *et al.*, 2008); such antibodies can react are of a polyspecific reactivity against a range of CTV isolates with different biological properties and from different geographical origins; likewise, they have shown to be efficient through the ELISA technique for large scale sample analysis under field conditions, comparable with commercially available

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos. Para los diferentes ensayos de evaluación y desarrollo de los métodos de conjugación se emplearon anticuerpos policlonales desarrollados en cabras (clave CB) contra la proteína recombinante de la cápside p25 del virus tristeza de los cítricos (Iracheta *et al.*, 2008). Los anticuerpos CB anti-CTV presentes en el antisuero original se purificaron por precipitación con sulfato de amonio y se ajustaron a una concentración de 1 mg mL^{-1} mediante espectrofotometría DO_{280} (Clark *et al.*, 1986).

Tejido de cítricos. Para esta parte del trabajo, se tuvo acceso a una huerta con antecedentes de tener árboles con infección natural por el CTV en el municipio de General Terán, Nuevo León. El acceso a esta huerta fue a través del Comité Estatal de Sanidad Vegetal, con sede en Montemorelos. Se colectaron un total de tres plantas con antecedentes previos de infección por el CTV, así como las plantas circundantes a ellas en los cuatro puntos cardinales. Las muestras consistieron en brotes recién expandidos (Figura 1A), colectados alrededor de la copa de los árboles, a una altura aproximada de 1.50 m sobre el nivel del suelo. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético y se trasladaron al laboratorio bajo refrigeración. En un segundo muestreo se realizaron las impresiones directamente en el campo (Figura 1B-C), con tres impresiones de cada árbol a manera de repeticiones de cada muestra; las membranas con las muestras impresas se conservaron en sobres de papel bajo refrigeración previo a su uso.

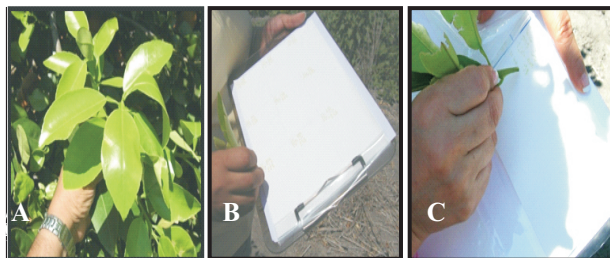


Figura 1. Toma de muestras de cítricos para la detección del virus de la tristeza mediante inmunopresión (DTBIA). **A.** Muestras de tejido primario (brote) obtenido de árboles de cítricos. **B** y **C** impresión directa sobre membranas de nitrocelulosa de muestras de tejido de árboles de cítricos.

Figure 1. Sampling for detection of citrus tristeza virus by immunoprinting (DTBIA). **A.** Primary tissue samples (shoots) obtained from citrus trees. **B** and **C** direct printing onto nitrocellulose membranes of tissue samples from citrus trees.

Las muestras se colectaron de árboles de toronja (*Citrus paradisi*), naranjo (*C. sinensis*) y naranjo agrio. Adicionalmente, se incluyeron como testigos negativos en el muestreo plantas de naranjo y los híbridos de mandarina Ortanique y Murcott, colectadas en el Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán (Cuadro 1). Asimismo, las plantas se colectaron a finales del

kits for CTV detection (Iracheta *et al.*, 2009).

Considering that the National Campaign for CTV detection, is conducted by using the ELISA serological technique in its immunoprinting mode, this study was conducted with the following objectives: 1) to evaluate the specific reactivity of the antibodies developed against the capsid p25 recombinant protein under the immunoprinting system for CTV detection, either alone or conjugated with biotin and streptavidin; and 2) to demonstrate the anti-p25 antibodies functionality either alone or marked, and to compare them against the antibodies present in the immunoprinting commercial kits from Plant Print, Spain and Agdia, USA.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Polyclonal antibodies developed in goats (CB code) against the CTV capsid p25 recombinant protein (Iracheta *et al.*, 2008) were used throughout the study in the different evaluation test and conjugation methods. The CB anti-CTV antibodies present in the original antisera were purified by ammonium sulfate precipitation and adjusted to a 1 mg mL^{-1} concentration by DO_{280} spectrophotometry (Clark *et al.*, 1986).

Citrus tissue. We have access to an citrus grove with history of having CTV naturally infected trees in the municipality of General Teran, Nuevo Leon; the access to this citrus grove was granted State Plant Protection Board located at Montemorelos. A total of three plants with a previous history of CTV infection were collected, as well as the plants surrounding them in the four cardinal points. The samples consisted of newly expanded shoots (Figure 1A) collected around the canopy at a 1.50 m height above ground level, approximately. The samples were placed in sealed polyethylene bags and taken to the laboratory under refrigeration. Prints were made in a second sampling directly in the field (Figure 1B-C), with three printings from each tree as replicates from each sample; the membranes with printed samples were stored in paper envelopes under refrigeration prior to be utilized.

Samples were collected from grapefruit (*Citrus paradise*), orange (*C. sinensis*) and sour orange trees. Sweet orange plants, as well as Ortanique and Murcott mandarin hybrids, included in the sampling as negative controls, were collected at the General Teran of Experimental Station Variety Block (Table 1). Likewise, the plants were collected in late February and early March in two consecutive years (2008 and 2009). All the collected samples were analyzed by the ELISA test with anti-CTV polyclonal antibodies, specific for the capsid p25 recombinant protein (Iracheta *et al.*, 2009), to verify their status with regard to CTV (Table 1).

Conjugation methods. The CB goat antibodies developed against the CTV capsid recombinant protein were coupled to biotin and streptavidin with different cross-linking agents (Table 2) following the conjugation methodologies described by Scopes (1985).

Each one of the conjugation protocols, at unless otherwise stated, was carried out with 1 mg mL^{-1} of anti-CTV CB antibodies diluted in acetate buffer, TBS, or bidistilled water if necessary, and coupled to the biotin and streptavidin

Cuadro 1. Muestras de tejido de plantas de toronja injertadas sobre naranjo agrio con antecedentes de infección por el virus de la tristeza. Huerta Los Castores, localidad "Las Anacuitas", Municipio de General Terán, Nuevo León. Febrero-marzo, 2008 y 2009.

Table 1. Tissue samples from grapefruit plants grafted on sour orange with a history of CTV infection. Los Castores grove, "Las Anacuitas" location, municipality General Teran, Nuevo Leon. February-march, 2008 and 2009.

No.	Clave	Variedad	Reacción ELISA	No.	Clave	Variedad	Reacción ELISA
1	0302 A9	Toronja	(-)	11	0115 A12	Toronja	(-)
2	0302 A10	Toronja	(+)	12	0115 A11	Toronja	(+)
3	0302 A10.1	Toronja	(-)	13	0115 A11.1	Toronja	(-)
4	0302 A11	Toronja	(-)	14	0115 A11.2	Toronja	(-)
5	0301 A10.2	Toronja	(-)	15	0115 A10	Toronja	(-)
6	0202 A27.1	Toronja	(-)	16	5337 A17	Naranja agrio	(+)
7	0202 A27	Toronja	(+)	17	5337 A1	Naranja*	(-)
8	0202 A28	Toronja	(-)	18	5337 A2	Naranja	(+)
9	0203 A4	Toronja	(-)	19	Sin Clave	Ortanique*	(-)
10	0203 A521	Toronja	(-)	20	Sin Clave	Murcott*	(-)

*Plantas colectadas en el Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán como testigos sanos.

mes de febrero y principios de marzo en dos años consecutivos (2008 y 2009). Todas las muestras colectadas se sometieron a la prueba de ELISA con anticuerpos policlonales anti-CTV específicos para la proteína recombinante p25 de la cápside (Iracheta *et al.*, 2009) para verificar su condición con respecto al CTV (Cuadro 1).

Métodos de conjugación. Los anticuerpos desarrollados en cabra CB contra la proteína recombinante de la cápside del CTV se acoplaron a biotina y estreptavidina con diferentes agentes entre-cruzantes (Cuadro 2) siguiendo las metodologías de conjugación descritas por Scopes (1985).

En términos generales, cada uno de los protocolos de conjugación se llevaron a cabo con 1 mg mL⁻¹ de anticuerpos CB anti-CTV diluidos en solución amortiguadora de acetatos, TBS, o agua bidestilada, según fuera el caso y se acoplaron a las moléculas de biotina o estreptavidina en concentraciones de 1-5 mg (Scopes, 1985). Al final de cada protocolo, los conjugados preparados se sometieron en forma individual a diálisis en 4 L de solución amortiguadora de TBS 1% como sigue: un paso de diálisis durante 3 h a temperatura ambiente y uno más con solución nueva de TBS durante 18 h a 5°C.

Protocolo de inmunopresión (DTBIA) (Garnsey *et al.*, 1993). El protocolo de inmunopresión fue como sigue: 1.- Impresión del tejido (peciolos y/o tallos) de cítricos en membranas de nitrocelulosa; 2.- Incubación de las membranas en solución de saturación (BSA 0.2%, Tween 20, 0.2% y Triton 100, 0.2%, en Tris salino pH 10), durante 10 min; 3.- Incubar las membranas con el anticuerpo anti-CTV (cabra CB, 1 µg mL⁻¹) diluido en solución de saturación e incubar a temperatura ambiente durante 2 h; 4.- Lavado de las membranas con Tris salino/Tween 20 al 0.2% con tres cambios durante 30 min; 5.- Incubar las membranas con el

molecules in 1-5 mg concentrations (Scopes, 1985). The prepared conjugates were subjected to dialysis at the end of each protocol in 4 L of TBS 1% buffer solution, as follows: one 3 h dialysis step at room temperature and one more with a new TBS solution for 18 h at 5°C.

Immunoprinting protocol (DTBIA) (Garnsey *et al.*, 1993). The immunoprinting protocol was performed as follows: 1.- Citric tissue printing (petioles and / or stems) onto nitrocellulose membranes; 2.- membranes incubation in blocking solution (BSA 0.2%, Tween 20, 0.2% and Triton 100, 0.2%, in Tris saline pH 10), for 10 min; 3.- The membranes were incubated with anti-CTV (goat CB, 1 µg mL⁻¹) diluted in a blocking solution at room temperature for 2 h; 4.- The membranes were washed with Tris saline/Tween 20 at 0.2% with three changes for 30 min; 5.- The membranes were incubated with commercial goat anti-IgG coupled to alkaline phosphatase (Sigma A4187) diluted 1:30,000 in blocking solution for 2 h; 6.-The washing process previously outlined was repeated; 7.- The BCIP/NBT substrate solution (Sigma B3804) was applied. Regarding the anti-CTV goat antibodies coupled to either biotin or streptavidin, along with their corresponding enzymatic conjugates, they substituted the goat anti-CTV CB and their corresponding anti-goat IgG in the immunoprinting tests. Once the immunoprinting trials optimal conditions had been established, they were carried out simultaneously with the immunoprinting kits from the companies Plant Print (Valencia, Spain) and Agdia (Elkhart, Indiana, USA).

Each commercial kit was used as recommended by their manufacturers with their antibodies and buffers; the only difference was that the Schleicher & Shuell BA-S 85 membranes were used. The results were evaluated visually and at 20X magnifying lens.

Cuadro 2. Sistemas de conjugación de biotina y estreptavidina, con anticuerpos contra la proteína recombinante p25 del virus de la tristeza (CTV).

Table 2. Biotin and streptavidin conjugation systems with antibodies against CTV p25 recombinant protein.

Anticuerpos	Ligando	Agente entre-cruzante*	Calve	Conjugado comercial*
Cabra CB anti-CTV	Biotina	- NHS Maleimida Hidrazida	CB CB-BN CB-BM CB-BH	IgG anti-IgG de cabra-AP Estreptavidina-AP, o
	Estreptavidina	Maleimida Glutaraldehido Peryodato	CB-EM CB-EG CB-EP	IgG anti-biotina-AP Biotina-AP

*Todos los agentes entre-cruzantes y conjugados comerciales fueron adquiridos de Sigma.

conjugado comercial anti-IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma A4187) diluido 1:30,000 en solución de saturación durante 2 h; 6.- Repetir el proceso de lavado señalado en el punto anterior; 7.- Aplicación de solución de revelado BCIP/NBT (Sigma B3804). Para el caso de anticuerpos de cabra anti-CTV acoplados ya sea a biotina o estreptavidina, junto con sus respectivos conjugados enzimáticos, éstos sustituyeron a los anticuerpos anti-CTV de cabra CB y su respectivo conjugado IgG anti-cabra, en las pruebas de inmunopresión. Una vez establecidas las condiciones óptimas de los ensayos de inmunopresión, éstos se llevaron a cabo en forma simultánea con los kits de inmunopresión de las compañías Plant Print (Valencia, España) y Agdia (Elkhart, Indiana, USA). Cada estuche comercial se empleó según las recomendaciones de sus fabricantes, con sus anticuerpos y soluciones amortiguadoras; la única variante fue que se emplearon membranas Schleicher & Shuell BA-S 85. Los resultados se evaluaron en forma visual y con acercamiento mediante lentes con un aumento de 20X.

RESULTADOS

Implementación del sistema de inmunopresión con anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante del CTV. La efectividad de los anticuerpos de cabra CB anti-CTV se evaluó en un sistema de inmunopresión para la detección del CTV en muestras infectadas en forma natural en el campo.

En un primer ensayo, el tejido de las plantas colectadas en febrero del 2008 no tenía tejido lo suficiente tierno para efectuar las inmunopresiones sobre las membranas de nitrocelulosa, por lo que se tomó la determinación de someterlo a un proceso de congelación/descongelación previo a la impresión sobre las membranas (Figura 2A). Bajo este sistema, las muestras con antecedentes de ser positivas al CTV mostraron una reacción positiva al CTV mediante el empleo del anticuerpo CB de cabra sin marca (Figura 2B). Asimismo, muestras de tejido de plantas vecinas a las CTV positivas, así como el

RESULTS

Immunoprinting system implementation with antibodies developed against CTV recombinant protein.

The goat anti-CTV CB antibodies effectiveness was evaluated in a CTV detection immunoprinting in naturally infected plants in the field.

The plant tissue collected in February 2008 did not have enough soft tissue, in order to carry out the immunoprinting on nitrocellulose membranes in the first test; consequently, it was subjected to a freezing / thawing process prior to membranes printing (Figure 2A). Under such system, samples with a history of being CTV positive revealed a positive reaction to CTV through the use of untagged goat CB antibody (Figure 2B).

Moreover, plant tissue samples adjacent to the positive CTV, as well as the mandarin hybrid tissue collected from the General Teran Experimental Station Variety Block had a negative reaction to CTV (Figure 2B). Three blocking solutions were evaluated in this same assay in order to determine the best anti-CTV reaction and color resolution on nitrocellulose membranes. The positive and negative CTV samples discrimination reaction was obtained in a consistent manner with a solution composed by Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2 % diluted in Tris saline (Figure 1B). Inconsistent detection results were revealed by the saturated solutions composed of Tween 20 0.3% + BSA 0.2 % (Figure 2C) and Tween 1 % (Figure 2D).

A positive reaction is shown in Figure 3, on the 1, 5 and 10 samples in the three membranes at different anti-CTV CB antibodies concentrations; 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 (Figure 3B-D) and IgG anti-goat-AP at a 1:30,000 dilution as a secondary antibody. After having these incubated according to protocol, it was possible to observe that an efficient discrimination of both healthy and CTV infected plants had been achieved by the three different dilutions; nonetheless, the most consistent results were accomplished with the 1:1000 dilution, in terms of blue-purple intensity, selecting this dilution for subsequent tests.

Titer determination of anti-CTV CB antibodies

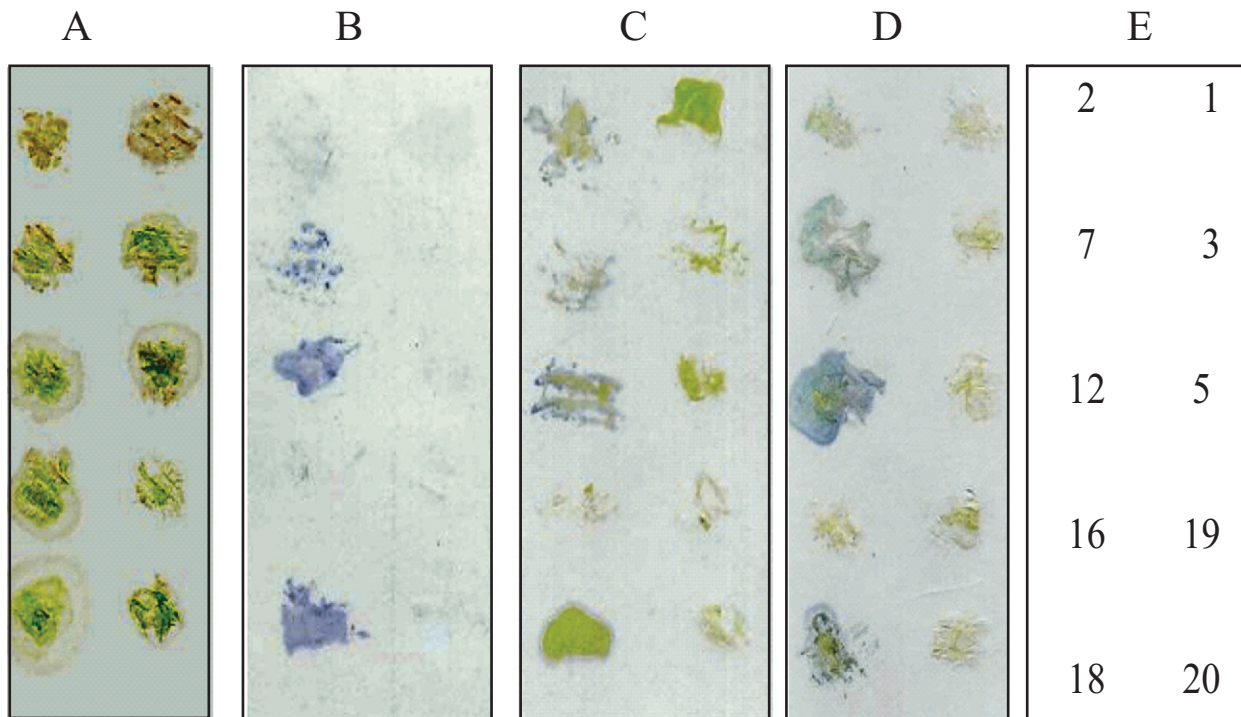


Figura 2. Detección del virus de la tristeza (CTV) en muestras de cítricos mediante ensayos de inmunopresión: Ensayo de diferentes soluciones de saturación (bloqueo). **A.** Membrana con muestras de cítricos a evaluar. **B.** Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2%; **C.** Tween 20 0.3% + BSA 0.2 %; **D.** Tween 1%. **E.** Distribución en las membranas de las muestras de cítricos sanas e infectadas por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18).

Figure 2. Detection of citrus tristeza virus (CTV) in citrus samples by immunoprinting test: Assay of different blocking solutions. **A.** Citrus samples onto membrane prior to be evaluated. **B.** Tween 20 + 0.2% Triton X-100, 0.2% BSA + 0.2%; **C.** Tween 20 0.3% + 0.2% BSA ; **D.** 1% Tween. **E.** Distribution of healthy and CTV infected samples in the membranes. The numbers indicate the samples listed in Table 1 (samples infected with CTV = 7, 12 and 18).

tejido de hidratos de mandarinas colectados del Banco de Variedades del Campo Experimental General Terán mostraron una reacción negativa al CTV (Figura 2B). En este mismo ensayo se evaluaron tres soluciones de saturación para determinar la mejor reacción al anticuerpo anti-CTV y resolución de color en las membranas de nitrocelulosa. La reacción de discriminación de muestras CTV positivas y negativas se obtuvo en forma consistente con la solución compuesta por Tween 20, 0.2% + Triton X-100, 0.2% + BSA 0.2 % diluidos en Tris salino (Figura 2B). Las soluciones de saturación compuestas por Tween 20 0.3% + BSA 0.2 % (Figura 2C) y Tween 1 % (Figura 2D), mostraron resultados inconsistentes de detección.

En la Figura 3 se muestra la reacción positiva en las muestras 1, 5 y 10 en las tres membranas a diferentes concentraciones de anticuerpo CB anti-CTV; 1:300, 1:1,000 y 1:3,000 (Figura 3B-D) y anti-IgG de cabra-AP a una dilución de 1:30,000 como anticuerpo secundario. Se incubaron siguiendo el protocolo establecido, se pudo observar que a las tres diferentes diluciones se logró una discriminación eficiente de plantas sanas e infectadas por el CTV; sin embargo, con la dilución 1:1000 se obtuvieron los resultados más consistentes en cuanto a la intensidad de la coloración azul-morada, seleccionando esta dilución para

conjugated with biotin and streptavidin. Anti-CTV antibodies titration, biotin and streptavidin conjugated with each one of the cross-linkin agents (Table 2), was performed at 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 dilutions each, and evaluated by immunoprinting testing with healthy in CTV infected tissue (Table 1). Also, the different corresponding commercial enzyme conjugates for each one of them (Table 2) were used under the manufacturers recommended dilutions.

Different results were obtained for according to degrees of consistency and intensity in the detection signal for CTV infected samples, which differed from faint or none to distinct intensive signal for CTV infected plants, as compared to healthy samples (data not shown). For all the prepared conjugates with the different cross-linking agents, the combination of anti-CTV CB antibodies biotin via hydrazide (1:3,000) + avidin-AP (1:1,000) labeled revealed 100% discrimination similar results from both positive and negative samples (Figure 4). The rest of the biotin and streptavidin prepared conjugates showed inconsistent detection result (data not shown).

Evaluation of conjugated in immunoprinting tests. Once the optimal test dilutions were as determined in terms of blocking solution and dilution for each one of the

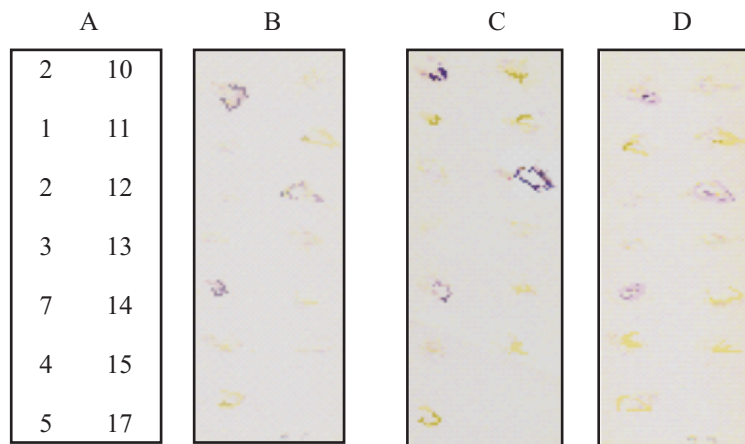


Figura 3. Evaluación de los anticuerpos de cabra CB específicos para el virus de la tristeza (CTV) (anti-CTV) para la detección del CTV en ensayos de inmunopresión. **A.** Localización de las muestras sobre las membranas (Tabla 1, muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18). **B, C y D,** membranas incubadas con una solución de anti-CTV (CB), a diluciones de 1:300, 1:1,000 y dilución 1:3,000, respectivamente y conjugado comercial IgG anti-cabra 1:30,000.

Figure 3. Evaluation of CB goat antibodies for CTV (anti-CTV) detection in immunoprinting tests. **A.** sample location on the membranes (Table 1, CTV infected samples = 7, 12, and 18). **B, C and D.** Incubated membranes with anti-CTV CB solution at 1:300, 1:1,000 and 1:3,000 dilutions, respectively, and IgG anti-goat 1:30,000 commercial conjugate.

los ensayos posteriores.

Determinación del título de los anticuerpos CB anti-CTV conjugados con biotina y estreptavidina. La titulación de los anticuerpos anti-CTV, conjugados con biotina y estreptavidina, con cada uno de los agentes entrecruzantes (Cuadro 2), se efectuó en diluciones de 1:300, 1:1,000 y 1:3,000 para cada uno de ellos y se evaluaron mediante ensayos de inmunopresión con tejido sano e infectado por el CTV (Cuadro 1). Asimismo, los diferentes conjugados enzimáticos comerciales respectivos para cada uno de ellos (Cuadro 2) se emplearon a las diluciones recomendadas por los fabricantes.

Se obtuvieron resultados diversos en cuanto a consistencia y grados de intensidad en la señal de detección para muestras infectadas por el CTV, los cuales variaron desde escasa o nula señal, hasta señal intensiva distintiva de plantas infectadas por el CTV con respecto a las plantas sanas (datos no mostrados). De todos los conjugados preparados con los anticuerpos CB anti-CTV, la combinación de anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) + avidina-AP (1:1,000), mostró resultados similares de 100% de discriminación de muestras positivas y negativas (Figura 4). El resto de los conjugados preparados a base de biotina y estreptavidina (Cuadro 2) mostraron resultados inconsistentes de detección (datos no mostrados).

Evaluación de conjugados en ensayos de inmunopresión. Una vez determinada las diluciones óptimas del ensayo en cuanto a solución de saturación y dilución de cada uno de los anticuerpos anti-CTV sin marca y conjugados, se procedió a evaluar cada uno de ellos en ensayos de inmunopresión con las mismas muestras de cítricos con infección positiva al CTV enlistadas en el Cuadro 1 (Figura 1B-C), con tres impresiones de cada árbol a manera de repeticiones de cada muestra y su comparación

untagged and conjugated anti-CTV antibodies, an evaluation of each immunoprinting tests was carried out with the same citrus CTV positive infected samples listed on Table 1 (Figure 1B-C), with three printings of each tree as replicates of each sample and simultaneously compared

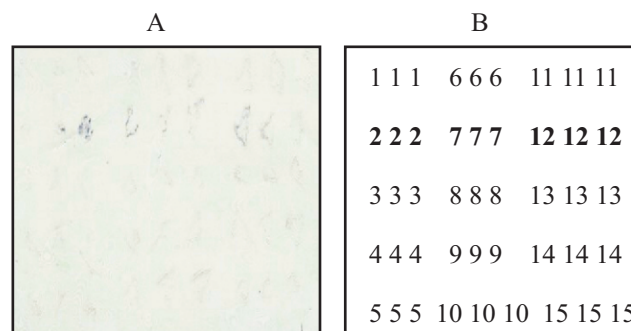


Figura 4. Ensayo de inmunopresión con anticuerpos CB específicos para el virus de la tristeza (CTV) marcados con biotina y muestras de plantas de cítricos sanas e infectadas por el CTV. **A.** Combinación de anticuerpos anti-CTV CB-B marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) y avidina-AP (1:1,000). **B.** Disposición de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18).

Figure 4. Immunoprinting tests with antibodies specific for CTV CB virus and biotin marked citrus plant samples both healthy and CTV infected. **A.** Combination of anti-CTV CB-B antibodies biotinylated via hydrazide (1:3,000) and avidin-AP (1:1,000). **B.** Healthy and CTV infected sample distribution provision. The listed sample distribution is indicated by the numbers in Table 1 (CTV infected samples = 7, 12, and 18).

en forma simultánea con los kits de inmunoimpresión de las compañías Plant Print y Agdia.

Con la combinación de anticuerpos CB anti-CTV + anti-IgG de cabra-AP empleando la solución de saturación compuesta por Tween 20, 0.2% + Triton X-100 0.2% + BSA 0.2 % diluidos en Tris salino, se obtuvo un 100% de discriminación de muestras CTV positivas de las plantas sanas (Figura 5C). Asimismo, con la combinación de anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) + avidina-AP 1:1,000, se obtuvieron resultados similares de 100% de discriminación de muestras positivas y negativas al CTV (Figura 5D). Con los kits de inmunoimpresión de Plant Print (Figura 5E) y de Agdia (Figura 5F) se obtuvieron resultados similares de discriminación de muestras CTV positivas y negativas,

with the immunoprinting kits from the companies Plant Print and Agdia.

With the combination of antibodies anti-CTV CB + anti-goat IgG-AP using the blocking solution consisting of Tween 20, 0.2% Triton X-100 + 0.2% + 0.2% BSA diluted in Tris saline, yielded a 100% CTV discrimination of positive samples of healthy plants (Figure 5C). Also, with the combination of antibodies anti-CTV CB biotinylated via hydrazide (1:3,000) + avidin-AP 1:1,000, similar results were obtained 100% discrimination of positive and negative samples CTV (Figure 5D). With kits immunoprinting kits from Print Plant (Figure 5E) and Agdia (Figure 5F) similar results of discrimination between CTV positive and negative were obtained, respectively. This results revealed a 100% likelihood in the reaction obtained with CB antibody

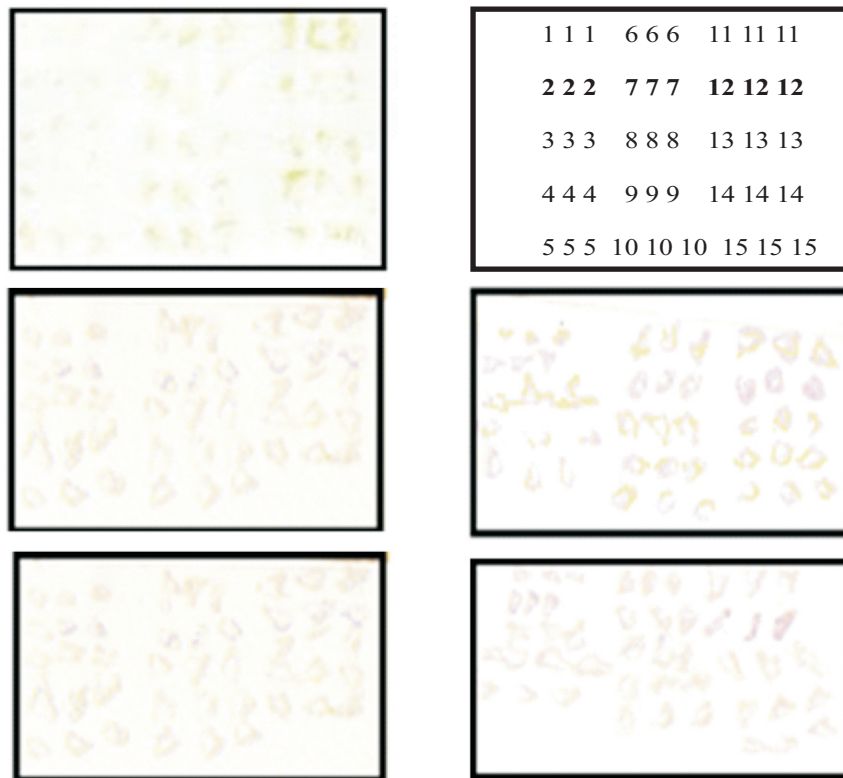


Figura 5. Evaluación comparativa entre los anticuerpos anti-CTV solos y marcados con biotina y dos kits comerciales. **A.** Vista de una membrana impresa en campo previo a su análisis mediante inmunoimpresión. **B.** Disposición de muestras de cítricos sanos e infectados por el CTV. Los números indican las muestras enlistadas en el Cuadro 1 (muestras infectadas por el CTV = 7, 12 y 18). **C.** Combinación de anticuerpos de cabra CB anti-CTV (1:1,000) y conjugado enzimático comercial anti-IgG de cabra acoplado a fosfatasa alcalina (1:30,000). **D.** Combinación anticuerpos CB anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida (1:3,000) y avidina-AP (1:1,000). **E.** Estuche comercial de inmunoimpresión de Plant Print (cortesía del Dr. Mariano Cambra, IVIA España). **F.** Estuche comercial de inmunoimpresión de Agdia IPK 78901/0010 (cortesía del Ing. César García, Fumaplant, México).

Figure 5. Comparative evaluation of anti-CTV antibodies alone and biotin conjugates with two commercial immunoprinting kits. **A.** View of a membrane printed in the field prior to immunoprinting analysis. **B.** healthy and CTV infected citrus samples provision. The listed sample distribution is indicated by the numbers in Table 1 (CTV infected samples = 7, 12, and 18). **C.** Goat CB anti-CTV antibodies combination (1:1,000) and goat anti-IgG commercial enzyme conjugate coupled to alkaline phosphatase (1:30,000). **D.** Combination of anti-CTV CB antibodies couplet with biotin via hydrazide (1:3,000) and avidin-AP (1:1,000). **E.** Plant Print immunoprinting commercial kit (courtesy of Dr. Mariano Cambra, IVIA Spain). **F.** Agdia IPK 78901/0010 immunoprinting commercial kit (courtesy of Engineer Cesar García, Fumaplant, Mexico).

respectivamente. Lo anterior, puso en evidencia el 100% de similitud en la reacción obtenida con los anticuerpos CB anti-CTV solos o acoplados a biotina, con respecto a los kits comerciales de inmunopresión de Plant Print y Agdia, respectivamente.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio para la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV (Iracheta *et al.*, 2008) para la detección del virus en plantas de cítricos. El estudio consistió en evaluar los anticuerpos anti-CTV solos o marcados con biotina o estreptavidina en ensayos de inmunopresión en membranas de nitrocelulosa, teniendo como referencia muestras de plantas de cítricos sanas y con infección natural en el campo por el CTV.

Se determinó que los anticuerpos anti-CTV sin marca en dilución 1:1,000 y 1:3,000 fueron eficientes para discriminar en un 100% plantas infectadas por el CTV de plantas sanas (Figura 3C-D). Lo anterior empleando anti-IgG de cabra acoplada fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario en dilución 1:30,000. Asimismo, se encontró una eficiencia del 100% en la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV fue el conjugado con biotina empleando hidrazida como vehículo de conjugación en dilución 1:3,000, en combinación con el conjugado comercial a base de avidina-AP en dilución 1:1,000 (Figura 4). Asimismo, estos resultados fueron consistentes y comparables con los obtenidos con los kits comerciales disponibles de inmunopresión para el CTV de las compañías Plant Print (Figura 5E) de España y Agdia (Figura 5F) de los Estados Unidos.

La técnica de inmunopresión desde su implementación (Garnsery *et al.*, 1993), ha sido sujeta a ensayos subsiguientes para incrementar su simpleza y su eficiencia en la detección del CTV. Lo anterior ha incluido el desarrollo de anticuerpos anti-CTV fusionados con la enzima fosfatasa alcalina mediante el sistema de expresión en *Escherichia coli* (Terrada *et al.*, 2000), así como la pre-incubación de anticuerpos anti-CTV y anticuerpos secundarios conjugados antes de su aplicación a las membranas (Agdia, 2008; Lin *et al.*, 2006). En el presente trabajo se intentó utilizar el sistema de amplificación biotina/estreptavidina para potenciar la efectividad de los anticuerpos y así incrementar la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, la conjugación de los anticuerpos anti-CTV con estreptavidina no arrojó los resultados de reacción ni amplificación esperados.

Una posible explicación de la falla de reactividad y/o amplificación en los conjugados a base de estreptavidina pudo haberse debido a la naturaleza propia de los reactivos entre-cruzantes empleados y/o el acoplamiento de éstos a los aminoácidos presentes en las regiones Fab de las inmunoglobulinas, limitando así la unión antígeno/anticuerpo respectiva y por consecuencia disminuyendo la capacidad de detección. Por otra parte, a diferencia de la biotina que posee un peso de 224.31 daltons, la estreptavidina tiene un peso aproximado de 67,000 daltons, lo cual puede también reducir de manera

alone or anti-CTV coupled to biotin, with respect to commercial immunoprinting kits from Print Plant and Agdia, respectively.

DISCUSSION

The current work was conducted to evaluate antibodies to the recombinant CTV capsid p25 protein developed in our laboratory (Iracheta *et al.*, 2008) for detection of CTV in citrus plants virus were evaluated in the study hereby. The study consisted in having the anti-CTV antibodies evaluated, either alone or labeled with biotin or streptavidin in immunoprinting tests on nitrocellulose membranes, with healthy citrus plants reference samples and naturally infected by CTV.

It was determined that the unlabeled anti-CTV antibodies at 1:1,000 and 1:3,000 dilution were 100% efficient to discriminate CTV infected plants from healthy citrus (Figure 3C-D). This was obtained reached by using goat anti-IgG coupled to alkaline phosphatase as the secondary antibody in the 1:30,000 dilution. Furthermore, 100% efficiency in discrimination of healthy from CTV infected samples was obtained reached with the anti-CTV antibodies conjugated with biotin at 1:3,000 using hydrazide as a cross-linking agent in combination with the avidin-AP commercial conjugate at 1:1,000 dilution. Likewise, these results were consistent and comparable with those obtained with the commercial immunoprinting kits for CTV detection available from Plant Print (Figure 5E), Spain, and Agdia (Figure 5F), USA.

The immunoprinting technique, since its implementation (Garnsery *et al.*, 1993), has been subjected to subsequent assays to enhance its simplicity and efficiency for CTV detection. Such fact has included the anti-CTV antibodies fused with the alkaline phosphatase enzyme, using the expression system in *Escherichia coli* (Terrada *et al.*, 2000), as well as the anti-CTV antibodies pre-incubation and secondary antibodies conjugated prior membranes their use (Agdia, 2008; Lin *et al.*, 2006). In our study, we attempted to utilize the biotin/streptavidin amplification system in order to enhance the antibodies effectiveness and thus increase the technique sensitivity. However, the conjugation of anti-CTV antibodies with streptavidin did not yield the reaction nor the amplification expected. A possible explanation for the failure on reactivity and / or amplification in the streptavidin based conjugates may have been due to the nature of the reactive cross-linking agents, and/or to the their coupling to the aminoacids present in the immunoglobulin Fab regions, thereby limiting the corresponding antigen/antibody reaction, and consequently accordingly limiting its detection capability. Additionally, unlike biotin, which has a weight of 224.31 Daltons, streptavidin has an approximate weight of 67,000 Daltons, which can also significantly reduce the immunoglobulins biological activity as they couple to streptavidin (Scopes, 1985).

The advantage provided by the immunoprinting technique for CTV detection relies particularly in its simplicity and relatively short period of time for the implementation, since it does not require neither preparation

significativa la actividad biológica de las inmunoglobulinas cuando están acopladas a estreptavidina (Scopes, 1985).

La ventaja que ofrece la técnica de inmunopresión para la detección del CTV, radica particularmente en su simpleza y tiempo relativamente corto para su ejecución, por no requerir el proceso de preparación o extracción de la muestra (Garnsey *et al.*, 1993). En términos generales, una vez que las muestras han sido impresas en las membranas de nitrocelulosa, la prueba completa puede ser terminada en un par de horas (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b). La técnica de inmunopresión ha llegado a ser una herramienta indispensable para el análisis masivo de muestras de cítricos en la detección del CTV en plantaciones comerciales, así como en viveros en apoyo a los programas de saneamiento y certificación de diversos países, como Argentina (Stein *et al.*, 2009), Chile (Besoain *et al.*, 2003), Colombia (Caicedo y Muñoz, 2006), Cuba (Batista *et al.*, 2005) y España (Cambra, *et al.*, 2000a, 2000b), entre otros (Anfoka *et al.*, 2005; Djelouah y D'Onghia, 2009; Korkmaz, 2002). En la República Mexicana se ha utilizado para la detección del CTV a nivel nacional en todos los estados citrícolas del país (SAGARPA, 2006). Asimismo, se ha empleado en diversos estudios de distribución y epifitología del CTV a nivel de huertas comerciales en varios estados de la República, particularmente en Puebla, Veracruz (Loredo y Peña del Río, 2002), Tamaulipas y Yucatán (Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009).

No obstante la versatilidad de la técnica de inmunopresión para la detección del CTV y su uso generalizado en México (Loredo y Peña del Río, 2002; Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009; SAGARPA, 2006), para su aplicación se requiere de la adquisición de los kits comerciales, ya sea de España (Plant Print) o Estados Unidos (Agdia), lo cual implica los altos costos inherentes de importación, así como la dependencia de la campaña del CTV a nivel nacional de kits procedentes del extranjero. En adición a lo anterior, la disponibilidad de los kits comerciales para la detección del CTV en México no siempre es inmediata (Iracheta *et al.*, 2005).

La aportación del presente trabajo radica primordialmente en demostrar que los anticuerpos anti-CTV desarrollados en nuestro laboratorio a través del sistema de proteína recombinante (Iracheta *et al.*, 2008), ofrecen una opción viable de inmunopresión para la discriminación de plantas sanas e infectadas por el CTV y con resultados comparables con los obtenidos con los kits comerciales de inmunopresión disponibles en México. No obstante el número reducido de muestras a que se tuvo acceso con infección natural al CTV en el campo, los anticuerpos anti-CTV ya sea sin marca o conjugado con biotina vía hidrazida, mostraron en forma consistente una eficiencia del 100% en la discriminación entre plantas sanas y plantas infectadas por el CTV, mostrando así niveles de sensibilidad y especificidad del 100%, respectivamente. La efectividad de los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 para el análisis masivo de muestras de cítricos ya ha sido documentada con anterioridad empleando la técnica DASI-ELISA (Iracheta *et al.*, 2009).

nor extraction of the sample (Garnsey *et al.*, 1993) Overall, once the samples have been printed on the nitrocellulose membranes, the entire test can be brought to an end in just a couple of hours (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b). The immunoprinting technique has become an indispensable tool for large scale citrus sample analysis of CTV detection in commercial groves and nurseries in support of clean stock and certification programs in several countries, such as Argentina (Stein *et al.*, 2009), Chile (Besoain *et al.*, 2003), Colombia (Caicedo and Muñoz, 2006), Cuba (Batista *et al.*, 2005) and Spain (Cambra, *et al.*, 2000a, 2000b), among others (Anfoka *et al.*, 2005; Djelouah and D'Onghia, 2009; Korkmaz, 2002). It has been used nationwide for CTV detection in the Mexican Republic in every single citrus state of the country (SAGARPA, 2006). Moreover, it has been used in several studies on CTV distribution and epifitology in commercial groves in several states nationwide, particularly in Puebla, Veracruz (Loredo and Peña del Río, 2002), Tamaulipas and Yucatan (Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009).

Despite the versatility of the immunoprinting technique CTV detection and its extensive use in Mexico (Loredo and Peña del Río, 2002; Rivas *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2005, 2009; SAGARPA, 2006), its use requires the obligated purchase of the immunoprinting kits, either from Spain (Plant Print) or US (Agdia), which implies high inherent costs of commercial kits from abroad. Furthermore, the commercial kit availability for CTV detection in Mexico is not always immediate (Iracheta *et al.*, 2005).

The contribution of this work relies mostly in showing that anti-CTV antibodies developed in our laboratory by recombinant protein system (Iracheta *et al.*, 2008), offers a viable option of immunoprinting for discrimination of healthy and CTV infected plants, and comparable results with those obtained with immunoprinting commercial kits available in Mexico. Despite the small number of CTV infected plant samples availability, a consistent 100% efficiency in discriminating between healthy and CTV infected plants was obtained; the anti-CTV antibodies, either unmarked or conjugated via biotin-hydrazide, showed sensitivity and specificity levels of 100%, respectively. The efficiency of the anti-CTV antibodies developed against p25 recombinant protein for the large scale analysis of citrus samples has already been previously documented using the DASI-ELISA technique (Iracheta *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the study hereby, the following conclusions were reached:

The anti-CTV antibodies developed against capsid p25 recombinant protein were efficient for discrimination of healthy samples from CTV infected samples using immunoprinting tests.

The anti-CTV antibodies labeled with biotin via hydrazide were efficient for discrimination of healthy samples from CTV infected, and it was comparable to the unlabeled anti-CTV antibodies in immunoprinting tests.

The CTV antibodies developed against capsid p25

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se llegó a las siguientes conclusiones:

Los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV fueron eficientes para la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV en ensayos de inmunopresión.

Los anticuerpos anti-CTV marcados con biotina vía hidrazida fueron eficientes para la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV, comparables con los anticuerpos anti-CTV sin marcar en ensayos de inmunopresión.

Los anticuerpos anti-CTV desarrollados contra la proteína recombinante p25 de la cápside del CTV sin marcar y marcados con biotina vía hidrazida fueron igualmente eficientes en la discriminación de muestras sanas de infectadas por el CTV en ensayos de inmunopresión y comparables con los kits comerciales de Agdia y Plant Print.

El marcaje de anticuerpos anti-CTV con estreptavidina, no fue una alternativa eficiente para la detección de CTV en ensayos de inmunopresión.

Agradecimientos. La presente investigación tuvo financiamiento del CONACYT-México, Clave 067702 y PAICYT-UANL CN-158-07. Los autores agradecen al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nuevo León, con sede en Montemorelos, N.L., por permitir el acceso y toma de muestras en plantas infectadas por el CTV en proceso de erradicación en huertas de General Terán.

LITERATURA CITADA

- AGDIA. 2008. CTV Immunoprint. <https://orders.agdia.com/Documents/m255.pdf>. (consulta, septiembre 2011).
- Anfoka GH, Abhary MK, Fattash I and Nakhla MK. 2005. Occurrence and distribution of *Citrus tristeza virus* (CTV) in the Jordan Valley. *Phytopathologia Mediterranea* 44:17-23.
- Batista L, Peña I, López D, Casín JC, Velásquez K, Torres MC and León Y. 2005. Management program for citrus tristeza in Cuba. Pp. 404-406. *In: Hilf ME, Durán N and Rocha MA. (eds.). Proc. 16th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 517p.*
- Besoain X, Simpson MC, Ramella F, Canales C, Valenzuela M, Castro M y Cambra M. 2003. Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos en Chile. XIII Congreso de Fitopatología Octubre 28-30 de Octubre. Maitencillo, Chile.
- Caicedo A y Muñoz OJ. 2006. Fortalecimiento del Centro de Investigación Palmira como un centro de referencia nacional para la producción de plántulas certificadas y el mejoramiento de la productividad de cítricos en 26. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Centro de Investigación Palmira, Colombia.
- Cambra M, Gorris MT, Marroquín C, Román MP, Olmos A, Martínez MC, Hermoso de Mendoza A, López, A and Navarro L. 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian community. *Virus recombinant protein of CTV unlabeled and labeled with biotin hydrazide were equally efficient to discriminate healthy samples from CTV infected, in immunoprinting tests, and comparable with Agdia and Plant Print commercial kits.*
- The anti-CTV labeling with streptavidin was not an efficient alternative for CTV detection in immunoprinting tests.
- Acknowledgements:** The study hereby was financed by CONACYT-Mexico, key 067702 and PAICYT-UANL CN-158-07. The authors shall thank The State Committee on Plant Health of Nuevo Leon, based in Montemorelos, NL, for allowing access to perform the sampling of CTV infected plants under eradication in orchards at General Terán.
- Research 71:85-95.
- Cambra M, Gorris MT, Román MP, Terrada E, Garnsey SM, Camarasa E, Olmos A, and Colomer M. 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. Pp. 34-41. *In: da Graça JV, Lee RF and Yokomi RK. (eds.). Proc. 14th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 435p.*
- Clark MF, Lister RM and Bar-Joseph M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-767.
- Djelouah K, and D'Onghia AM. 2009. Historical review on *Citrus tristeza virus* (CTV) in Palestine. *Mediterranean Citrus Industry* 65:121-123.
- Garnsey SM, Permar TA, Cambra M and Henderson CT. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). Pp. 39-50. *In: Moreno P, da Graça JV and Timmer LW. (eds.). Proc. 12th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 471p.*
- Iracheta CMM, Peña del Río MA y Rocha PMA. 2005. Comparación de antisueros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:323-328.
- Iracheta CMM, Metheney P, Polek ML, Manjunath KL, Lee RF and Rocha PMA. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. *Plant Disease* 93:11-16.
- Iracheta CMM, Sandoval ABD, Román CME, Manjunath KL, Lee RF and Rocha PMA. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of citrus tristeza virus and their effectiveness for virus detection. *Journal of Phytopathology* 156:243-250.
- Korkmaz S. 2002. Application of direct tissue blot immunoassay in comparison with DAS-ELISA for detection of Turkish isolates of *Citrus Tristeza Closterovirus* (CTV). *Turkish Journal of Agriculture* 6:203-209.
- Lin Y, Rundell PA, Xie L and Powell CA. 2006. Prereaction of *Citrus tristeza virus* (CTV) specific antibodies increases speed of direct tissue blot immunoassay for CTV. *Plant Disease* 90:675-679.

- Loredo SRX, y Peña del Río MA. 2002. Validación de la técnica de inmunopresión para la detección del VTC. Pp. 189-190. En: XV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria. INIFAP. Villahermosa, Tabasco, México.
- Rivas VP, Loeza KE, Mora AG, Ruíz GN, Ochoa MDL, Gutiérrez EA y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:493-507.
- Rocha PMA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa CFM, Garnsey SM and Yokomi, RK. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- Rocha PMA, Ochoa CFM, Martínez SJP, Roistacher CN and Lee RF. 1998. Citrus tristeza virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Science* 50:26-36.
- Ruíz GN, Mora AG, Rivas VP, Góngora CC, Loeza KE, Ochoa MDL, Ramírez VG, Gutiérrez EMA y Alvarez R R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:41-47.
- Ruíz GN, Mora AG, Rivas VP, Ochoa MDL, Góngora CC, Loeza KE, Gutiérrez EMA and Ramírez VG. 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. Pp. 196-204. *In*: Hilf ME, Durán VN and Rocha PMA. (eds.). Proc. 16th Conference Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California. 517p.
- SAGAR. 1997. Plan de acción contra el virus tristeza de los cítricos y el pulgón café, *Toxoptera citricida*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Comisión Nacional Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México.
- SAGARPA. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 15p.
- SAGARPA. 2006. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
- Scopes RK. 1985. Protein purification, principles and practice. pp. 16-19. 3rd Printing. Springer-Verlag.
- Stein BE, Figueroa JI, Foguet L, Figueroa CAI, Escobar P LC. 2009. The citrus sanitation center of Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, Tucumán, Argentina. *Revista Industrial Agrícola de Tucumán* 86:43-45.
- Terrada E, Kerschbaumer RJ, Giunta G, Galeffi P, Himmler G and Cambra M. 2000. Fully “recombinant enzyme-linked immunosorbent assays” using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 90:1337-1344.

Influencia del Tipo de Muestra en la Inmunodetección del Virus del Mosaico de la Malanga

Sample-Type Influence on Dasheen Mosaic Virus Immunodetection

Rosa Elena González Vázquez, José Efraín González Ramírez, Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Apdo. 6, Santo Domingo, Villa Clara, CP 53000, Cuba; Daríel Cabrera Mederos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Correspondencia: relena@inivit.cu

(Recibido: Diciembre 14, 2011 Aceptado: Marzo 13, 2012)

González VRE, González RJE y Cabrera MD. 2012. Influencia del tipo de muestra en la inmunodetección del virus del mosaico de la malanga. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:43-48.

Resumen. La malanga (*Xanthosoma* spp.) es uno de los cultivos más cotizados por la población cubana, por su riqueza energética y fácil digestión. El virus del mosaico de la malanga (DsMV, por sus siglas en inglés) constituye en el país una de las principales enfermedades de este cultivo. El traslado indiscriminado de semilla, ha aumentado su incidencia con pérdidas que alcanzan el 60%. En el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales se evaluó la influencia del tipo de muestra utilizada (plantas procedentes de campo y producidas *in vitro*) en los resultados del inmunoensayo ligado a enzima ELISA-DAS, utilizando el genotipo 'INIVIT MX-2006'. Con este propósito, se evaluó el tejido sintomático y asintomático de plantas de campo con síntomas y controles positivos y negativos de plantas producidas *in vitro*. Se obtuvo un 22.5% de resultados falsos negativos en plantas de campo. La relación de los valores de absorbancia positivos y negativos de ambas muestras fue estadísticamente superior en plantas producidas *in vitro*. Los resultados anteriores indican que la utilización de plantas producidas *in vitro* es mejor para el diagnóstico de esta enfermedad.

Palabras clave adicionales: DsMV, diagnóstico viral, ELISA-DAS, malanga.

La malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta*) es un producto valioso en muchos países tropicales y subtropicales, por su elevado valor dietético. Es la única vianda cuya digestión se realiza a pH neutro o cercano a éste, por lo que se recomienda en la dieta de personas con trastornos digestivos. La malanga es susceptible a enfermedades fúngicas, bacterianas y virales (Folgueras *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2000). El Virus del Mosaico de la Malanga (DsMV, del inglés *Dasheen mosaic virus*) es la enfermedad viral, en la malanga, más difundida a nivel mundial. En Cuba, el DsMV se informó por Quintero en 1987 y Hernández *et al.* (2000) en los géneros *Colocasia* y *Xanthosoma*, con una incidencia del 95%. El DsMV es

Abstract. Dasheen (*Xanthosoma* spp.) is one of the most demanded crops by cubans, due to its energetic richness and easy digestion. *Dasheen Mosaic Virus* (DsMV) constitutes one of the main diseases of this crop. The indiscriminate seed transfer has increased its incidence with yield losses up to 60%. At the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops, bananas, plantains and vegetables (INIVIT), the effect of sample origin (field plants and *in vitro* plants) was evaluated on enzyme-linked immunoassay (ELISA-DAS) results, using 'INIVIT MX-2006' genotype. For this purpose, symptomatic and asymptomatic tissues from field plants with symptoms and positive and negative controls from *in vitro* produced plants were evaluated. A 22.5% of negative false results were obtained on field plants. The ratio of positive and negative absorbance values for both plant samples was statistically superior on micro-propagated plants. These results suggest that the use of *in vitro* plants is better to diagnose this viral disease.

Additional Keywords: DsMV, viral diagnosis, ELISA-DAS, dasheen.

Résumé. Le malanga (*Xanthosoma* spp.) est l'une des cultures les plus demandées par la population cubaine, à cause de sa richesse énergétique et digestion facile. Le virus de la mosaïque du Malanga (DsMV, pour son sigle en anglais) est dans ce pays l'une des principales maladies de cette culture. Le transfert indiscriminé de la graine a augmenté son incidence avec des pertes atteignant 60%. L'Institut de la Recherche des Viandes Tropicales a évalué l'influence du type d'échantillon utilisé (plantes provenant du terrain et plants produites à partir de culture *in vitro*) sur les résultats de dosage d'immuno-essai liés aux enzymes ELISA-DAS, en utilisant le génotype 'INIVIT MX-2006'. Dans ce but, nous avons évalué les tissus des plantes symptomatiques et asymptomatiques provenant du terrain, et aussi des contrôles positifs et négatifs à partir des plantes obtenues *in vitro*. Nous avons obtenu 22,5% de résultats faux négatifs sur les plantes provenant du terrain. Le rapport des valeurs d'absorbance positive et négative des deux échantillons était statistiquement plus élevé chez les plantes cultivées *in vitro*. Les résultats ci-dessus indiquent que l'utilisation de plantes cultivées *in vitro* est meilleure pour le

transmitido, de forma no persistente, por varias especies de áfidos (Zettler *et al.*, 1978; Díaz *et al.*, 2010). Esta enfermedad produce retardo en el crecimiento y disminuye los rendimientos, hasta el 60%, en clones comerciales de malanga (Brunt, 1992).

Las técnicas inmunoquímicas y moleculares, son las principales vías para la identificación y diagnóstico de los virus vegetales (Chen *et al.*, 2006). En Cuba, se han obtenido anticuerpos policlonales para la detección del DsMV por técnicas de UM-ELISA (Ultra-Micro-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Hernández *et al.*, 2000). Sin embargo, la técnica más utilizada en los laboratorios de certificación viral es el ELISA en sus variantes DAS, Doble Antibody Sandwich, e indirecto. En este tipo de análisis se corre el riesgo de obtener resultados falsos negativos, lo cual, entre otras causas, puede estar asociado al tipo de muestra que se utilice. Esta problemática trae consigo que se lleve a campo semilla infectada, y de este modo se disemine la enfermedad provocando afectaciones económicas y fitosanitarias. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia del tipo de muestra utilizada en los resultados del diagnóstico mediante la metodología de ELISA-DAS.

MATERIALES Y MÉTODOS

En los experimentos, se utilizó el genotipo 'INIVIT MX-2006' (*Xanthosoma* spp.), comprendido dentro de la lista de genotipos comerciales en el programa de producción del INIVIT para la entrega a las biofábricas del país. Las determinaciones inmunoquímicas se realizaron mediante inmunoensayo ligado a enzima a partir del sistema comercial (ELISA-DAS para el Virus del mosaico de la malanga) de la casa comercial Agdia, EU. La absorbancia se determinó a 405 nm con un lector (BIO-TEK ELx-800, EU) y se empleó un lavador automático de placas (DAS srl, Italia), según recomendaciones del fabricante.

Se utilizaron bancos de controles positivos y negativos formados por plantas producidas *in vitro*, iniciadas a partir de plantas de campo infectadas con el DsMV y bancos *in vitro* de controles negativos, respectivamente.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHIC plus 5.0 y Statistix versión 1 sobre Windows.

Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo. Se utilizaron 20 plantas sintomáticas, las cuales llevaban 120 días sembradas. De cada planta se tomó una muestra de tejido foliar de la región sintomática y una muestra de la región asintomática. Las 40 muestras de tejido foliar se diagnosticaron siguiendo la metodología de ELISA-DAS.

Se comparó la media de los valores de lectura positivos de ambos grupos de muestras (sintomáticas y asintomáticas), con una prueba de Mann Whitney. Además, se compararon las medias de las razones del valor de absorbancia de cada muestra con el control negativo (VA_M/C) correspondiente.

Se determinó el porcentaje de fiabilidad del ELISA-DAS en tejido foliar procedente de campo a partir de la

diagnóstico de cette maladie.

Mots clés supplémentaires: DsMV, diagnostic viral, ELISA-DAS, malanga.

Dasheen (*Xanthosoma* spp. and *Colocasia esculenta* Schott.) is a valuable product in many tropical and subtropical countries because of its high nutritional value. It is the only viand whose detection is performed at neutral pH or very close to it. It is susceptible to fungal, bacterial and viral diseases (Folgueras *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2000). The *Dasheen mosaic virus* (DsMV) is the dasheen viral disease most widely spread worldwide; it was reported in Cuba by Quintero in 1987 and Hernández *et al.* (2000) in the *Colocasia* and *Xanthosoma* genus, with a 95% incidence. It is transmitted in a non-persistent manner by several aphid species (Zettler *et al.*, 1978; Díaz *et al.*, 2010). Growth retardation is caused by this disease, decreasing yield up to 60% in dasheen commercial clones (Brunt, 1992).

The immunochemical and molecular techniques are the main identification and diagnosis sources (Chen *et al.*, 2006). Polyclonal antibodies have been obtained in Cuba for DsMV detection by UM-ELISA techniques (Ultra-Micro-Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) (Hernández *et al.*, 2000). Nevertheless, the most utilized technique by viral certified laboratories is the ELISA in its DAS variants, from the Double Antibody Sandwich, and indirect. There is a chance in this type of analysis of obtaining false-negative results which, among other causes, can be associated with the types of sample used. Such problematic brings along the issue of taking infected seed to the field, which leads to disease spreading thus causing both economical and phytosanitary issues. The present study was aimed to evaluate the sample type influence on diagnosis results throughout the ELISA-DAS methodology.

MATERIALS AND METHODS

The 'INIVIT MX-2006' genotype (*Xanthosoma* spp.), was used in the experiments which appears in the list of commercial genotypes in the INIVIT production programs for delivery to the country bio-factories. The immunochemical determinations were carried out by enzyme-linked immunoassay based trading system (ELISA-DAS for the Dasheen mosaic virus) from the Agdia Company, USA. The absorbance was determined at 405 nm with a reader (BIO-TEK ELx-800, USA); a plates automatic washing machine was used (DAS srl, Italy), in accordance to manufacturer recommendations.

Both positive and negative control banks were used, formed by plants produced *in vitro*, initiated from DsMV infected field plants, and negative *in vitro* control banks, respectively.

Statistical comparisons were performed using the STATGRAPHIC plus 5.0 statistical package and Statistix version 1 on Windows.

Symptomatic and asymptomatic leaf tissue evaluation on symptomatic plants from the field. A total of 20 symptomatic samples were used, which had been sown

relación entre falsos negativos y el total de muestras analizadas.

Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles. Se utilizaron 20 plantas producidas *in vitro* como controles positivos y negativos, que se establecieron a partir de plantas infectadas y sanas, respectivamente. En ambos casos, el material fue recomprobado siguiendo la metodología enunciada anteriormente. Se calculó la relación entre el control positivo y el control negativo de este diagnóstico. Se realizó la comparación de las medias de los valores de lectura positivos de muestras de campo con los obtenidos en las plantas de malanga producidas *in vitro*, mediante una prueba de Mann Whitney.

Para determinar la cantidad de veces que el valor de lectura positivo supera numéricamente al control negativo, se calculó la razón entre los valores de absorbancia de cada muestra y los controles negativos correspondientes en plantas producidas *in vitro* y plantas procedentes de campo. Los valores medios obtenidos se compararon estadísticamente con una prueba de Mann Whitney, para un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de tejido foliar sintomático y asintomático de plantas sintomáticas procedentes de campo. Según los valores de lectura obtenidos en las 20 muestras de campo que presentaron síntomas de la enfermedad viral, en cinco muestras se obtuvieron valores de absorbancia inferiores al límite de corte, lo que representa

for 120 days. A symptomatic region leaf tissue was sampled from each plant, as well as an asymptomatic region sample. The 40 leaf tissue samples were diagnosed by following the ELISA-DAS methodology.

The positive reading average values from both sample groups (symptomatic and asymptomatic) were compared with a Mann Whitney test. Additionally, the averages of the absorbance values ratio from each sample were compared with each sample of the corresponding negative control (VA_m/C).

The ELISA-DAS reliability percentage in leaf tissue taken from the field was determined throughout the negative false ratio and the total samples analyzed.

Leaf tissue evaluation of plants grown *in vitro* and set as controls. A total of 20 plants produced *in vitro* were used as positive and negative controls, which had been established from both infected and healthy plants. The material was re-tested in both cases following the methodology previously mentioned. The relation between the positive and the negative control was calculated in this diagnose.

A comparison of the positive readings average values of the field samples obtained from the dasheen plants produced *in vitro* using a Mann Whitney test, was performed. The ratio among each sample absorbance values and the corresponding negative controls in plants produced *in vitro*, and in plants from the field, was calculated in order to determine the times that the positive reading value numerically exceeded the negative control. The average values obtained were statistically compared through a Mann

Cuadro 1. Análisis a muestras de tejido sintomático y asintomático de plantas de malanga sintomáticas procedentes de campo. Table 1. Analysis from both symptomatic and asymptomatic tissue samples from symptomatic dasheen plants taken from the field.

Tipo de Muestras	Número de muestras evaluadas	Número de muestras negativas	Porcentaje de muestras falso negativas (%)
Tejido sintomático	20	5	25
Tejido asintomático	20	4	20
Total	40	9	22.5

un 25% de falsos negativos (Cuadro 1). Estos resultados pueden estar asociados a la naturaleza del tejido vegetal. Las hojas jóvenes contienen abundantes mucílagos que al macerarse forman un líquido viscoso, difícil de pipetear, lo que puede influir en la utilización de una muestra que no sea lo suficientemente homogénea, lo cual reduce la reacción Ag-Ac y produce valores de lectura que no coinciden con el estado fitosanitario de la muestra evaluada. Peralta (1997) señala que en el diagnóstico mediante ELISA se debe garantizar la homogeneidad de la muestra.

De las 20 muestras asintomáticas procedentes de campo analizadas, cuatro tuvieron valores de absorbancia negativos, correspondiente al 20% del total de muestras evaluadas. Se observó que 16 muestras restantes fueron positivas al diagnóstico, con valores de absorbancia superiores al límite de corte. Lo cual puede estar asociado a la concentración viral disponible. En este caso las plantas

Whitney test, for a confidence interval of 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Symptomatic and asymptomatic leaf tissue evaluation of symptomatic plants taken from the field.

According to the readout obtained from the 20 field samples presenting symptoms of the viral disease, absorbance values below the cut-off limit were obtained from five samples, which represent 25% of false negatives (Table 1). Such results may be associated to the nature of the plant tissue. The young leaves have plenty of mucilage which, after maceration, form a hard to pipette viscous liquid that may influence the use of a sample which is not homogenous enough, reducing the Ag-Ac reaction, and producing reading values that are not consistent with the phytosanitary status of the tested sample, thus. It is pointed out by Peralta (1997) that the ELISA diagnose is meant to ensure sample

pueden estar infectadas, presentar síntomas de enfermedad y no ser detectadas las proteínas virales mediante ELISA. Para Zettler *et al.* (1987) el virus puede estar ausente o en baja concentración en tejidos que no presenten síntomas. Cabrera *et al.* (2010) señalan una alta concentración viral en zonas sintomáticas de hojas de malanga *Xanthosoma* infectadas con el DsMV.

En las muestras sintomáticas y asintomáticas positivas al diagnóstico, los valores medios de absorbancia no mostraron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Mann Whitney para el intervalo de confianza del 95% (Cuadro 2). No existen diferencias significativas entre las medias de la razón calculada entre el

Cuadro 2. Media de los valores de lectura positivos en plantas de malanga de campo y razón entre los valores de absorbancia (VA) y VA del control negativo.

Table 2. Positive readings average values in field dasheen plants and the ratio among the absorbance values (AV) and negative control AV.

Tipo de muestras	Valor de absorbancia positivos (405 nm)	Razón VA+/VA del control negativo
Tejido sintomático	0.172a±0.00187	2.30a±0.00361
Tejido asintomático	0.171a±0.00302	2.29a±0.00355

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según prueba de Mann Whitney $p < 0.05$.

Limite de corte = 0.147

valor de absorbancia y el control negativo en las muestras positivas.

Del total de muestras procedentes de campo que fueron diagnosticadas por ELISA-DAS, nueve resultaron falsos negativos, lo que indica que esta prueba mostró un 77.5% de fiabilidad para muestras procedentes de campo. González *et al.* (2005) señalan que las diferentes variantes de la técnica ELISA alcanzan más del 90% de confiabilidad para el diagnóstico del DsMV. Sin embargo, Hu y Wang (1988) recomiendan el uso repetido, al menos tres veces de esta prueba. Debido a la distribución aparentemente no uniforme del virus en las especies vegetales se requieren múltiples realizaciones de ELISA en el tiempo y sobre diferentes tejidos de la planta (Hu y Wang, 1994).

La obtención de un elevado porcentaje de falsos negativos en la detección del DsMV en plantas de campo, así como de reacciones positivas en muestras de tejido asintomático de similar procedencia, indican que para realizar un diagnóstico eficiente y confiable del DsMV en malanga no es conveniente emplear muestras provenientes de campo.

Evaluación de tejido foliar de plantas producidas *in vitro* establecidas como controles. En las plantas producidas *in vitro* de malanga empleadas como controles positivos se observó mosaico y deformación en los folíolos, síntomas típicos producidos por el DsMV (Fig. 1).

El 100% de las plantas de malanga producidas *in vitro*, establecidas como controles positivos fueron diagnosticadas positivas (Cuadro 3). En las muestras establecidas como controles negativos que fueron evaluadas, el 100% fue confirmado en el diagnóstico. Esta prueba mostró el 100% de fiabilidad para el uso de plantas establecidas *in vitro* en el diagnóstico del DsMV. Estos

homogeneity.

A total of four samples, out of the 20 taken from the field, had negative absorbance values, which corresponds to 20% of the total evaluated samples. It was revealed that 16 of the remaining samples were positive to diagnosis, with absorbance values above cut-off. This may be associated with the viral concentration availability. The plants in this case may be infected, present disease symptoms and without the viral proteins detected by ELISA. The virus, in accordance to Zettler *et al.* (1987), may be absent or in low concentration on tissues without symptoms.

A high viral concentration in *Xanthosoma* dasheen leaves DsMV infected symptomatic areas are pointed out by

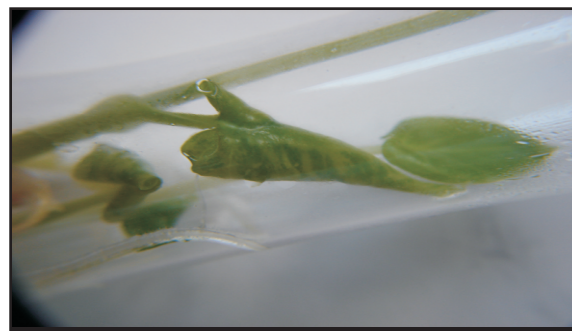


Figura 1. Mosaico y deformación de los folíolos producidos por el DsMV en plantas de malanga producidas *in vitro*.

Figure 1. Mosaic and leaflets deformation produced by DsMV in dasheen plants produced *in vitro*.

Cabrera *et al.* (2010). The absorbance mean values did not have any statistically significant differences in neither the symptomatic nor the asymptomatic positive diagnoses samples, in accordance to the Mann Whitney test for the confidence interval of 95% (Table 2). A lack of significant differences, among the means of the calculated ratio between the absorbance value and the negative control in the positive samples, prevails.

A total of nine samples from all the sampling taken from the field diagnosed by ELISA-DAS came out negative, indicating 77.5% reliability for samples taken from the field. It is pointed out by González *et al.* (2005) that the ELISA technique different variants reach over 90% reliability for DsMV diagnose. However, the repeated use of this test for at least three times is recommended by Hu and Wang (1988). Apparently, due to the virus non-uniform distribution in plant species, it is required to perform multiple ELISA

resultados coinciden con los obtenidos por Knapp (1998), en un estudio sobre el Virus de la viruela de la ciruela (PPV, *Plum pox virus*) que señaló que el diagnóstico mediante

embodiments in time on different plant tissues (Hu and Wang, 1994).

It is indicated by obtaining high false negatives

Cuadro 3. Análisis por ELISA-DAS a plantas de malanga producidas *in vitro* empleadas como controles.
Table 3. Analysis by ELISA-DAS to dasheen plants produced *in vitro* used as controls.

Plantas producidas <i>in vitro</i>	Número de muestras evaluadas	Resultados positivos	Resultados negativos	Media de los VA (405 nm)	Relación C+/C-
Controles positivos (C+)	20	20	0	0.314	6.2
Controles negativos (C-)	20	0	20	0.112	

Límite de corte = 0.160

ELISA es más confiable durante la etapa *in vitro*.

La relación entre los valores del control positivo y negativo fue 6.2. Según Alberti (1998), las mejores relaciones son aquellas en las que la relación entre los valores de absorbancia de los controles positivos y negativos es menor de 10.

Al analizar los valores de la evaluación a las plantas producidas *in vitro* con respecto a la realizada a plantas de campo se obtuvo, que los valores de absorbancia de la lectura en plantas producidas *in vitro* superaron numéricamente a los obtenidos en las plantas de campo (Cuadro 4).

La comparación estadística entre las medias positivas de los valores de lectura de las plantas producidas *in vitro* y las plantas de campo muestran diferencias estadísticas. La razón entre valor de absorbancia de cada muestra y su control negativo correspondiente, fue mayor en plantas producidas *in vitro* que en plantas procedentes de campo, con diferencias estadísticas.

Este análisis permite inferir que el diagnóstico del DsMV debe realizarse con plantas producidas *in vitro*. La utilización de este material favorece la diferenciación entre las muestras positivas y negativas y ofrece mayor porcentaje de fiabilidad, pues disminuyen los falsos negativos. De igual modo, la razón entre el valor de absorbancia del diagnóstico en plantas producidas *in vitro* y su control negativo correspondiente, indican preferentemente la utilización de plantas producidas *in vitro* para el diagnóstico mediante ELISA-DAS. Cuando se emplean plantas producidas *in vitro* para el diagnóstico, los valores de lectura positivos se alejan numéricamente del control negativo, lo cual aumenta la diferencia entre los valores de absorbancia de las muestras sanas con respecto a las infectadas, y hace más eficiente el diagnóstico. Reyes *et al.* (2006) obtuvieron alta incidencia de DsMV en campo cuando utilizaron plantas producidas *in vitro* libre de virus como material de siembra. Igarza (2001) mayor facilidad y esto permite obtener una muestra homogénea para realizar el diagnóstico.

CONCLUSIONES

El diagnóstico realizado con tejido vegetal de plantas producidas *in vitro* aumenta la fiabilidad del inmunoensayo, ya que disminuye la incidencia de resultados falsos negativos y aumenta la diferencia cuantitativa entre

percentage for DsMV detection in filed plants, as well as by the positive reactions in asymptomatic tissue sample of similar precedence, that for an efficient and reliable DsMV diagnose in dasheen, it is not convenient to use samples from the field.

Leaf tissue evaluation of *in vitro* grown plants established as controls. A mosaic and leaflets deformation was observed in dasheen plants grown *in vitro* used as positive controls, typical symptoms produced by DsMV (Fig. 1). A total of 100% of the dasheen plants grown *in vitro* used as positive controls, were diagnosed positive (Table 3). Concerning the samples established as negative controls, 100 % was also confirmed in the diagnose. A total of 100% reliability was revealed by this test for the usage of plants grown *in vitro* in the DsMV diagnose. These results are consistent with those obtained by Knapp (1998) in a study on the Plum pox virus (PPV) which pointed out that the diagnose reach by ELISA is more reliable in the *in vitro* stage.

The relation between the values from the positive and negative controls was 6.2. According to Alberti (1998), the best relations are those in which the relation between the positive and negative controls absorbance values is below 10.

It was revealed, as the evaluation values from the

Cuadro 4. Media de los valores de absorbancia positivos y razón entre los valores de absorbancia y el control negativo en plantas de malanga procedentes de campo y producidas *in vitro*.

Table 4. Average of the positive absorbance values and the ratio between the absorbance values and the negative controls in dasheen plants taken from the field and produced *in vitro*.

Tipo de muestra	Valor de absorbancia (VA) (405 nm)	VA/VA del control negativo
Plantas de campo	0.170a±0.01276	2.300a±0.01043
Plantas producidas <i>in vitro</i>	0.315b±0.00177	3.933b±0.01288

Límite de corte en plantas producidas *in vitro*=0.160

Medias con letras diferentes en una misma columna difieren según prueba de Mann Whitney a p<0.05

muestras positivas y negativas.

LITERATURA CITADA

- Alberti E, Fachado A, Montalvo AM, Izquierdo LA y Fonte L. 1998. Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Medicina Tropical* 50: 75-81.
- Brunt AA. 1992. The general properties of potyviruses. Pp:3-16. *In*: Barnett OW. (ed.). *Potyvirus Taxonomy*. Springer-Verlag. New York. 250p.
- Cabrera D, González J, Portal O y Hernández R. 2010. Influencia del virus del mosaico de la malanga sobre el contenido de clorofila en *Xanthosoma nigrum* (VELL.) genotipo INIVIT M 95-1. *Protección Vegetal* 25: 194-196.
- Chen J, Zheng HY, Shi YH, Adams MJ, Wei CB y Lin L. 2006. Detection and characterisation of a second potyvirus from Thunberg fritillary in China. *Archive Virology* 151: 439-447.
- Díaz A, Quiñones M, Hernandez A y Barrio G. 2010. Evaluación de los parámetros analíticos para la detección molecular de potyvirus que afectan al cultivo del pimiento en Cuba. *Protección Vegetal* 25: 80-87.
- Folgueras M, Rodríguez S, Herrera L. 2009. El mal seco de la malanga: una enfermedad manejable con tecnología de base agroecológica. *Agricultura Orgánica*. 15(2): 25-26.
- González JE, Hernández R, Portal O, Pairol A y González Y. 2005. Metodología para el diagnóstico molecular del Virus del Mosaico de la Malanga para la certificación de plantas *in vitro* de clones comerciales de malanga. *Biotecnología Vegetal*. 5(1): 27-32.
- Hernández PR, Bermúdez D, González JE, Machado J, Pairol A y García M. 2000. Establecimiento de un sistema de diagnóstico por UM-ELISA para DMV en aráceas. Certificación de vitroplantas de géneros comerciales para la introducción en biofábricas. *Centro Agrícola*. 27(1): 80-89.
- Hu C y Wang P. 1988. Meristem, shoot tip and bud culture. *In*: Evans DA, Sharp WR y Ammirato PV. (eds.). *Handbook of plant call culture*. MacMillan, New. 500p.
- Hu C y Wang P. 1994. Detection of Dasheen mosaic virus from Taro plants in the field and in tissue culture. *Plant Diseases*. 78: 754.
- Igarza J, Hernández R y Cruz B. 2001. La electroterapia como alternativa para la eliminación del virus DMV en la malanga. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. (60): 57-60.
- Knapp E, Hanzel V, Mendosa D, Da Camara A, Katinger H y Laimer M. 1998. Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 52: 3-6.
- Peralta EL. 1997. Diagnóstico de fitopatógenos. Manual teórico-práctico. 2da Ed. La Habana: CENSA/MES, 120 p.
- Reyes G, Ronnberg-Wastljung AC, Nyman M. 2006. Comparison Of Field Performance Between Dasheen

plants produced *in vitro* with regards to the field plants was analyzed, that the reading absorbance values in plants produced *in vitro* outnumbered those of the plants taken from the field (Table 4).

Statistical differences were revealed by the statistical comparison among the mean values positive readings from the plants grown *in vitro* and the plants taken from the field. The ratio between each sample absorbance value, and its corresponding negative control, was higher in plants produced *in vitro* than in plants taken from the field, with statistical differences. It is allowed to infer by such analysis that the DsMV diagnose must be performed with plants produced *in vitro*. The differentiation between the positive and negative controls is favored by this material utilization, offering a higher reliability percentage since false negatives are diminished by it.

Likewise, it is indicated by the ratio between the absorbance value in plants produced *in vitro* and its corresponding negative control that the utilization of plants produced *in vitro*, in order to perform an ELISA-DAS diagnose, is preferred.

As plants produced *in vitro* are used for diagnose, the positive reading values are numerically taken away from the negative control, which increases the difference between the healthy samples absorbance values with regards to the infected, making the diagnose more efficient. A high DsMV was obtained in the field by Reyes *et al.* (2006) when using virus free plants produced *in vitro* as planting material. It is stated by Igarza (2001) that a more reliable diagnosis can be reached by the ELISA technique on plants produced *in vitro*.

The leaf tissue of dasheen plants produced *in vitro* is more easily macerated than the tissue of plants taken from the field. Due to the plants produced *in vitro* cuticle thickness, the cell membranes are most likely torn apart, which allows to obtain a homogeneous sample for diagnosis.

CONCLUSIONS

The immunoassay reliability is increased by the diagnose performed with plant tissue from plants produced *in vitro*, since it decreases the false negatives incidence and it increases the quantitative difference between positive and negative samples.

Mosaic Virus-Free And Virus-Infected In Vitro Plants Of Cocoyam (*Xanthosoma Spp.*) In Nicaragua. *Experimental Agriculture* 42 (3): 301-310.

Zettler FW, Abo-El-Nil MM y Hartman RD. 1978. Dasheen mosaic virus. Description of Viruses of the Plant the Commons Mycol Inst / Assoc the Phytopathology, Surrey, Inglaterra. 4 p.

Zettler FW, Tsai JH, Fraan HC, Ke C y Lu KE. 1987. Dasheen Mosaic Virus infesting taro in people's Republic of China. *Plant Diseases*. 71: 873-839.

Mecanismos de Defensa del Chile en el Patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*

Chili Defense Mechanisms in the *Capsicum annuum-Phytophthora capsici* Pathosystem

Arturo Castro Rocha, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltante del PRONAF y Estocolmo s/n, Ciudad Juárez, Chih., CP 32310, México; **Sylvia Patricia Fernández Pavía**, Laboratorio de Patología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Mich., CP 58880, México; **Pedro Osuna Ávila**, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltante del PRONAF y Estocolmo s/n, Ciudad Juárez, Chih., CP 32310, México. Correspondencia: osunapedro@hotmail.com

(Recibido: Noviembre 20, 2011 Aceptado: Febrero 08, 2012)

Castro RA, Fernández PSP y Osuna AP. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. Revista Mexicana de Fitopatología 30:49-65.

Resumen. El chile es una hortaliza cultivada a nivel mundial que se caracteriza por sus frutos pungentes. *Phytophthora capsici* es uno de los principales factores limitantes en la producción de varias hortalizas, entre las que se encuentra el chile. Este patosistema ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, los problemas que este ocasiona aún están lejos de solucionarse, debido entre otras cosas, a la variabilidad del patógeno. El descubrimiento de cultivares resistentes (Criollo de Morelos 334) ha permitido conocer más a fondo los mecanismos que emplean las plantas de chile para defenderse de este fitopatógeno. Se ha generado gran cantidad de información sobre esta interacción, por lo que el objetivo de esta revisión es presentar los avances que se han tenido en el entendimiento de esta relación planta-patógeno, con el fin de dar rumbo a las nuevas investigaciones.

Palabras clave adicionales: CM-334, Oomycete, marchitez del chile.

El chile (*Capsicum* spp.), también conocido como ají, pimienta, chiltoma o morrón, es una hortaliza cultivada en todo el mundo que se caracteriza por sus frutos pungentes, aunque existen variedades con frutos dulces. El chile es el condimento de mayor importancia económica en el mundo. Se consume como fruto fresco, deshidratado o procesado en distintos tipos de comidas, sus capsicinoides tienen uso medicinal y sus frutos maduros son una fuente importante de pigmentos (Ortiz *et al.*, 2010). Existen cinco especies de *Capsicum* que se cultivan en el mundo, siendo *C. annuum* la de mayor consumo. *Phytophthora capsici* causa la enfermedad más devastadora en chile a nivel mundial

Abstract. Chili is a worldwide cultivated crop known for its pungent fruits. *Phytophthora capsici* is currently known to be the limiting factor in the production of many crops, including pepper. This pathosystem has been widely studied yet the problems caused by it are far from being solved, in part due to the variability of the pathogen. The discovery of resistant cultivars (Criollo de Morelos 334) has allowed us to learn more about the mechanisms used by chili plants to defend from this phytopathogen. A great deal of information has been generated about this interaction, therefore the objective of this review is to present the findings about this plant-pathogen relationship to give direction to new research.

Additional keywords: CM-334, Oomycete, chili wilt.

Résumé. Le piment est un légume cultivé au niveau mondial et connu pour ses fruits piquants. *Phytophthora capsici* est l'un des principaux facteurs limitants dans la production de plusieurs légumes, parmi lesquels la flétrissure du piment. Ce pathosystème a été largement étudié; cependant les problèmes occasionnés sont encore loin d'être résolu, dus entre autres aspects, à la variabilité de l'agent pathogène. La découverte de cultivars résistants (Criollo de Morelos 334) a permis de mieux comprendre les mécanismes utilisés par les plants de piment pour se défendre contre ce pathogène. Un grand nombre d'informations sur cette interaction a pu être générée. Le but de cette revue est de présenter les progrès qui dérivent de la compréhension de cette relation plante-pathogène, afin de laisser la place à de nouvelles recherches.

Mots clés supplémentaires: CM-334, Oomycètes, flétrissure du piment.

The chile, (*Capsicum* spp.), also known as chili, pepper, sweet pepper or pimento, is a vegetable cultivated throughout the world, characterized by its pungent fruit;

(Ristaino y Johnston, 1999), conocida como marchitez del chile. Aunque hay varias fuentes de resistencia genética a *Phytophthora* en chiles, existe una gran interrogante sobre la especificidad de la relación genotipo/aislado del patógeno, el número de genes que controlan la resistencia a este patógeno y la efectividad de esta resistencia. Solamente el chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) es considerado como universalmente resistente, sin importar la agresividad del aislado ni las condiciones ambientales (Sarath *et al.*, 2011). Se han identificado seis regiones cromosómicas mayores involucradas en la resistencia de esta planta hacia el ataque de patógenos. El factor de resistencia localizado en el cromosoma cinco es compartido por las plantas de chile resistentes y se cree que confiere la resistencia contra Oomycetes en general (Thabuis *et al.*, 2004). Se han realizado una gran cantidad de investigaciones para dilucidar los mecanismos de resistencia en las plantas de chile a *P. capsici*, no obstante, aún falta mucho para comprender por completo esta interacción. El objetivo de esta revisión es presentar los avances que se han tenido en el entendimiento de los mecanismos de defensa en este patosistema.

¿Por qué es importante estudiar este patosistema? En México, al igual que en el resto del mundo, la marchitez del chile producida por *P. capsici* es un problema grave para los productores de esta hortaliza. Se ha reportado su presencia en el norte-centro del país en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos y Estado de México (Pérez *et al.*, 2003; Velásquez *et al.*, 2001), al sur del estado de Chihuahua donde mostró una gran severidad contra el chile tipo jalapeño (Silva *et al.*, 2009; Guigón y González, 2001) y al sur del país en el estado de Oaxaca incidiendo sobre cultivos de “chile de agua” (Vásquez *et al.*, 2009) y en el estado de Guerrero (Pérez *et al.*, 2003). Rodríguez *et al.* (2004) reportaron que el grado de patogenicidad de los aislados de *P. capsici* no sigue un patrón definido de distribución y que aislados con diferentes grados de patogenicidad conviven en el mismo espacio.

Conociendo al enemigo: ¿Qué son los Oomycetes?

Los Oomycetes son un grupo diverso de organismos eucariotas con una amplia distribución. Colonizan montañas, desiertos, ambientes acuáticos y hasta la Antártica. Sin embargo, se conoce poco sobre ellos (Thines y Kamoun, 2010). Este grupo de organismos miceliales pertenecen al reino Stramenopila (Blair *et al.*, 2008; West *et al.*, 2003; Tyler, 2001), que representan una línea evolutiva única y distante de los hongos verdaderos. El carácter unificador del Reino Stramenopila es el flagelo anterior de tipo oropel, el cual porta dos filas de vellosidades tubulares tripartitas y que está presente en el aparato flagelar heteroconto de las zoosporas (Moore, 2002; Dick, 2001). Una característica común de todos los Oomycetes es su habilidad para absorber nutrientes directamente (osmótrofos), motivo por el cual se agrupaban con los hongos verdaderos, con los cuales comparten varias características tales como el desarrollo de hifas y la dispersión por medio de esporas mitóticamente formadas (Thines y Kamoun, 2010). Sin embargo, además de

although, there are varieties with sweet fruit. The chile is the most economically important spice worldwide. It is consumed as fresh fruit, dried or processed in different types of food; its capsaicinoids are for medicinal utilization, and its ripe fruit are an important source of pigments (Ortiz *et al.*, 2010). A total of five *Capsicum* species are grown worldwide, being *C. annuum* the most commonly consumed. The chile most devastating disease in the world is caused by *Phytophthora capsici* (Ristaino and Johnston, 1999), known as chile wilt. Even though there are several genetically resistant sources to *Phytophthora* in chile, a big question about the pathogen genotype / isolate specificity stands, as well as the number of genes controlling the resistance to this pathogen and the effectiveness of such resistance. Only the serrano chile creole type 334 from Morelos (CM-334) is regarded as universally resistant, regardless isolation aggressiveness or the environmental conditions (Sarath *et al.*, 2011). Six major chromosomal regions involved in plant resistance to the attack of the pathogen have been identified. The resistance factor located in chromosome five is shared by resistant chile plants, and it is believed to confer resistance against Oomycetes in general (Thabuis *et al.*, 2004). A great deal of research looking forward to elucidate the resistance mechanisms in chile plants to *P. capsici* has been performed; nonetheless, much remains to reach a fully comprehension of such interaction. The present study is aimed to describe the advances in understanding the defense mechanisms in this pathosystem.

Why is it so important to study this pathosystem?

The chile wilt caused by *P. capsici* in Mexico, as in the rest of the world, is a major problem for the growers of this vegetable. Its presence in the north-center side of the country has been reported in the states of Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Morelos and the state of Mexico (Pérez *et al.*, 2003; Velásquez *et al.*, 2001); in the southern region of the state of Chihuahua, where it showed a great deal of severity against the jalapeno chile type (Silva *et al.*, 2009; Guigón and González, 2001), and in the southern region of the state of Oaxaca, affecting the crops of “chile de agua” (Vásquez *et al.*, 2009), as well as in the state of Guerrero (Pérez *et al.*, 2003). It was reported by Rodríguez *et al.* (2004) that the *P. capsici* isolates pathogenicity does not follow a definite distribution pattern, and that isolates with different degrees of pathogenicity get to coexist in the same space.

Knowing the enemy: What are the oomycetes?

The Oomycetes are a diverse group of eukaryotic organisms with a wide range of distribution. They get to colonize mountains, deserts, aquatic environments and even the Antarctica. Nevertheless, only little is known about them (Thines and Kamoun, 2010). This group of mycelia organisms belong to the Stramenopila kingdom (Blair *et al.*, 2008; West *et al.*, 2003; Tyler, 2001), which represent a unique evolutionary line distant from the true fungi. The Stramenopila kingdom unifying character is the scourge type previous tinsel, which carries two rows of tripartite tubular hairs, being present in the zoospores heterokonto flagella apparatus (Moore, 2002; Dick, 2001). A common

dispersarse por medio de zoosporas y de producir oosporas sexuales con paredes celulares gruesas, poseen otras características tales como celulosa (β -1,4-glucano) en sus paredes celulares, diploidía vegetativa, flagelos heterocontos, crestas mitocondriales tubulares y, en el caso de las especies del género *Phytophthora*, la falta de epoxidación del escualeno para la síntesis de esteroides, que los distinguen de los hongos verdaderos. Filogenéticamente, están relacionados a las algas heterocontas tales como las crisofitas y las diatomeas (West *et al.*, 2003). Varios grupos de Oomycetes han evolucionado en patógenos altamente adaptados afectando organismos en Reinos eucariotas tan diversos como los Alveolata, Animalia, Mycota, Stramenipila y Plantae (Thines y Kamoun, 2010; Tyler, 2001). La mayoría de los Oomycetes son parásitos de plantas, y algunas especies ocasionan enfermedades en plantas de importancia económica (Thines y Kamoun, 2010).

Debido a la fisiología de los Oomycetes, la mayoría de los fungicidas no tienen efecto sobre ellos. Por ejemplo, aquellos fungicidas que interrumpen la biosíntesis del ergosterol, ya que los Oomycetes no sintetizan esteroides, los adquieren de sus hospedantes. Además, los Oomycetes presentan una extraordinaria flexibilidad genética que les permite rápidamente adaptarse y desarrollar resistencia a fungicidas y a la resistencia genética en plantas (Tyler, 2001). La resistencia a químicos como el metalaxyl, un fungicida sistémico que interfiere con la incorporación de uridina en la síntesis de RNA (Davidse *et al.*, 1983), se ha desarrollado en varias especies de Oomycetes por lo que su uso requiere de un manejo adecuado para preservar la utilidad del fungicida (Tyler, 2001).

Los Oomycetes se reproducen tanto sexual como asexualmente. El ciclo asexual se caracteriza por la producción de esporangios. Los zoosporangios del género *Phytophthora* se forman en medios acuosos, usualmente cuando las temperaturas bajan. Las zoosporas liberadas nadan en el agua en busca de tejidos vegetales (semillas, raíces, tallos u hojas) en donde establecerse y enquistarse. Los quistes germinan desarrollando un tubo germinal que puede penetrar directamente al hospedante o por medio de la formación de un apresorio o una estructura similar a un apresorio. Utilizando los nutrientes adquiridos de la planta, las hifas del oomycete se ramifican en los tejidos vegetales formando micelio, el cual produce nuevos esporangios con lo cual se repite el ciclo de infección. La rapidez con que esto ocurre permite a este patógeno repetir múltiples veces su ciclo asexual durante el transcurso del desarrollo de una planta. El ciclo sexual genera oosporas de pared celular gruesa que están adaptadas para sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas. La oosporogénesis involucra la producción y fusión del oogonio (gametangio femenino) y del anteridio (gametangio masculino) que da como resultado el desarrollo de una oospora. Estas pueden permanecer en latencia durante largos periodos de tiempo y suelen sobrevivir en el suelo aun después del invierno, para después germinar cuando las condiciones ambientales sean las adecuadas formando uno o varios tubos germinales. Estos tubos germinales pueden formar esporangios, con lo

nutrientes (osmotrofos), which is why they grouped themselves with the fungi, which they share several characteristics with, such as hyphae development and spores spread through mitotically formed (Thines and Kamoun, 2010). However, in addition to its ability to disperse through zoospores and to produce sexual Oospores with thick cell walls, they also have other features, such as cellulose (β -1, 4-glucan) in its cell walls, vegetative diploid, heterokont flagella, tubular mitochondrial cristae and, in the case of *Phytophthora* genus species, the lack of squalene epoxidation for sterols synthesis, which distinguishes them from true fungi. They are phylogenetically related to heterocontas algae, such as crysophytes and diatoms (West *et al.*, 2003). Several oomycete pathogens have evolved in highly evolved pathogens, affecting organisms in eukaryotic kingdoms as diverse as Alveolata, Animalia, Mycota, Stramenipila and Plantae (Thines and Kamoun, 2010; Tyler, 2001). Most of the Oomycetes are plant parasites, and diseases on plants of economical relevance are caused by some species (Thines and Kamoun, 2010).

Most of the fungicides have had no effect on the Oomycetes, due to their physiology; as an instance, those fungicides interrupting ergosterol biosynthesis, since sterols are not synthesized by Oomycetes, but acquire them from their host. Additionally, the Oomycetes have an extraordinary genetic flexibility that allows them to quickly adapt and develop resistance to fungicides, as well as genetic resistance in plants (Tyler, 2001). Resistance to chemicals, such as metalaxyl, a systemic fungicide that interferes with uridine addition in RNA synthesis (Davidse *et al.*, 1983), has developed itself in several Oomycetes species. Therefore, a proper handling aimed to preserve the fungicide usefulness is required for their usage (Tyler, 2001).

Oomycetes reproduce themselves both sexually and asexually. The asexual cycle is characterized by sporangia production. The zoosporangia *Phytophthora* genus is formed in an aqueous media, usually as temperature drops. The released zoospores swim in water searching for plant tissues (seeds, roots, stems or leaves), where to settle and become entrenched. The germinate cysts develop a germ tube that can penetrate the host directly or through the formation of an appressorium or a structure similar to an appressorium. Using the nutrients acquired from the plant, the oomycete hyphae branches itself into the plant tissues forming mycelium and producing new sporangia, repeating the infection cycle, thus. The quickness under which this occurs allows this pathogen to repeat multiple times its asexual cycle during the course of the plant development. Thick cell wall oospores are produced by the sexual cycle which is adapted to survive through adverse environmental conditions. The oosporegenesis involves the oogonium production and fusion (female gametangium), and antheridium (male gametangium), resulting in an oospore development. These may remain dormant for long periods of time and usually survive in soil even after winter, only to germinate once the environmental conditions are adequate forming one or more germ tubes. These germinal tubes can form sporangia, which can restart the oomycete asexual life

cual se puede comenzar de nuevo el ciclo de vida asexual del oomycete (West *et al.*, 2003).

La interacción planta-oomycete: ¿Cómo funciona? Los Oomycetes pueden formar hifas especializadas, llamadas haustorios, que penetran las paredes celulares de las plantas y que permiten la asimilación de nutrientes de las células del hospedante. Estas estructuras también secretan un amplio espectro de proteínas efectoras que entran en las células del hospedante y que alteran las respuestas de defensa y metabolismo celular (Dodds, 2010). Al igual que otros fitopatógenos, los Oomycetes atacan a sus hospedantes secretando un arsenal de proteínas, colectivamente conocidas como efectores, cuyo blanco son las moléculas producidas por las células vegetales, alterando así sus procesos fisiológicos (Thines y Kamoun, 2010).

Los estudios sobre las interacciones planta-patógeno se enfocan en gran parte al estudio de genes de avirulencia (Avr) (Tyler, 2001). Los genes que determinan la resistencia y la susceptibilidad en las plantas son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en los patógenos (Madriz, 2002). Los genes Avr codifican productos que son detectados por los sistemas de defensa de las plantas, específicamente por receptores codificados por los genes de resistencia (R) de éstas. Si los productos de los genes Avr del patógeno son detectados por los de los genes R de la planta, entonces se desencadena la respuesta de resistencia. Si los mecanismos de defensa de la planta son incapaces de detectar los productos de los genes Avr, entonces la planta es susceptible a ser infectada. Se ha encontrado que muchos genes de avirulencia de los Oomycetes se encuentran agrupados. Este agrupamiento sugiere que los genes involucrados en el proceso de infección puedan estar en lo que se denominarían “islas de patogenicidad” (Tyler, 2001).

El género *Phytophthora*. Las especies del género *Phytophthora* son fitopatógenos devastadores tanto en agroecosistemas como en ecosistemas naturales (Blair *et al.*, 2008). El género *Phytophthora* es responsable de algunas de las más serias enfermedades en plantas (Schena y Cooke, 2006), tales como la pudrición de raíz de la soya (Tang *et al.*, 2011), la pudrición de raíz del tomate (Quesada y Hausbeck, 2010), la marchitez de la pimienta (Truong *et al.*, 2010), la marchitez del chile (Ogundiwin *et al.*, 2005) y la muerte repentina del roble (Martin y Tooley, 2003). Debido a su significativo impacto económico y ambiental, el interés por los aspectos genéticos y genómicos de estos Oomycetes ha aumentado. De igual manera, se han incrementado los esfuerzos por recopilar la información fenotípica y genotípica de este género (Blair *et al.*, 2008).

El género *Phytophthora* actualmente se clasifica dentro de la división Oomycota, en el orden Peronosporales y la familia Phythiaceae (Blair *et al.*, 2008). Es aceptado que el género *Phytophthora* ocupa una posición intermedia entre los géneros más primitivos de Oomycetes como *Saprolegnia*, *Achlya* y *Dictyuchus*, entre otros, los cuales son saprófitos, acuáticos y productores de zoosporangios, y los géneros más “avanzados”, *Albugo*, *Peronospora* y *Bremia*, que son fitopatógenos obligados. La mayoría de las

cycle (West *et al.*, 2003).

The plant-oomycete interactions: How does it work? Specialized hyphae called haustoria can be formed by the Oomycetes, which penetrate the plant cell walls allowing nutrients assimilation from the host cells. These structures also secrete a broad spectrum of effector proteins that enter cells and alter host defense responses and cell metabolism (Dodds, 2010). Same as other pathogens, the hosts are attacked by their oomycetes secreting an array of proteins collectively known as effectors, whose target is the molecules produced by the plant cells, altering their physiological processes, thus (Thines and Kamoun, 2010).

Studies on plant-pathogen interaction focus largely on studying avirulent genes (Avr) (Tyler, 2001). Genes for resistance and susceptibility in plants are complementary to genes that determine virulence and avirulence in pathogens (Madriz, 2002). Products detected by plants defense systems are codified by the Avr genes, specifically by receptors encoded by the resistance genes (R) of these.

If the products of the pathogen Avr genes are detected by the plant R genes, then the response to resistance is triggered. If the plant defense mechanisms are unable to detect the products of Avr genes, then plant becomes susceptible to be infected. It has been reported that many of the Oomycetes avirulence genes are clustered. It is suggested by such cluster that genes involved in the infection process can be in what would be called “pathogenicity islands” (Tyler, 2001).

The *Phytophthora* genus. The *Phytophthora* genus species are devastating plant pathogens in both agroecosystems and natural ecosystems (Blair *et al.*, 2008). The *Phytophthora* genus is responsible for some of the most serious diseases in plants (Schena and Cooke, 2006), such as soybean root rot (Tang *et al.*, 2011), tomato root rot (Quesada and Hausbeck, 2010), peeper wilt (Truong *et al.*, 2010), chile wilt (Ogundiwin *et al.*, 2005) and oak sudden death (Martin and Tooley, 2003). The interest in the genetics and genomics of these oomycetes has increased, due to its significant economic and environmental impact. Similarly, efforts to collect phenotypic and genotypic information of this kind have increased (Blair *et al.*, 2008).

The *Phytophthora* genus is currently classified in the Oomycota division, in the Peronosporal order and Phythiaceae family (Blair *et al.*, 2008). It is accepted that an intermediate position among the most primitive Oomycetes genera is occupied by the *Phytophthora* genus, such as *Saprolegnia*, *Achlya* and *Dictyuchus*, among others, which are saprophytic, aquatic and producers of zoosporangia, as well as *Albugo*, *Peronospora* and *Bremia*; these are the most “advanced” genus and phytopathogenetic obligate.

Most *Phytophthora* species are primary invasive of plant healthy tissues with limited saprophytic abilities, many of which are responsible for diseases of economically important vegetables or cause damage to natural ecosystems plant communities (Cooke *et al.*, 2000). The *Phytophthora* species, in traditional taxonomy, are identified primarily based upon their sporangia structure (without papillae, semipapillate or papillate), their antheridia position (amphigenous or paragenous), and, if the taxon is inbreeding

especies de *Phytophthora* son invasoras primarias de tejidos sanos de plantas con capacidad saprofitica limitada, muchas de las cuales son responsables de enfermedades de hortalizas de importancia económica o causantes de daños a las comunidades vegetales de los ecosistemas naturales (Cooke *et al.*, 2000). En la taxonomía tradicional, las especies de *Phytophthora* se identifican principalmente en base a la estructura de sus esporangios (sin papilas, semipapilados o papilados), la posición de sus anteridios (anfiginios o paráginos) y si el taxón es endogámico (homotálico) o exogámico (heterotálico) con dos tipos de compatibilidad sexual, o tipos de apareamiento, A1 y A2. Aunado a esto, se consideran otros factores como lo son las temperaturas óptimas de crecimiento y la patogenicidad (Blair *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2000). Las oosporas son consideradas como el principal propágulo de supervivencia del género *Phytophthora*. La germinación de las oosporas es influenciada por su edad, su nutrición, la temperatura y la luz. Si las condiciones ambientales son favorables, las oosporas germinan y desarrollan micelio o producen esporangios (Widmer, 2010). Muchas especies de *Phytophthora* son capaces de infectar un amplio rango de hospedantes, mientras que otras tiene un rango reducido (Blair *et al.*, 2008).

***Phytophthora capsici*.** En la actualidad, se utiliza la descripción original de Leonian (1922) para *P. capsici*, ya que la enmendada por Tsao y Alizadeh (1988) incluye aislados obtenidos de pimienta negra (*Piper nigrum*) y aislados de *P. palmivora* MF-4 que actualmente se encuentran ubicados dentro de *Phytophthora tropicalis*. Esta especie fue descrita por primera vez por Leonian en 1922 como el agente causal de la marchitez del chile (*Capsicum annuum*) en Nuevo México, y se consideró que era hospedante específica. Ahora se sabe que *P. capsici sensu lato* tiene un amplio rango de hospedantes y se distribuye mundialmente, causa enfermedades en especies vegetales tanto de regiones templadas como tropicales, crece a 35 °C (Gallegly y Hong, 2008; Erwin y Ribeiro, 1996). *P. capsici* es una especie heterotálica, forma estructuras sexuales (oogonios) en varios medios de cultivo cuando los tipos de compatibilidad A1 y A2 se aparean (Gallegly y Hong, 2008), siendo el tipo A1 el reportado como más virulento (Manohara *et al.*, 2004). Los oogonios son esféricos con anteridios anfiginios, que al ser fertilizados producen oosporas pleróticas. El tamaño de los órganos sexuales varía según el aislado o cepa. Los esporangióforos se encuentran en un simpodio simple en agua. Los esporangios son papilados y variables en forma y tamaño. Las formas más comunes de los esporangios son ovoide y elipsoide, con bases redondeadas; sin embargo, pueden presentarse formas irregulares, pedicelos laterales y papilas múltiples. El tamaño de los esporangios es de aproximadamente 57 x 32 µm con una relación de largo por ancho cercana a 1.8. Los esporangios son caducos y portan pedicelos típicamente largos. Generalmente no presentan hifas hinchadas o clamidosporas (Gallegly y Hong, 2008). El empleo de diversos marcadores moleculares ha evidenciado que *P. capsici* es una especie que presenta altos niveles de diversidad genética tanto intra como inter

(homothallic) or if they are exogamous (heterothallic) with two sexual compatibility types or mating types, A1 and A2, plus some other factors, such as optimal temperature for growth and pathogenicity (Blair *et al.*, 2008; Cooke *et al.*, 2000). Oospores are considered as the main survival propagules of *Phytophthora* genus. Oospores germination is influenced by age, nutrition, temperature and light. If environmental conditions are favorable, oospores either germinate and produce mycelia or produce sporangia (Widmer, 2010). Many *Phytophthora* species are able to infect a wide range of hosts, while others have a narrow range of infection (Blair *et al.*, 2008).

***Phytophthora capsici*.** The Leonian (1922) original description for *P. capsici* is currently used, since isolates obtained from black pepper (*Piper nigrum*) and *P. palmivora* MF-4 isolates, which are located within *Phytophthora tropicalis*, are included nowadays in the amended description reported by Tsao and Alizadeh (1988). This species was initially described by Leonian in 1922 as the chile wilt (*Capsicum annuum*) causal agent in New Mexico, and it was considered as a specific host. Now it is commonly known that *P. capsici sensu lato* has a wide host range and that it is distributed worldwide causing diseases in plant species of both temperate and tropical regions, growing at 35 °C (Gallegly and Hong, 2008; Erwin and Ribeiro, 1996). The *P. capsici* is an heterothallic species that forms sexual structures (oogonia) in several culture media as compatibility types A1 and A2 mate (Gallegly and Hong, 2008), being A1 the type reported as the most virulent (Manohara *et al.*, 2004). The oogonia are spherical with amphigenous antheridia that produce plethoric oospores when fertilized. The sexual organs size differs in accordance to the isolate or strain. The sporangiophores are in a simple sympod in water. Sporangia are papillate and variable in shape and size. The most common forms of sporangia are ovoid and ellipsoid with rounded bases; nonetheless, there may be irregularly shaped, with lateral pedicels, and multi-taste, as well. Sporangium size is approximately 57 x 32 microns with a length-width ratio close to 1.8. Sporangia are deciduous and typically carry long pedicels. Usually they do not have a swollen hyphae or chlamydo-spores (Gallegly and Hong, 2008). It has been shown by the use of molecular markers that *P. capsici* is a species with high genetic diversity levels both intra and interspecific, turning into one of the species with the highest variability within the *Phytophthora* genus (Truong *et al.*, 2010; Erwin and Ribeiro, 1996). It is possible to detect variability among isolates of different hosts and different geographic regions by analyzing the acid phosphates banding patterns generated by means of an isoelectric focus (Erselius and Vallavieille, 1984).

The *P. capsici* species has a high infectivity capacity and it disperses itself mainly by the soil through irrigation channels or due to heavy rain causing a splash on plants (Li *et al.*, 2007); it also has the ability to produce a polycyclic disease. This results into a high population dynamic in the United States, which often changes from a high genetic diversity at the beginning of the crops growing season to a few clonal lineages by the end. It is indicated by reports of the

específica, siendo una de las especies con mayor variabilidad dentro del género *Phytophthora* (Truong *et al.*, 2010; Erwin y Ribeiro, 1996). Al analizar los patrones de bandeado de fosfatasas ácidas generados por enfoque isoelectrónico es posible detectar variabilidad entre aislados de hospedantes distintos y diversas regiones geográficas (Erselius y Vallavieille, 1984).

P. capsici tiene una alta capacidad de infección y se dispersa principalmente por el suelo a través de los canales de riego o debido a lluvias que provocan un salpicado sobre las plantas (Li *et al.*, 2007). *P. capsici* tiene la capacidad para producir una enfermedad poli-cíclica. En Estados Unidos, esto resulta en una alta dinámica poblacional que con frecuencia cambia de una alta diversidad genética al principio de la temporada de crecimiento de los cultivos, a unos cuantos linajes clonales al final. Reportes de las poblaciones localizadas fuera de los Estados Unidos indican que las dinámicas poblacionales pueden ser diferentes dependiendo de la ubicación geográfica (Lamour, 2009). Este fitopatógeno puede infectar las raíces, flores, tallos, hojas y frutos del chile provocando el tizón foliar, la pudrición de frutos y la pudrición de raíz y tallo (Foster y Hausbeck, 2010a; Erwin y Ribeiro, 1996), en cualquier etapa de desarrollo de las plantas (Truong *et al.*, 2010). Las etapas iniciales de infección son biotróficas ya que a menudo no muestran síntomas. Dependiendo de la temperatura, existe un periodo de incubación de 24 h antes de que las primeras lesiones necróticas sean visibles. Aunque *P. capsici* es considerado como un patógeno del suelo, puede existir una abundante producción de zoosporas por encima del suelo. Frutos infectados pueden ser considerados como agentes de dispersión, ya que solamente requieren de lluvia o agua de riego para que ocurra una dispersión masiva de zoosporas (Lamour, 2009). Se ha observado en laboratorio que la dispersión de los esporangios de *P. capsici* ocurre en agua por fuerza capilar, pero no ocurre en respuesta al viento o la reducción de la humedad relativa. Estas observaciones en laboratorio y el muestreo volumétrico de esporas en campo, indican que la dispersión de esporangios por medio de corrientes de viento es infrecuente y que es poco probable que sean dispersados de manera natural entre los campos de cultivo por acción del viento únicamente (Granke *et al.*, 2009).

P. capsici ataca solanáceas como el chile, el tomate y la berenjena, y cucurbitáceas como el pepino, la calabaza, y el melón, alrededor del mundo (Lamour, 2009). Más de 50 especies de plantas han sido identificadas como hospederas de este oomycete (Quesada *et al.*, 2009; Gevens *et al.*, 2008a; Hausbeck y Lamour, 2004; Erwin y Ribeiro, 1996). Recientemente, se le ha encontrado atacando cultivos de habas (*Vicia faba*) y habichuelas (*Phaseolus lunatus*), plantas que previamente se había demostrado no eran hospedantes viables de este patógeno (Gevens *et al.*, 2008b; Davidson *et al.*, 2002). En muchas áreas, las epidemias más graves ocurren durante los meses cálidos y en la época de lluvias (Lamour, 2009), factores ambientales que favorecen el desarrollo de este oomycete. Este patógeno es responsable de grandes pérdidas a nivel mundial (Sy *et al.*, 2008). En muchas partes del mundo, *P. capsici* es el factor limitante de

populaciones located outside the United States that population dynamics may be different depending on their geographic location (Lamour, 2009). This plant pathogen can infect the roots, flowers, stems, leaves and chile fruit, causing leaf blight, fruit rot as well as root and stem rot (Foster and Hausbeck, 2010a; Erwin and Ribeiro, 1996), at any plant development stage (Truong *et al.*, 2010). The initial stages of infection are biotrophic, since they often reveal a lack of symptoms. Depending on temperature, there is a 24 h incubation period prior to the first visible necrotic lesions. Even though *P. capsici* is considered as a soil borne pathogen, there may be an abundant zoospore production above the ground. Infected fruit may be considered as dispersal agents, hence they only require rainfall or irrigation to occur massive zoospore dispersal (Lamour, 2009). It has been observed in *P. capsici* sporangia laboratory the dispersion takes place in water by capillary force, but it does not occur in response to wind or to relative humidity reduction. It is indicated by the laboratory analysis of these observations and the volumetric spore sampling in the field that sporangia dispersal by wind currents is rare and unlikely to be naturally dispersed among the fields only by wind (Granke *et al.*, 2009).

Solanaceae, such as chile, tomato and eggplant, as well as cucurbits, such as cucumber, squash, and melons around the world, are attacked by *P. capsici*. Over 50 plant species have been identified as hosts of this oomycete around the world (Quesada *et al.*, 2009; Gevens *et al.*, 2008a; Hausbeck and Lamour, 2004; Erwin and Ribeiro, 1996). Recently, it was found attacking fava bean (*Vicia faba*) and beans (*Phaseolus lunatus*), which are plants that it had just been previously revealed that they were not a viable host of this pathogen (Gevens *et al.*, 2008b; Davidson *et al.*, 2002).

The most severe epidemics occur, in many areas, during the warmer months and in rainy season (Lamour, 2009), which are environmental factors favoring this oomycete development. This pathogen is responsible of great losses worldwide (Sy *et al.*, 2008). The *P. capsici* species is the most important limiting factor in crop production in many parts of the world; nowadays is considered the most important plant factor in chile production (Ristaino and Johnston, 1999; Bosland and Lindsey, 1991) due to the fact that this pathogen can generate up to 80% production loss on the crop field.

There is currently no control measures which can fully protect a susceptible crop as environmental conditions, such as humidity and temperature, are favorable (Lamour, 2009), even though there have been efforts to develop new strategies for the proper management of this pathogen. It is difficult to control *P. capsici* because it can cause multiple syndromes by infecting roots, foliage and chile fruit (Oelke *et al.*, 2003). Practical culture, fungicides, fumigants, biological agents and resistant varieties are required for this pathogen control as part of an integrated management program (Foster and Hausbeck, 2010a). Nevertheless, cultural control methods, including crop rotation, have not proven effectiveness because of pathogen oospores resistance to desiccation, low temperatures, as well as other

producción vegetal más importante (Lamour, 2009), actualmente, se le considera el factor fitosanitario más importante en la producción de chile (Ristaino y Johnston, 1999; Bosland y Lindsey, 1991), ya que este patógeno puede producir pérdidas hasta del 80% en la producción en los campos de este cultivo (Li *et al.*, 2007).

Aunque se han hecho esfuerzos por desarrollar estrategias novedosas de manejo de este patógeno, actualmente no existen medidas de control que puedan proteger completamente a un cultivo susceptible cuando las condiciones ambientales como humedad y temperatura, son favorables (Lamour, 2009). *P. capsici* es difícil de controlar debido a que puede causar múltiples síndromes al infectar las raíces, follaje y frutos del chile (Oelke *et al.*, 2003). El control de este fitopatógeno requiere del uso de prácticas culturales, fungicidas, fumigantes, agentes biológicos y de variedades resistentes, todos como parte de un programa de manejo integrado (Foster y Hausbeck, 2010a). Si bien, los métodos de control cultural, incluyendo la rotación de cultivos, no han resultado ser efectivos debido a la resistencia de las oosporas de este patógeno a la desecación, a las bajas temperaturas y a otras condiciones ambientales desfavorables, así como a su capacidad para sobrevivir en el suelo durante años aún en la ausencia de plantas hospederas (Kim y Kim, 2009). El control químico es poco efectivo en los cultivos de chile (Miller *et al.*, 2002; Goldberg, 1995). La resistencia o tolerancia de *P. capsici* a diversos fungicidas ha sido reportada tanto en el laboratorio como en condiciones de campo (Foster y Hausbeck, 2010b; Silva *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2003). Las estrategias alternativas, tales como el uso de cultivares genéticamente resistentes, prometen ser las más redituables y amigables con el ambiente. Sin olvidar que periodos prolongados de incubación o altas concentraciones de inóculo de *P. capsici* pueden sobreponerse a la resistencia, resultando en la manifestación de síntomas en algunas plantas resistentes (Kim y Kim, 2009).

Solamente el chile serrano CM-334 ha mostrado una resistencia universal a los aislados de este oomycete (Glosier *et al.*, 2008, Oelke *et al.*, 2003). No existe un consenso sobre la genética que gobierna la respuesta de resistencia. Algunos loci de caracteres cuantitativos (QTL) han sido mapeados, y en estos estudios se ha determinado que la herencia a la resistencia es multigénica (Ogundiwin *et al.*, 2005). Se determinó que seis regiones de los cromosomas cuatro, cinco, seis, 11 y 12 están involucradas en cierta medida en la resistencia (Thabuis *et al.*, 2003). Diferentes partes de la planta de chile pueden ser infectadas por *P. capsici*, por lo que cada parte infectada puede ser considerada como un síndrome distinto, y la resistencia a cada uno de los síndromes es controlada por genes distintos (Oelke *et al.*, 2003). En la actualidad, el CM-334, un chile criollo procedente del estado de Morelos, México (Guerrero y Laborde, 1980), es la fuente principal de resistencia a la marchitez de raíz utilizado en los programas de mejora genética de chile (Thabuis *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 1991). Este chile posee el nivel más alto de resistencia conocido, y ha demostrado ser resistente a varios aislados de *P. capsici* de diferentes hospedantes y regiones geográficas (Sy *et al.*,

adverse environmental conditions and their ability to survive in soil for years, even in the absence of host plants (Kim and Kim, 2009). Chemical control is ineffective in chile crops (Miller *et al.*, 2002, Goldberg, 1995). Resistance or tolerance of *P. capsici* various fungicides has been reported both in the laboratory and in field conditions (Foster and Hausbeck, 2010b; Silva *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2004, Perez *et al.*, 2003). Alternative strategies such as the use of genetically resistant cultivars, promise to be the most cost-effective and environmentally friendly. Without forgetting that extended periods of incubation and inoculum concentrations of *P. capsici* can overcome resistance, resulting in the manifestation of symptoms in some resistant plants (Kim and Kim, 2009).

Only the CM-334 serrano chile has shown a universal resistance to this oomycete isolates (Glosier *et al.*, 2008, Oelke *et al.*, 2003). There is no consensus concerning genetics ruling the resistance response. Some quantitative trait loci (QTL) were mapped and it was determined by such studies that resistance inheritance is multi-genetic (Ogundiwin *et al.*, 2005). It was determined as well that six regions from chromosomes four, five, six, 11 and 12 are involved, to some degree, in the resistance (Thabuis *et al.*, 2003). Different parts of the chile plant can be infected by *P. capsici*, so that each infected part can be regarded as a distinct syndrome; resistance to each one of these syndromes is controlled by different genes (Oelke *et al.*, 2003). Currently, the CM-334, a native chile from the state of Morelos, Mexico (Guerrero and Laborde, 1980), is the main source of resistance to root wilt used in programs for chile genetic improvement (Thabuis *et al.*, 2003; Gil *et al.*, 1991). This chile has the highest known resistance, and it has proven itself to be resistant to several *P. capsici* isolates from different hosts and geographical regions (Sy *et al.*, 2008). It is only through the intervention of a second plant pathogen, the *Nacobus aberrans* nematode, that CM-334 resistance to *P. capsici* is lost (Vargas *et al.*, 1996). Nematode species have the ability to induce cell reprogramming and, hence, an alteration in gene expression host. Such induced changes may alter the plants defense mechanisms thus making them susceptible to fungal pathogens to which, under normal conditions, are resistant (Zavaleta, 2002). A decrease in the enzymatic activity of both phenylalanine ammonia lyase (PAL) and peroxidase, as well as a reduced concentration of total soluble phenols and chlorogenic acid are some of the changes produced by *N. aberrans* in CM-334 root system (López *et al.*, 2011; Godinez *et al.*, 2008).

What makes a chile cultivar resistant to *P. capsici*?

Plants have a number of defense mechanisms against pathogens. Both pre-formed and induced defense exist. Peptides, proteins and non-proteinaceous secondary metabolites are among the pre-formed mechanisms (Heath, 2000). Plants defense mechanisms are induced by different pathogen compounds; the pathogen products producing this response are known as elicitors, which trigger transduction signals leading to gene activation in plants defense (Laxalt and Munnik, 2002). Some of the responses induced are the phenolic compounds peroxidative union, the substances

2008). Es sólo con la intervención de un segundo fitopatógeno, el nematodo *Nacobus aberrans*, que la resistencia de CM-334 a *P. capsici* se pierde (Vargas *et al.*, 1996). Los nematodos agalladores tienen la capacidad para inducir una reprogramación celular y, por lo tanto, una alteración en la expresión génica del hospedante. Estos cambios inducidos pueden alterar los mecanismos de defensa de las plantas haciéndolas así susceptibles a hongos fitopatógenos ante los cuales, en condiciones normales, son resistentes (Zavaleta, 2002). Dentro de los cambios que *N. aberrans* produce en el sistema radicular del CM-334, se encuentra una disminución en la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasa (POD), así como una disminución de la concentración de fenoles solubles totales y de ácido clorgénico (López *et al.*, 2011; Godínez *et al.*, 2008).

¿Qué hace a un cultivar de Chile resistente a *P. capsici*? Las plantas poseen una serie de mecanismos de defensa contra los fitopatógenos. Existen defensas preformadas e inducidas. Entre las preformadas se encuentran péptidos, proteínas y metabolitos secundarios no proteicos (Heath, 2000). Diferentes compuestos producidos por patógenos inducen los mecanismos de defensas de las plantas. Los productos de patógenos que producen esta respuesta son conocidos como elicitores. Los elicitores desencadenan cascadas de señales de transducción lo cual lleva a la activación de los genes de defensa de las plantas (Laxalt y Munnik, 2002). Entre las respuestas inducidas se encuentra la unión peroxidativa de compuestos fenólicos, la deposición de sustancias como el sílice y la formación de papilas con calosa en la pared celular, la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la respuesta hipersensible (HR), una muerte programada y acelerada de las células que se encuentran en el sitio de infección del patógeno (Heath, 2000), así como la respuesta sistémica adquirida (SAR); (Maleck y Dietrich, 1999).

La respuesta SAR se induce en las plantas como consecuencia del ataque de fitopatógenos. Una vez activada SAR, las plantas comienzan a expresar una serie de genes relacionados con la patogénesis tanto a nivel local del ataque como en toda la planta (Maleck y Dietrich, 1999). En muchas plantas, SAR es precedida por la acumulación sistémica de ácido salicílico (SA). Algunos genes relacionados con la patogénesis responden al SA y son inducidos por el etileno y el ácido jasmónico (JA), mientras otros son inducidos por el etileno y el JA, pero no responden al SA. Estas moléculas señalan y regulan la expresión diferencial de los diferentes conjuntos de genes relacionados con la patogénesis (Pozo *et al.*, 2005; Maleck y Dietrich, 1999).

La compatibilidad o incompatibilidad de las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar en plantas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento genético, los denominados cultivares. Una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran resistencia y otros que muestran susceptibilidad a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas tanto virulentas como avirulentas para un

deposición, such as silica, the papillae formation with callose in the cell wall, accumulation of oxygen reactive species, the hypersensitive response (HR), a programmed death and acceleration of the cells found at the pathogen infection site (Heath, 2000), as well as the systemic acquired response (SAR) (Maleck and Dietrich, 1999).

The SAR response is induced in plants as a consequence derived from the attack of pathogens. Once SAR is activated, a number of pathogenesis-related genes start to be expressed by the plants as it is attacked both locally and throughout the plant (Maleck and Dietrich, 1999). The SAR is preceded by a salicylic acid systemic accumulation (SA) in many plants. Some pathogenesis-related genes respond to SA, and are induced by ethylene and jasmonic acid (JA), while others, which are induced by ethylene and JA, do not respond to SA. The differential expression of different set of genes related to pathogenesis is regulated by these signal molecules (Pozo *et al.*, 2005; Maleck and Dietrich, 1999).

The compatibility or incompatibility plant pathogens interactions depend on both the plant genotype and the pathogen. This specificity is more easily studied in plants that have undergone a process of genetic improvement; these are called cultivars. A host species may present cultivars showing resistance and others showing susceptibility to a given pathogen, which it can also present both virulent and avirulent races for a given cultivar. It is common, as a result derived from such process, that new physiological races appear specific for each cultivar because of the selection pressure being exerted on these (Madriz, 2002).

Physiological races are classified in accordance to the reactions originated by a pathogen on a number of cultivars, which is known as differential host (Oelke *et al.*, 2003). A set of differential hosts is composed of multiple hosts lines that one or more pathogen resistant genes. The existence of physiological races in the *Capsicum annum-Phytophthora capsici* pathosystem has been indicated by recent studies, which means that the lines of chiles that have been developed against a wide range of *P. capsici* need to be tested by plant breeders. The development of Chile lines resistant to *P. capsici* is difficult and quite complex, due to the existence of different physiological races of this plant pathogen (Sy *et al.*, 2008).

Some Chile cultivars resistance to *P. capsici* depends on inoculum concentration, as well as on the stage of plant development and temperature, whereas CM-334 resistance does not rely on such factors (Palloix *et al.*, 1988). Several studies on Chile plants (*C. annum*) susceptibility or tolerance to different *P. capsici* isolates have been performed (Monroy and Bosland, 2011; Foster and Hausbeck, 2010a; Glossier *et al.*, 2008; Sy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Oelke *et al.*, 2003; Ristaino, 1990); however, there is still a lack of a full comprehension regarding what makes a cultivar either resistant to infection or not.

It has been reported by Chile producers in New Mexico that the Chile wilt symptoms caused by *P. capsici* seemed to grow more slowly and with a lower incidence on Chile cultivars with a high pungency level. Therefore, the

cultivar determinado. Es común que como resultado de este proceso aparezcan nuevas razas fisiológicas específicas para cada cultivar, debido a la presión de selección que se está ejerciendo sobre estas (Madriz, 2002).

Las razas fisiológicas son clasificadas en base a las reacciones que origina un patógeno sobre una serie de cultivares, lo que es conocido como un hospedante diferencial (Oelke *et al.*, 2003). Un conjunto de hospedantes diferenciales está compuesto de varias líneas de hospedantes que poseen uno o más genes de resistencia a un patógeno. Estudios recientes han indicado la existencia de razas fisiológicas en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*, lo cual implica que los fitomejoradores necesitan probar las líneas de chiles que han desarrollado contra un amplio rango de aislados de *P. capsici*. Desarrollar líneas de chile resistentes a *P. capsici* es difícil y complejo debido a la existencia de diversas razas fisiológicas de este fitopatógeno (Sy *et al.*, 2008).

La resistencia a *P. capsici* de algunos cultivares de chile es dependiente de la concentración de inóculo, etapa de desarrollo de las plantas y la temperatura. Mientras que en CM-334, la resistencia es independiente de estos factores (Palloix *et al.*, 1988). Se han realizado diversos estudios sobre la susceptibilidad o tolerancia de las plantas de chile (*C. annum*) a diferentes aislados de *P. capsici* (Monroy y Bosland, 2011; Foster y Hausbeck, 2010a; Glossier *et al.*, 2008; Sy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Oelke *et al.*, 2003; Ristaino, 1990). Pero, aún no existe una comprensión clara de que hace a un cultivar resistente, o no, para ser infectado.

Los productores de chile de Nuevo México reportaron que los síntomas de marchitez de chile causada por *P. capsici* parecían desarrollarse más lentamente y con menor incidencia en cultivares de chile con elevada pungencia. Por este motivo se evaluó la resistencia de chiles pungentes (TAM-Jalapeño, Cayenne y XX-Hot) y poco pungentes (NuMex Joe E. Parker y New Mexico 6-4). Los resultados indicaron que existe poca relación entre el nivel de pungencia, dado por el contenido de capsicinoides en los frutos, y la susceptibilidad a la pudrición de raíz y de fruto producida por este fitopatógeno (Tahboub *et al.*, 2008). No se encontró algún efecto *in vivo* del contenido de capsicinoides sobre la capacidad del patógeno para colonizar los tejidos del fruto.

Se ha estudiado el efecto del capsidiol, una fitoalexina de naturaleza sesquiterpenoide con propiedades antimicrobianas presente en las plantas de chile, sobre el desarrollo de *P. capsici* en los tejidos de cultivares inoculados con este fitopatógeno. En un ensayo, Molot *et al.* (1981) encontraron que al momento de la inoculación se manifiesta una acumulación de esta fitoalexina en los tejidos infectados, y su cinética es similar para plantas de chile susceptibles y no susceptibles. Al no encontrar relación entre la concentración de capsidiol y la inhibición del crecimiento del patógeno, sugirieron que el capsidiol no es el principal mecanismo de defensa que confiere la resistencia a este fitopatógeno. Por otra parte, Turelli *et al.* (1984) estudiaron los mecanismos por los cuales el capsidiol inhibe el crecimiento micelial de este oomiceto *in vitro*. Esta fitoalexina puede provocar un decremento del 50% del

resistencia of pungent (TAM-Jalapeño, Cayenne and XX-Hot) and slightly pungent chile (NuMex Joe E. Parker and New Mexico 6-4) became evaluated. A lack of a strong relation between the pungency level given by the fruit capsaicinoids content and the susceptibility to root rot and fruit produced by this plant pathogen was revealed by the results hereby (Tahboub *et al.*, 2008). No capsaicinoid content effect *in vivo*, on the pathogen capacity to colonize the fruit tissue, was revealed.

The capsidiol effect, a phytoalexin of sesquiterpenoid nature with antimicrobial properties present in chile plants on *P. capsici* development in cultivars inoculated with this plant pathogen, has been studied. It was shown in an essay reported by Molot *et al.* (1981) that at the moment of inoculation, an accumulation of this phytoalexin appears in infected tissues, and that its kinetics is very similar for both susceptible and none susceptible chile plants. Since there was no relation between the capsidiol and pathogen growth inhibition, it was suggested that capsidiol is not the main defense mechanism conferring resistance to this phytopathogen. Moreover, the inhibiting mechanisms by which the mycelia growth of this oomicete *in vitro* becomes inhibited by capsidiol were studied by Turelli *et al.* (1984). A 50% decrease of the *P. capsici* membranes protein content after inoculation, as well as a 33% loss of their phospholipids may be caused by this phytoalexin with a subsequent detachment of several neutral lipids. This capsidiol ability to permeabilize the membranes as it sets itself directly in contact with the pathogen *in vitro* is considered as the biochemical mechanism by which it participates in chile plants defense against this pathogen. As for *in vivo* studies, the capsidiol ability to inhibit *P. capsici* growth in the resistant cultivar Smith-5, which produces 5.1 mM of this phytoalexin in the stem tissues inoculated with this pathogen after six inoculation days, has been demonstrated (Egea *et al.*, 1996a). Capsidiol accumulates itself in the tissue of every chile plant as it is inoculated with *P. capsici*, but significant differences prevail depending on the cultivar and in the histological study area (Egea *et al.*, 1996b). It has been reported that capsidiol production in *P. capsici* infected tissue is increased by matalxyl application (Hwang and Sung, 1989). Capsidiol works as a fungistatic at a 3.75 mM media concentration, being fungitoxic at levels above 5 mM (Egea *et al.*, 1996a). A capsidiol concentration generated in infected tissue has been used as a marker of *P. capsici* resistance in programs of genetic improvement (Candela *et al.*, 2000). A higher protection against chile wilt caused by *P. capsici* has been related with chile plant inoculation by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Ozgonen and Erkilic, 2007).

The behavior of two phytohormones, SA and JA, was evaluated in the interaction among CM-334 and *P. capsici* leaves, and compared with the interaction between this plant and a susceptible cultivar, the California Wonder. The JA was increased immediately after being inoculated with the pathogen. As JA levels eventually decreased, SA levels increased and, subsequently, a cellular death was revealed mediated by a hypersensitive response (HR). The catalase mRNA and POD, HR generation suppressors disappeared,

contenido proteico en las membranas de *P. capsici* tras la inoculación y una pérdida del 33% de los fosfolípidos de las mismas, con un desprendimiento subsecuente de lípidos neutros diversos. Esta capacidad del capsidiol para permeabilizar las membranas al ponerlo en contacto directo con el patógeno *in vitro*, es considerado el mecanismo bioquímico por el cual participa en la defensa de las plantas de Chile ante este fitopatógeno. En cuanto a estudios *in vivo*, se ha evidenciado la capacidad del capsidiol para inhibir el crecimiento de *P. capsici* en el cultivar resistente Smith-5, el cual produce 5.1 mM de esta fitoalexina en los tejidos del tallo inoculados con este patógeno a los seis días de incubación (Egea *et al.*, 1996a). El capsidiol se acumula en los tejidos de todas las plantas de Chile al ser inoculadas con *P. capsici*, pero existen diferencias significativas dependiendo del cultivar y de la zona histológica estudiada (Egea *et al.*, 1996b). Se ha reportado que la aplicación de metalaxyl incrementa la producción de capsidiol en tejidos infectados por *P. capsici* (Hwang y Sung, 1989). El capsidiol funciona como fungistático a una concentración media de 3.75 mM, y es fungitóxico a niveles por encima de 5 mM (Egea *et al.*, 1996a). Se ha utilizado la concentración de capsidiol generado en tejidos infectados como marcador de resistencia a *P. capsici* en programas de mejora genética (Candela *et al.*, 2000). La inoculación de plantas de Chile con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) puede incrementar los niveles basales de capsidiol en los tejidos de las plantas, lo cual se ha relacionado con una mayor protección contra la marchitez de Chile causada por *P. capsici* (Ozgonen y Erkilic, 2007).

Se evaluó el comportamiento de dos fitohormonas, el SA y el JA, en la interacción entre las hojas de CM-334 y *P. capsici*, y se comparó con la interacción entre este fitopatógeno y un cultivar susceptible, el California Wonder. El JA se incrementó en el cultivar resistente inmediatamente después de ser inoculado con el patógeno. Conforme los niveles de JA disminuyeron con el paso del tiempo, los niveles de SA aumentaron y subsecuentemente se presentó una muerte celular mediada por una respuesta hipersensible (HR). Los mRNA de catalasa y POD, supresores de la generación de la HR, desaparecieron, mientras que mRNA de 12-oxo-ácido fitodienoico reductasa (OPR3) fueron detectados en el CM-334 específicamente. Los mecanismos de defensa mediados por el JA parecen ser cruciales para la resistencia de las plantas de Chile contra *P. capsici*. La aparición temprana de JA y la subsecuente acumulación de SA tras la inoculación sugiere que ambas fitohormonas juegan papeles separados en la respuesta de defensa (Ueeda *et al.*, 2006).

Existen diversos cambios histológicos y citológicos en plantas de Chile al ser inoculadas con *P. capsici*. Las paredes de las células hospedantes adyacentes a las hifas del patógeno son parcialmente degradadas y estructuralmente debilitadas, probablemente debido a la acción de enzimas. En las plantas de Chile resistentes, el patógeno se mantiene en la superficie de la epidermis de la raíz, atrapado en los exudados radicales compuestos de proteínas y polisacáridos. También se observa un engrosamiento de la lamela media entre las células epidermales y corticales, un

while the mRNA of 12-oxo phytodienoic acid reductase (OPR3) were detected in CM-334, specifically. The defense mechanisms mediated by JA seem to be crucial for plants resistance against *P. capsici*. It is suggested by JA early appearance and subsequent SA accumulation after inoculation that a different role is played by both phytohormones in the defense response (Ueeda *et al.*, 2006).

There are several histological and cytological changes in Chile plants when inoculated with *P. capsici*. The host cell walls adjacent to the pathogen hyphae are partially degraded and structurally weakened, probably due to enzymatic action. The resistant pathogen in Chile plants is retained in the root epidermis surface, trapped in the radical exudates made out of proteins and polysaccharides. A thickening of the middle lamella between the epidermal and cortical cells, a plant mechanism to stop infection by preventing epidermis hyphae penetration towards the cortex, is also observed. One of the most prominent structural features in the resistant plants is the formation of hyphae coupled cell walls apposition. There is a difference in disease development suppression in Chile resistant plants stems and roots, probably due to a lack of exudates in the stems. It is suggested that the response in resistant Chile are more discriminative in the roots than in the aerial parts of the plant, thus (Kim and Kim, 2009).

The oxidative stress degree present in this plant-pathogen interaction has also been evaluated. An 87% increase in tissue peroxide levels has been observed after *P. capsici* plants inoculation. The enzyme presenting a higher activity increase during this process is the catalase, showing a 114% increase in plant stems. The ascorbate peroxidase activity levels decline in the interaction. The POD levels remain constant from the early hours until the fifth day, showing a 54 and 90% increase in stems and leaves, respectively.

It is suggested by this that a substantial increase in oxidative stress, probably as a direct consequence of a progressive decline in enzyme systems responsible for reactive oxygen species (ROS) catabolism (Gayoso *et al.*, 2004) is involved by the interaction in this pathosystem. Furthermore, there is evidence that Chile plants colonized by AMF are capable of better preserving the oxide-reductive balance during the oxidative stress generated by *P. capsici* (Alejo *et al.*, 2008).

The PAL activity, the rate levels of hydrogen peroxide lipid peroxidation (H_2O_2), proline and *P. capsici* zoospores inoculating Chile plants total protein were evaluated in another study performed by Koç *et al.* (2011). An early induction of PAL, an enzyme involved in phytoalexins synthesis, which are phenolic compounds, and the lignin biosynthesis in infected Chile leaves within the first two days after inoculation were reported. The PAL activity is higher in resistant cultivars. Also, ROS production and lipid peroxidation are increased in Chile leaves as time went by after infection and inoculum concentration. Cultivars resistant to this oomycete seemed to be better protected against lipid peroxidation. Moreover, a significant increase of the proline content in inoculated Chile leaves was observed. This amino acid has antioxidant

mecanismo de la planta para detener la infección al prevenir la penetración de las hifas de la epidermis hacia el córtex. Una de las características estructurales más prominentes en las plantas resistentes es la formación de aposiciones de la pared celular unidas a hifas. Existe una diferencia en la supresión del desarrollo de la enfermedad en los tallos y las raíces de las plantas de Chile resistentes, esto probablemente debido a la ausencia de exudados en los tallos. Esto sugiere que las respuestas en Chile resistentes son más discriminativas en las raíces que en las partes aéreas de la planta (Kim y Kim, 2009).

También se ha evaluado el grado de estrés oxidativo presente durante esta interacción planta-patógeno. Después de la inoculación de las plantas de Chile con *P. capsici* se ha visto un incremento del 87% en los niveles de peróxido en los tejidos. La enzima que presenta un mayor aumento en su actividad durante este proceso es la catalasa, mostrando un incremento del 114% en los tallos de las plantas. Los niveles de actividad de la ascorbato peroxidasa disminuyen durante la interacción. Los niveles de POD se mantienen constantes desde las primeras horas hasta el quinto día mostrando un incremento del 54 y 90% en tallos y hojas, respectivamente. Esto sugiere que la interacción en este patosistema lleva consigo un incremento sustancial en el estrés oxidativo, probablemente como consecuencia directa de un declive progresivo en los sistemas enzimáticos responsables del catabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gayoso *et al.*, 2004). Existe evidencia de que plantas de Chile colonizadas por HMA son capaces de mantener mejor el balance óxido-reductor durante el estrés oxidativo generado por el ataque de *P. capsici* (Alejo *et al.*, 2008).

En otro estudio Koç *et al.*, (2011) evaluaron la actividad de PAL, la tasa de peroxidación lipídica, los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), prolina y de proteína total en plantas de Chile inoculadas con zoosporas de *P. capsici*. Reportaron una inducción temprana de PAL, enzima involucrada en la síntesis de fitoalexinas, compuestos fenólicos y la biosíntesis de lignina, en hojas de Chile infectadas dentro de los primeros dos días después de la inoculación. La actividad de PAL es mayor en los cultivares resistentes. Además, la producción de ROS y la peroxidación de lípidos se incrementaron en las hojas de Chile conforme transcurrió el tiempo después de la infección y la concentración del inóculo. Los cultivares tolerantes a este oomycete parecen estar mejor protegidos contra la peroxidación lipídica. También observaron que el contenido de prolina en hojas de Chile inoculadas aumenta significativamente. Este aminoácido posee propiedades antioxidantes y es posible que su acumulación sea un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo ocasionado por la infección del patógeno.

Aunado a esto, se ha estudiado la actividad de la peroxidasa y la biosíntesis de lignina en cultivos de células en suspensión de Chile con diferente susceptibilidad a *P. capsici* elicitados con micelio liofilizado o filtrado del medio en que creció el patógeno. Estas células mostraron la síntesis o acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) con actividad de peroxidasa (EC

properties, and it is possible that their accumulation derives from a protection mechanism against oxidative stress caused by pathogen infection.

The peroxidase activity and lignin biosynthesis in cell suspension of Chile cultures with different *P. capsici* susceptibility, lyophilized mycelium elicited or filtered from the medium that the pathogen grew in, has also been studied. The synthesis or pathogenesis-related protein accumulation (PR proteins) with peroxidase activity (EC 1.11.1.7), as well as a polymer accumulation similar to lignin measured by thioglycolic acid derivatization was revealed by these cells. A more intense response to elicitors than the American and Yolo Wonder evaluated sensitive varieties was revealed by the Smith 5 resistant variety. Furthermore, the total peroxidase level was reduced by the elicitation in susceptible varieties, whereas such activity increased in the resistant variety, being accompanied by the peroxidase isoenzymes acidic *de novo* expression. A PR protein with a 5.7 pI with peroxidase activity was induced by the elicitors only in the resistant variety, turning it into a resistant marker candidate, thus (Egea *et al.*, 2001). The peroxidase activity (POD; EC 1.11.1.7) was reported by Jung *et al.* (2004b) along with the polyphenol oxidase (PPO; EC 1.14.18.1), the two enzymes involved in Chile plants leaves lignification when inoculated with *P. capsici* zoospores. Seven days after inoculation, 36.7% increase in PPO activity was revealed in pathogen inoculated root plants. Regarding PPO activity, there was an increase activity of this enzyme three days after inoculation, with remarkable subsequent decrease. An activity reduction is revealed from this enzyme by the seventh day in the inoculated leaves. It is suggested by the rapid increase and subsequent decrease in PPO activity that this enzyme is involved in an early response to pathogen invasion.

Experiments to determine the relationship between Chile fruit susceptibility to rot by *P. capsici* and fruit maturity have been performed. Fruit susceptibility to infection is decreased as the maturation stage is increased. The red fruit cuticle is thicker in the green fruits, which seems to be a relevant factor in resistance to *P. capsici*. Such fruit cuticle thickening is favored by an increase in the peroxidase activity as it increases its maturity; the peroxidases are contributing enzymes to lignin-like compounds polymerization, which increase the barrier to infection (Biles *et al.*, 1993).

There is a genes differential expression related to defense mechanisms in Chile cultivars with different degrees of resistance to *P. capsici* after being inoculated with this phytopathogen. Such differential expression in the encoding genes for a basic PR protein (CABPR1), a β -1, 3-bisecting glucanase (CABGLU), a peroxidase (CAPO1) and a cyclase sesquiterpene (CASC1) have been previously reported. These genes mRNA levels are remarkably increased at 24 h post-inoculation, having a maximum induction of the genes responsible for PR-1 and cyclase sesquiterpene. Four genes expression levels were different among Chile genotypes. The PR-1, peroxidase and cyclase sesquiterpene genes were always expressed at higher levels in resistant cultivars than in susceptible (Silvar *et al.*, 2008).

1.11.1.7) y la acumulación de un polímero similar a lignina medido por medio de la derivatización del ácido tioglicólico. La variedad resistente, Smith-5, mostró una respuesta más intensa a los elicitors que las variedades sensibles evaluadas, Americano y Yolo Wonder. Además, la elicitación redujo el nivel de actividad total de la peroxidasa en las variedades susceptibles, mientras que dicha actividad aumentó en la variedad resistente y estuvo acompañada por la expresión *de novo* de isoenzimas ácidas de la peroxidasa. Una proteína PR con pI de 5.7 con actividad de peroxidasa, fue inducida por los elicitors solamente en la variedad resistente, haciéndola candidata a ser un marcador de resistencia (Egea *et al.*, 2001).

Jung *et al.* (2004b) reportaron la activación de la peroxidasa (POD; EC 1.11.1.7) y la polifenol oxidasa (PPO; EC 1.14.18.1), dos enzimas involucradas en la lignificación, en hojas de plantas de Chile, al ser inoculadas con zoosporas de *P. capsici*. A los siete días después de la inoculación, se encontró un aumento del 36.7% en la actividad de la POD en las raíces de las plantas inoculadas con el patógeno. En cuanto a la actividad de la PPO, en las raíces hubo un incremento en la actividad de esta enzima durante tres días tras la inoculación, con una subsecuente disminución marcada. Al séptimo día existió una reducción en la actividad de esta enzima en las hojas inoculadas. El rápido incremento y posterior disminución de la actividad de la PPO parece indicar que esta enzima se encuentra involucrada en la respuesta temprana a la invasión del patógeno.

Se han realizado experimentos para determinar la relación entre la susceptibilidad de los frutos de Chile a la pudrición por *P. capsici* y la madurez de los frutos. La susceptibilidad de los frutos a la infección disminuye conforme aumenta el estado de maduración. La cutícula de los frutos rojos es de mayor grosor que la de los frutos verdes, y esto parece ser un factor en la resistencia a *P. capsici*. Este engrosamiento de la cutícula de los frutos rojos se ve favorecida por un aumento en la actividad de peroxidases conforme aumenta su maduración, enzimas que contribuyen a la polimerización de compuestos similares a lignina los cuales incrementan la barrera a la infección (Biles *et al.*, 1993).

Existe una expresión diferencial de los genes relacionados con los mecanismos de defensa en cultivares de Chile con diferentes grados de resistencia a *P. capsici* tras ser inoculados con este fitopatógeno. Se ha reportado dicha expresión diferencial en los genes que codifican para una proteína PR-1 básica (CABPR1), una β -1,3-glucanasa básica (CABGLU), una peroxidasa (CAPO1) y una sesquiterpeno ciclasa (CASC1). Los niveles de mRNA de estos genes incrementan de manera marcada a las 24 h post-inoculación, observándose una inducción máxima de los genes responsables de la PR-1 y la sesquiterpeno ciclasa. Los niveles de expresión de los cuatro genes fueron diferentes entre los genotipos de Chile. Los genes de la PR-1, la peroxidasa y la sesquiterpeno ciclasa siempre se expresan en mayor nivel en los cultivares resistentes que en los susceptibles (Silvar *et al.*, 2008).

Se ha estudiado la acumulación diferencial de

The PR protein differential accumulation in Chile plants stems Habyul cultivar, *P. capsici* inoculated, has been studied. The β -1, 3-glucanases accumulation is better identified in incompatible interactions. The chitinases accumulation is very similar in compatible and incompatible interactions, having a slightly higher enzymatic activity in incompatible interactions.

Regarding β -1, 3-glucanases, two acidic isoforms, Ga1 and Ga2, have been reported. It is suggested from these that the Ga2 isoform with a 4.8 pI, could be associated with resistance to *P. capsici*, since their high activity is only detected in incompatible interactions three to four days after inoculation (Kim and Hwang, 1994). The basic β -1, 3-glucanase CABGLU encoding gene was expressed in *P. capsici* Chile plant stems inoculated by greater amounts in compatible interactions. The CABGLU mRNA was expressed constitutively in Chile plant roots (Jung and Hwang, 2000).

Additionally, the chitinase mRNA induction (CACHi2) was revealed in *P. capsici* inoculated Chile stems at 6 h post inoculation; the expression level was increased gradually in incompatible interactions. The chitinase transcripts induction was further detected. This enzyme transcript was located in the vascular tissues, and its expression became restricted to cells associated with the phloem. It is inferred that an initial role in limiting the pathogen growth is performed by these extracellular chitinases (Lee *et al.*, 2000).

The role played by the defense mechanism utilized is not known in all cases. As an instance, it has been reported that the CALRR1 gene (*C. annuum* Leucine-Rich Repeat protein 1) [accession numbers: AF082727 (EST clone), AY237117 (full length cDNA)], which codes for a leucine rich repeats protein (LRR) and it is expressed in Chile when inoculated with *P. capsici*, is secreted to leaves, stems and fruit phloem. It is known that LRR proteins function in several signal transduction pathways plays a major role in protein-protein interactions mediation (Jung *et al.*, 2004a).

The expression profiles of New Mexico 6-4 (NM6-4) Chile plants, a susceptible line, were assessed by Richins *et al.* in 2010; CM-334 and 01C 1688 were resistant lines developed as a backcross with CM-334 and the *C. annuum* cv. Early Jalapeno at 0, 4 and 24 h post-inoculation. A total of 87 genes differentially expressed in response to inoculation were revealed for CM-334. A total of 207 genes were revealed as well in the CM-334 susceptible line with a differential expression after inoculation, where a decrease in genetic expression at 24 h was observed.

A total of twenty two genes were uniquely expressed only in the resistant lines; out of those, 19 seemed to be induced in response to *P. capsici*, whereas three appear to be repressed. It is presumed that the alleles for these genes in CM-334 are different either in their coding or in their promoter regions. A gene transcription for a cellular membrane protein (RR58-41) was induced in a unique manner on the lines resistant to *Phytophthora*. The function of this cell membrane protein is unknown.

At the same time that the defense mechanisms in CM-334 are being studied, research on the possibility to

proteínas PR en tallos de plantas de chile, cultivar Habyul, inoculadas con *P. capsici*. La acumulación de β -1,3-glucanasas es más pronunciada en interacciones incompatibles. La acumulación de quitinasas es similar en interacciones compatibles e incompatibles, siendo la actividad enzimática ligeramente mayor en las interacciones incompatibles. Con respecto a las β -1,3-glucanasas, se han reportado dos isoformas ácidas Ga1 y Ga2. De estas, se sugiere que la isoforma Ga2, con pI de 4.8, podría estar asociada con la resistencia a *P. capsici* dado que su elevada actividad es detectada solamente en interacciones incompatibles a los tres a cuatro días después de la inoculación (Kim y Hwang, 1994). El gen CABGLU que codifica para una β -1,3-glucanasa básica, se expresó en tallos de plantas de chile inoculadas con *P. capsici* en mayor cantidad en interacciones compatibles que en interacciones incompatibles. El mRNA de CABGLU se expresa de manera constitutiva en las raíces de las plantas de chile (Jung y Hwang, 2000). Adicionalmente, en tallos de chiles inoculados con *P. capsici* se evidenció la inducción del mRNA de la quitinasa (CACHi2) a las 6 h post inoculación y el nivel de expresión aumentó de manera gradual en interacciones incompatibles. En las compatibles, la inducción de los transcritos de quitinasa se detectó de manera más tardía. El transcrito de esta enzima se localizó en los tejidos vasculares y su expresión se restringió a las células relacionadas con el floema. Se infiere que estas quitinasas extracelulares tienen un papel inicial en limitar el crecimiento del patógeno (Lee *et al.*, 2000).

No en todos los casos se conoce qué papel juega el mecanismo de defensa empleado. Por ejemplo, se ha reportado el gen CALRR1 (*C. annuum* Leucine-Rich Repeat protein 1) [accession numbers: AF082727 (EST clone), AY237117 (full length cDNA)], el cual codifica para una proteína rica en repeticiones de leucina (LRR) la cual se expresa en chiles al ser inoculados con *P. capsici* y que es secretada al floema de hojas, tallos y frutos. Se sabe que las proteínas LRR funcionan en varias vías de transducción de señales y que juegan un papel importante en la mediación de interacciones proteína-proteína (Jung *et al.*, 2004a).

En el 2010, Richins *et al.*, evaluaron los perfiles de expresión de las plantas de chile New Mexico 6-4 (NM6-4), una línea susceptible; el CM-334 y el 01C 1688 una línea resistente desarrollada como una retrocruza con el CM-334 y el *C. annuum* cv. Early Jalapeno, a las 0, 4 y 24 h post-inoculación. Para el CM-334, encontraron 87 genes que se expresaron de manera diferencial en respuesta a la inoculación. En la línea susceptible NM6-4, 207 genes presentaron una expresión diferencial tras la inoculación, en donde se observó una disminución en la expresión génica a las 24 h. Veintidós genes se expresaron de manera única solamente en las líneas resistentes, de estos 19 parecen ser inducidos en respuesta al ataque por *P. capsici* mientras que tres parecen ser reprimidos. Se presume que los alelos para estos genes en el CM-334 son distintos ya sea en su código o en sus regiones promotoras. La transcripción de un gen para una proteína de membrana celular (RR58-41) fue inducida de manera única en las líneas resistentes a *Phytophthora*. Se desconoce la función de esta proteína de membrana celular.

have it used as a rootstock is being carried out. Recently, the effectiveness of producing chile ancho grafted onto CM-334 as a measure to control root rot caused by *P. capsici* was demonstrated in Celaya, Guanajuato.

The commercial fruit yield of grafted plants on CM-334 was lower than untreated plants. However, no control plant was able to survive *P. capsici* attack, whereas all of those grafted on CM-334 did survive. It is suggested by the study hereby that the use of plants grafted on CM-334 shall be used as a viable alternative to produce chile in areas with a high incidence of this phytopathogen (García *et al.*, 2010). It is necessary to perform more of this type of studies using different chile varieties.

CONCLUSIONS

The mechanisms involved in chile plant (*C. annuum*) defense against the *P. capsici* oomycete are rather complex and rarely fully understood. Responses include chemical compounds accumulation in the tissues, activation of the enzymes involved in lignin biosynthesis, plant oxidative metabolism alterations, phenolic compounds accumulation, cytologic and histologic tissue changes, as well as the synthesis of enzymes capable of damaging pathogen cells, the systemic response acquired and the hypersensitive response. Such mechanisms diversity is a reflection of the polygenic nature of *C. annuum*-*P. capsici* interaction.

It has been revealed by research progress that both structural and functional changes are manifested in chile plants during the *P. capsici* process of infection. It is suggested by the information currently generated that chile plants are resistant to this pathogen, revealing not only an earlier defense response but also more intense than susceptible plants. Moreover, infection resistant chile plants seem to be better able to withstand the oxidative stress generated by the interaction with the pathogen. Nonetheless, the isoenzymes and protein relevance that has been reported only in resistant cultivars that can be used as resistant markers in genetic improvement programs, and whose function remains unknown, must not be ignored.

Acknowledgements. The department of Chemical-Biological Sciences at the Autonomous University of Ciudad Juárez is acknowledged for the help provided for the proper performance of the study hereby.

LITERATURA CITADA

- Alejo IF, Márquez LMA, Morales RI, Vázquez GMS and Olalde PV. 2008. Mycorrhizal protection of chili plants challenged by *Phytophthora capsici*. European Journal of Plant Pathology 120:13-20.
- Biles CL, Wall MM, Waugh M and Palmer H. 1993. Relationship of *Phytophthora* fruit rot in fruit maturation and cuticle thickness of New Mexican-type peppers. Phytopathology 83:607-611.
- Blair J, Coffey M, Park S, Geiser D and Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology 45:266-277.
- Bosland PW and Lindsey DL. 1991. A seedling screen for

Al mismo tiempo que se están estudiando los mecanismos de defensa en CM-334, se están haciendo investigaciones sobre la posibilidad de usarlo como portainjerto. Recientemente, se demostró la efectividad de producir chile ancho injertado sobre CM-334 como medida para controlar la pudrición de raíz provocada por *P. capsici* en Celaya, Guanajuato. El rendimiento de frutos comerciales de plantas injertadas sobre CM-334 fue menor al de plantas sin tratamiento. No obstante, ninguna planta testigo fue capaz de sobrevivir al ataque de *P. capsici*, mientras que todas las injertadas sobre CM-334 sobrevivieron. Este estudio sugiere como alternativa viable el uso de plantas injertadas sobre CM-334 para producir chile en zonas donde existe una alta incidencia de este fitopatógeno (García *et al.*, 2010). Es necesario realizar más estudios de este tipo utilizando diferentes variedades de chile.

CONCLUSIONES

Los mecanismos involucrados en la defensa de las plantas de chile (*C. annuum*) contra el oomycete *P. capsici*, son complejos y pocas veces comprendidos en su totalidad. Las respuestas comprenden la acumulación de compuestos químicos en los tejidos, la activación de enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina, alteraciones del metabolismo oxidativo de la planta, la acumulación de compuestos fenólicos, cambios citológicos e histológicos de los tejidos, así como la síntesis de enzimas capaces de dañar las células del patógeno, la respuesta sistémica adquirida y la respuesta hipersensible. Esta diversidad de mecanismos de defensa es reflejo de la naturaleza poligénica de la interacción *C. annuum*-*P. capsici*.

El avance en las investigaciones ha demostrado los cambios estructurales y funcionales que se manifiestan en las plantas de chile durante el proceso de infección de *P. capsici*. Hasta el momento, la información generada sugiere que las plantas de chile que son resistentes a este fitopatógeno manifiestan una respuesta de defensa más temprana y con mayor intensidad que aquellas plantas que son susceptibles. Además, las plantas de chile resistentes a la infección parecen estar mejor capacitadas para soportar el estrés oxidativo generado por la interacción con el patógeno. No obstante, no se debe dejar de lado la importancia de isoenzimas y proteínas que han sido reportadas únicamente en cultivares resistentes, que pueden ser utilizadas como marcadores de resistencia en programas de mejora genética, y cuya función aun permanece desconocida.

Agradecimientos. Se agradece al Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

- phytophthora root rot of pepper, *Capsicum annuum*. Plant Disease 75:1048-1050.
- Candela ME, Egea C, García PMD, Costa J and Candela M. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522:79-86.
- Cooke D, Drenth A, Duncan J, Wagels G and Brasier C. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30:17-32.
- Davidse LC, Hofman AE and Velthuis GCM. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. Experimental Mycology 7:344-361.
- Davidson CR, Carroll RB, Evans TA and Mulrooney RP. 2002. First report of *Phytophthora capsici* infecting lima bean (*Phaseolus lunatus*) in the Mid-Atlantic region. Plant Disease 86:1049.
- Dick MW. 2001. Straminipilous Fungi: systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. 660p.
- Dodds PN. 2010. Genome evolution in plant pathogens. Science 330:1486-1487.
- Egea C, Sid AA, Candela M and Candela ME. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology 158:151-158.
- Egea C, Alcázar MD and Candela ME. 1996a. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 98:737-742.
- Egea C, García PMD and Candela ME. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology 149: 762-764.
- Erselius L and Vallavieille C. 1984. Variation in protein profiles of *Phytophthora*: Comparison of six species. Transactions of the British Mycological Society 3:463-472.
- Erwin D and Ribeiro O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society. USA. 562p.
- Fernández PSP, Biles CL, Waugh ME, Onsurez WK, Rodríguez AG and Liddell CM. 2004. Characterization of Southern New Mexico *Phytophthora capsici* Leon isolates from pepper (*Capsicum annuum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 22:82-89.
- Foster JM and Hausbeck MK. 2010a. Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. Plant Disease 94:24-30.
- Foster JM and Hausbeck MK. 2010b. Managing *Phytophthora* crown and root rot in bell pepper using fungicides and host resistance. Plant Disease 94:697-702.
- Gallely M and Hong C. 2008. *Phytophthora*: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. American Phytopathological Society. USA. 168p.
- García RM, Chiquito AE, Loeza LP, Godoy HH, Villordo PE, Pons HJ, González CM y Anaya LJ. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre Criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. Agrociencia 44:701-709.
- Gayoso C, Pomar F, Merino F and Bernal MA. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in

- Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. Scientia Horticulturae 102:1-13.
- Gevens AJ, Donahoo RS, Lamour KH and Hausbeck MK. 2008a. A detached cucumber fruit method to screen for resistance to *Phytophthora capsici* and effect of fruit age on susceptibility to infection. Plant Disease 90:1276-1282.
- Gevens AJ, Donahoo RS, Lamour KH and Hausbeck MK. 2008b. Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. Plant Disease 92:201-209.
- Gil ORG, Palazon EC and Cuartero ZJ. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. Plant Breeding 107: 50-55.
- Glosier B, Ogundiwin E, Sidhu G, Sischo D and Prince, J. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162:23-30.
- Godinez VD, Rocha SM, Sepúlveda GEB, Lara RJ, Rojas MR and Zavaleta ME. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. European Journal of Plant Pathology 120:299-303.
- Goldberg NP. 1995. Chile pepper diseases. New Mexico Agricultural Experiment Station, College of Agriculture and Home Economics. Circular 549.
- Granke LL, Windstam ST, Hoch HC, Smart CD and Hausbeck MK. 2009. Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. Phytopathology 99:1258-1264.
- Guerrero MA and Laborede JA. 1980. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth meeting of the capsicum working group of Eucarpia. I.V.T., Wageningen, The Netherlands. 52-56p.
- Guigón LC y González GP. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum*, L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:49-56.
- Hausbeck MK and Lamour KH. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. Plant Disease 88:1292-1303.
- Heath MC. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion in Plant Biology 3:315-319.
- Hwang BK and Sung NK. 1989. Effect of metalaxyl on capsidiol production in stems of pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. Plant Disease 73:748-751.
- Jung EH, Jung HW, Lee SC, Han SW, Heu S and Hwang BK. 2004. Identification of a novel pathogen-induced gene encoding a leucine-rich repeat protein expressed in phloem cells of *Capsicum annuum*. Biochimica et Biophysica Acta 1676:211-222.
- Jung HW and Hwang BK. 2000. Pepper gene encoding a basic β -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon and methyl jasmonate treatment. Plant Science 156:23-34.
- Jung W, Jin Y, Kim Y, Kim K, Park R and Kim T. 2004b. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. Biological Control 64:645-652.
- Kim YJ and Hwang BK. 1994. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 45:195-209.
- Kim S and Kim Y. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. Plant Pathology Journal 25:113-120.
- Koç E, Sülün Üstün A, İşlek C and Kaşko Arici Y. 2011. Defence responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leon. Scientia Horticulturae 128:434-442.
- Lamour K. 2009. *Phytophthora capsici*: Sex, selection and the wealth of variation. Pp. In: Lamour K and Kamoun S (eds.). Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tools. Wiley-Blackwell. USA. 582p.
- Laxalt AM and Munnik T. 2002. Phospholipid signaling in plant defense. Current Opinion in Plant Biology 3:315-319.
- Lee YK, Hippe-Sanwald S, Jung HW, Hong JK, Hause B and Hwang BK. 2000. *In situ* localization of chitinase mRNA and protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 57:111-12.
- Li Z, Long W, Zheng J and Lei J. 2007. Isolation and Identification of *Phytophthora capsici* in Guangdong Province and measurement of their pathogenicity and physiological race differentiation. Frontiers of Agriculture in China 1:377-381.
- López MN, Colinas LMT, Peña VCB, Salinas MY, Fuentes MP, Biesaga M and Zavaleta ME. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil 338:399-409.
- Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 3:22-32.
- Manohara D, Mulya K and Wahyuno D. 2004. *Phytophthora* disease on black pepper and the control measures. Focus on Pepper 1:37-49.
- Maleck K and Dietrich RA. 1999. Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? Trends in Plant Science 4:215-219.
- Martin FN and Tooley PW. 2003. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death. Mycological Research 107:1379-1391.
- Miller SA, Miller ML, Ivey L and Mera J. 2002. Responses of pepper cultivars and experimental breeding lines to phytophthora blight, 2001. Biological and cultural tests for control of plant disease. (Online) Report 17:V16.

- DOI:1094/BC17. American phytopathological society, St. Paul, Minnesota.
- Molot PM, Mas P, Conus M, Ferriere H and Ricci P. 1981. Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion and level of induced resistance in cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici*. *Physiological Plant Pathology* 18:379-389.
- Monroy BS and Bosland P. 2011. Identification of novel physiological races of *Phytophthora capsici* causing foliar blight using the New Mexico recombinant inbred pepper lines set as a differential host. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136:205-210.
- Moore R. 2002. The Straminipila. *Mycological Research* 106:1247-1248.
- Oelke L, Bosland P and Steiner R. 2003. Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:213-218.
- Ogundiwin EA, Berke TF, Massoudi M, Black LL, Huestis G, Choi D, Lee S and Prince JP. 2005. Construction of 2 intra-specific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48:698-711.
- Ortiz R, Delgado FF, Alvarado G and Crossa J. 2010. Classifying vegetable genetic resources- A case study with domesticated *Capsicum* spp. *Scientia Horticulturae* 126:186-19.
- Ozgonen H and Erkilic A. 2007. Growth enhancement and *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici* Leonian) control by arbuscular mycorrhizal fungi inoculation in pepper. *Crop Protection* 26:1682-1688.
- Palloix A, Daubeze AM and Pochard E. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 123:12-24.
- Pérez ML, Durán OL, Ramírez MR, Sánchez PR y Olalde PV. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:19-25.
- Pozo MJ, Van LLC and Pieterse CMJ. 2005. Jasmonate-signals in plant-microbe interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 23:211-222.
- Quesada OLM and Hausbeck MK. 2010. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 100:619-627.
- Richins R, Micheletto S and O'Connell M. 2010. Gene expression profiles unique to chile (*Capsicum annuum* L.) resistant to *Phytophthora* root rot. *Plant Science* 178:192-201.
- Ristaino JB. 1990. Intraspecific variation among isolates of *Phytophthora capsici* from pepper and cucurbit fields in North Carolina. *Phytopathology* 80:1253-1259.
- Ristaino JB and Johnston SA. 1999. Ecologically based line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 89:867-870.
- Rodríguez MVM, Luna RJ, Valle GP, Tiscareño LM y Ruiz CJA. 2004. Caracterización patogénica y sexual de *Phytophthora capsici* Leonian y análisis de su distribución espacial en el centro-norte de México mediante un sistema de información geográfica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:72-81.
- Sarath BB, Pandravada SR, Prasada Rao RDVJ, Anitha K, Chakrabarty SK and Varaprasad KS. 2011. Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Protection* 30:389-400.
- Schena L and Cooke D. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal of Microbiological Methods* 67:70-85.
- Silva RHV, Fernández PSP, Góngora CC, Macías LBC y Ávila QGD. 2009. Distribución espacio temporal de la Marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27:134-147.
- Silvar C, Merino F and Díaz J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 165:1120-1124.
- Sy O, Steiner R and Bosland P. 2008. Recombinant inbred approaches to management of *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease*. 83:1080-1089.
- Tahboub M, Sanogo S, Bosland P and Murray L. 2008. Heat level in chile pepper in relation to root and fruit infection by *Phytophthora capsici*. *HortScience* 43:1846-1851.
- Tang Q, Cui L, Li D, Dai T, Yin W, Dong S, Xing H, Zheng X and Wang Y. 2011. Resistance evaluation of soybean germplasm from Huanghuai region to *Phytophthora* root rot. *Agricultural Sciences in China* 10:246-251.
- Thabuis A, Palloix A, Pflieger S, Daubeze AM, Caranta C and Lefebvre V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: Evidence for conserved resistance loci across *Solanaceae* and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1473-1485.
- Thabuis A, Palloix A, Servin B, Daubeze AM, Signoret P and Hospital F. 2004. Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Molecular Breeding* 14:9-20.
- Thines M and Kamoun S. 2010. Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13:427-433.
- Truong N, Liew E and Burgess L. 2010. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from black pepper in Vietnam. *Fungal Biology* 114:160-170.
- Turelli M, Coulomb C, Coulomb PJ and Roggero JP. 1984. Effects of capsidiol on the lipid and protein content of isolated membranes of *Phytophthora capsici*. *Physiological Plant Pathology* 24: 211-22.
- Tyler B. 2001. Genetics and genomics of the oomycete-host interface. *Trends in Genetics* 17:611-614.

- Ueeda M, Kubota M and Nishi K. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:149-154.
- Vargas MT, Zavaleta ME y Hernández AM. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. en chile (*Capsicum annuum* L.) serrano CM-34 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vásquez LA, Tlapal BB, Yáñez MM, Pérez PR y Quintos EM. 2009. Etiología de la marchitez del “chile de agua” (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:127-134.
- Velásques VR, Medina AM y Luna RJ. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del chile (*Capsicum annuum* L.) en el norte-centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.
- West P, Appiah A and Gow N. 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:99-113.
- Widmer T. 2010. *Phytophthora kernoviae* oospore maturity, germination and infection. *Fungal Biology* 114:661-668.
- Zavaleta ME. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.

Cambios Morfológicos en Células de Chile CM334 Inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*

Morphological Changes in Cells of Chilli CM334 Inoculated with *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*

Diana Sanzón Gómez, Guadalupe Valdovinos Ponce, Reyna Isabel Rojas Martínez, Emma Zavaleta Mejía, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados (IFIT-CP), km 36.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **María Alejandra Mora Avilés,** INIFAP, Campo Experimental Bajío, km 6 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Gto., CP 38010, México; **Lorenzo Guevara Olvera,** Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Av. Tecnológico y Antonio García-Cubas S/N Col. FOVISSSTE, Celaya, Gto., CP 38010, México. Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

(Recibido: Octubre 17, 2011 Aceptado: Enero 12, 2012)

Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI, Zavaleta ME, Mora AMA y 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.

Resumen. El chile (*Capsicum annuum*) CM334 es resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*), tal resistencia se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH); sin embargo, este genotipo es susceptible a *Fusarium oxysporum* (*Fo*). En el presente trabajo se compararon los cambios celulares en la RH inducida por *Pc*, interacción incompatible (II), y la necrosis inducida por *Fo*, interacción compatible (IC). La necrosis y la colonización por el oomiceto en la II se confinó al sitio de la inoculación en el tallo; y en la IC, el patógeno colonizó todo el tallo y la necrosis se limitó a la zona de inoculación. La degradación de las paredes celulares en la IC fue evidente, en cambio en la II, solamente se observó el colapso de las células. En la II el 31% de los núcleos de las células corticales fueron rojos sugiriendo una RH y en la IC el 71% fueron globosos y de color gris claro sugiriendo muerte por necrosis.

Palabras clave adicionales: Interacción compatible, interacción incompatible, oomicetos, reacción de hipersensibilidad, muerte celular programada, necrosis.

El chile (*Capsicum annuum*) es un cultivo de gran importancia económica en México, y la enfermedad conocida como marchitez del chile inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*) causa grandes pérdidas en las zonas productoras. El chile criollo tipo serrano CM334 ha destacado por su alto grado de resistencia al oomiceto que se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH) (Bonnet *et al.*, 2007). Durante la RH, las células localizadas

Abstract. The chilli (*Capsicum annuum*) CM334 is resistant to oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*), such resistance is manifested by a hypersensitive reaction (HR); however, this genotype is susceptible to *Fusarium oxysporum* (*Fo*). In this study we compared the cellular changes in the HR-induced by *Pc*, incompatible interaction (II), and *Fo*-induced necrosis, compatible interaction (CI). The necrosis and colonization by the oomycete in II was confined to the site of inoculation in the stem, and in CI, the pathogen colonized the whole stem and the necrosis was limited to the site of inoculation. Cell wall degradation was evident in the CI, whereas in the II, only the collapse of the cells was observed. In the II, 31% of the nuclei of cortical cells were red suggesting a HR and in the CI 71% of the nuclei were globose and light gray suggesting a death by necrosis.

Additional keywords: Compatible interaction, incompatible interaction, oomycetes, hypersensitive reaction, programmed cell death, necrosis.

Résumé. Le piment (*Capsicum annuum*) CM334 est résistant à l'oomycète *Phytophthora capsici* (*Pc*), cette résistance se manifestant par une réaction d'hipersensibilité. Cependant, ce génotype présente une sensibilité à *Fusarium oxysporum* (*Fo*). Dans cette étude, nous avons comparé les changements cellulaires dans la réaction d'hipersensibilité induite par *Pc* (l'interaction incompatible), et la nécrose induite par *Fo* (l'interaction compatible). La nécrose et la colonisation occasionnées par l'oomycète dans l'interaction incompatible ont été limitées au site d'inoculation dans la tige. Dans l'interaction compatible, l'agent pathogène a colonisé toute la tige et la nécrose a été limitée au site d'inoculation. La dégradation des parois cellulaires était évidente dans l'interaction compatible, alors que dans l'interaction incompatible a été observé l'effondrement des

alrededor del sitio de penetración se “suicidan” lo que trae como resultado que la infección y el avance del patógeno se detenga. La RH ha sido considerada un tipo de muerte celular programada (MCP). En frutos de chile (*Capsicum baccatum*) resistente a *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), se observaron varias características citológicas típicas de la MCP, como lo son la separación de la membrana plasmática de la pared celular, la condensación del citoplasma, la dilatación del retículo endoplásmico, la presencia de numerosas vacuolas pequeñas, núcleos heterocromáticos y menos osmofílicos, y fragmentación del ADN. En contraste, en frutos susceptibles (*C. annuum*) hubo degradación de la pared celular, fragmentación de vacuolas, degradación del núcleo y citoplasma, y condensación del citoplasma (Kim *et al.*, 2004). Recientemente se observó que algunas plantas de CM334 murieron después de haber sido inoculadas con *Pc* (datos no publicados). La muerte de estas plantas pudo haber sido el resultado de la pérdida de resistencia o bien producto de una RH tan violenta y extensiva a nivel del cuello de las plantas que éstas terminaron por sucumbir. Dada la importancia del genotipo CM334, calificado como el resistente universal a *Pc* y que constituye una fuente potencial de resistencia al oomiceto (Glosier *et al.*, 2008), se consideró conveniente comparar los cambios morfológicos celulares de las plantas de chile CM334 en la interacción incompatible con *P. capsici*, con aquellos desarrollados en la interacción compatible con *Fusarium oxysporum* (*Fo*). Semillas germinadas de chile CM334 y Yolo Wonder (YW) (utilizado como control susceptible a *Pc*) se plantaron en vasos de plástico y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C con 14 h de luz y 10 h de oscuridad.

Los patógenos *Pc* (cepa 6143) y *Fo* se cultivaron a temperatura ambiente en medio V8 y PDA, respectivamente. Plantas en etapa de 4-6 hojas verdaderas, se inocularon realizando una punción en el nudo de las hojas cotiledonarias y sobre esta área se colocó un disco de medio de cultivo de 0.5 cm de diámetro con micelio. Para las plantas de CM334 se tuvieron tres tratamientos: 1) inoculación con *Pc*, 2) inoculación con *Fo* y 3) testigo (con punción y disco de medio de cultivo sin micelio), y para YW se tuvieron sólo dos: 1) inoculación con *P. capsici*, y 2) testigo. En las inoculaciones con *Pc*, se consideraron los tiempos 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) y 48, 96 y 120 hpi en el caso de *Fo*. Cada tiempo contó con su respectivo testigo. Además a los nueve días posteriores a la inoculación (dpi), en cinco plantas de CM334 inoculadas con *Pc* se evaluó, por abajo del sitio de la punción e inoculación el avance de la necrosis y colonización sistémica, ya que toda la parte apical del tallo colapsó.

De cada una de esas plantas se tomaron tres fragmentos de tallo de 1 cm de longitud a partir del sitio donde terminaba la necrosis y hacia la base del tallo, cada fragmento se colocó en una caja Petri con agua destilada estéril para detectar el crecimiento micelial y formación de esporangios del oomiceto. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz blanca constante por 72 h para observar la presencia o ausencia de esporangios. También

cellules. Dans l'interaction incompatible 31% des noyaux des cellules corticales étaient rouges, suggérant une réaction d'hypersensibilité. Dans l'interaction compatible 71% étaient globuleux et gris, suggérant la mort par nécrose.

Mots clés supplémentaires: Interaction compatible, interaction incompatible, oomicètes, réaction d'hypersensibilité, mort cellulaire programmée, nécrose.

The chili (*Capsicum annuum*) is an economically important crop in Mexico, and great losses in production areas are caused by the disease known as chili wilt, induced by the oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*). The CM334 creole type Serrano chili has highlighted itself because of its high level of resistance against the oomycete manifested throughout a hypersensitive reaction (HR) (Bonnet *et al.*, 2007). During the HR, the cell located around the penetration site “commits suicide”, which makes both the infection and pathogen spreading stop. The HR has been considered some kind of programmed cell death (PCD). Several cytological characteristics, PCD typical, were observed in chili fruits (*Capsicum baccatum*) resistant to *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), such as separation of the plasma membrane from the cell wall, cytoplasm condensation, dilation of the endoplasmic reticulum, the presence of numerous small vacuoles, heterochromatic nuclei and less osmophilic, and DNA fragmentation. Conversely, there was a degradation of the cell wall, vacuole fragmentation, degradation of the nucleus and cytoplasm, as well as cytoplasm condensation in susceptible fruits (*C. annuum*) (Kim *et al.*, 2004). It was recently observed that some CM334 plants died after being inoculated with *Pc* (unpublished data). The death of these plants may have been the result of resistance loss, or derived from a violent and extensive HR at a neck level of the plants; they eventually succumb. Due to the relevance of the CM334 genotype, described as the universal resistant to *Pc* and representing a source of potential resistance to the oomycete (Glosier *et al.*, 2008), it was considered desirable to compare the cell morphological changes of CM334 chili plants in the incompatible interaction with *P. capsici* with those developed with in the compatible interaction with *Fusarium oxysporum* (*Fo*). The CM334 chili germinated seeds and Yolo Wonder (YW) (used as a *Pc* susceptible control) were planted in plastic cups and kept in a growth chamber at 25 ± 2 °C with 14 h of light and 10 h of darkness.

The *Pc* pathogens (strain 6143) and *Fo* were cultured at room temperature in V8 and PDA medium, respectively. Plants in the 4 to 6 true leaf stage were inoculated performing a puncture in the node of cotyledonary leaves, and a culture medium disk of 0.5 cm diameter, with mycelium, was placed on this area; a total of three treatments were obtained for CM334 plants: 1) Inoculation with *Pc*, 2) inoculation with *Fo* and 3) control (with disk puncture and culture medium without mycelium); only two were obtained for YW: 1) inoculation with *P. capsici*, and 2) control. The time considered in the *Pc* inoculations, 12, 24 and 48 h post-inoculation (hpi), and 48, 96 and 120 hpi in the *Fo* case.

cinco plantas inoculadas con *Fo* y cinco del testigo se evaluaron a los 30 dpi como se describió para *Pc*, excepto que los fragmentos de tallo fueron de 1.5 cm de longitud, y debido a que no se observó daño en la parte apical del tallo, uno de los fragmentos correspondió a la parte apical, otro al sitio de inoculación y el tercero a la parte basal. Para las observaciones citológicas bajo microscopía de luz se tuvieron cinco plantas para cada tratamiento y tiempo, y para ello se cortó un fragmento de tallo de 1 cm de longitud de cada planta, situando en medio el sitio de la punción.

La fijación e inclusión con parafina de los tallos se hizo con el protocolo de López *et al.* (2005). Las muestras se cortaron transversal y longitudinalmente a 8 µm de grosor con un micrótopo HYRAX M 25 marca ZEISS y se montaron en portaobjetos. Posteriormente se realizó una tinción doble safranina (metilcelosolve) – verde rápido (metilcelosolve) (López *et al.*, 2005) y los cortes se observaron en un microscopio de luz VE-B6 marca Velab. En cortes observados bajo el objetivo de 40X se contaron y caracterizaron los núcleos de las células corticales y medulares del tallo, también se registró el número de células del xilema que contenían polifenoles o hifas. Se observaron muestras de todos los tiempos y tratamientos, pero estas variables sólo se evaluaron en CM334-*Pc* 24 hdi, CM334-*Fo* 48 hdi, CM334-Testigo 24 hdi, YW-*Pc* 24 hdi y YW-Testigo 24 hdi. Fue en estos tiempos en los que se observaron diferencias evidentes entre tratamientos. Todos los cortes que se evaluaron fueron del área donde se hizo la punción e inoculación. En los tratamientos donde se inoculó *Pc*, sólo se evaluó el tiempo 24 hpi debido a que a las 12 hpi no se observaron cambios morfológicos evidentes entre tratamientos y para las 48 hpi la totalidad del tallo en el área de punción e inoculación estaba colapsada. En el caso de la inoculación con *Fo*, se eligió el tiempo de 48 hpi porque fue en ese tiempo en el que se observaron los cambios más evidentes entre tratamientos.

En la interacción compatible YW-*Pc* los primeros síntomas de necrosamiento se presentaron a las 24 hpi y a los 5 dpi todas las plantas murieron. La presencia de micelio y esporangios a lo largo del tallo de todas las plantas, evidenció que el avance del patógeno no se detuvo. En la interacción incompatible CM334-*Pc* se observó el necrosamiento a las 24 hpi y a los 9 dpi el necrosamiento avanzó en el tallo sólo 2.06 cm por debajo del sitio de punción e inoculación. No se detectó la presencia de micelio y esporangios en el segmento basal de tallo analizado, lo que indicó que el avance del oomiceto finalmente fue detenido. En la interacción CM334-*Fo* la longitud de la necrosis fue en promedio de 0.33 cm a los 3 dpi, de 0.52 cm a los 23 dpi y a los 30 dpi el hongo avanzó sistemáticamente hasta el segmento del tallo evaluado más distante al punto de inoculación; en todos los fragmentos se registró la presencia de micelio, microconidios y macroconidios. Las plantas testigo a los 30 dpi no presentaron síntomas de necrosamiento o signos de algún patógeno. Con excepción del tratamiento YW-*Pc*, en todos los demás se distinguieron en las células de los cortes de tejido analizados, tres tipos principales de núcleos: 1) Normales, con formas variadas (esféricos, ovalados o alargados), de color gris claro y con

Each time had its respective control. Also, nine days post inoculation (dpi), the necrosis advancing and systemic colonization were evaluated in five CM334 *Pc* inoculated plants, below the puncture and inoculation site, since the entire apical stem had collapsed.

A total of three stem pieces 1 cm long were taken from each of these plants at the point where necrosis ended and towards the base of the stem; each fragment was placed in a Petri dish with sterile distilled water in order to detect the mycelia growth oomycete sporangia formation. The dishes were kept at room temperature and under a constant white light for 72 h to determine either the presence or absence of sporangia. Moreover, five *Fo* inoculated plants and five from the control were evaluated at 30 dpi as described for *Pc*, with the exception that the stem fragments were 1.5 cm long; since no damage was observed in the apical part of the stem, one of the fragments corresponded to the apical side, another to the inoculation and the third to the basal. A total of five plants were for cytological observations under light microscopy for each treatment and time; a 1 cm stem fragment was cut from each plant to do so, placing the puncture site in the middle.

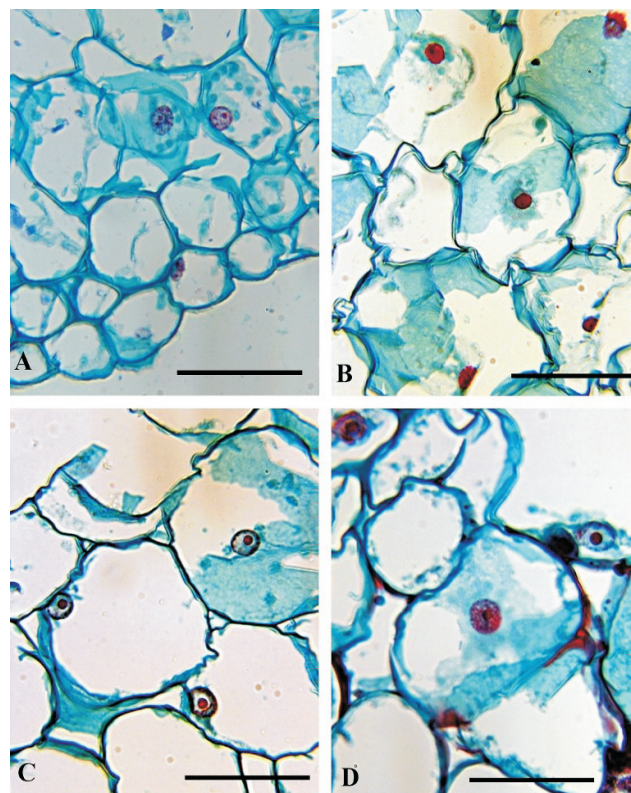


Figura 1. Microfotografías de los tipos de núcleos observados durante las interacciones evaluadas: (A) normales, (B) rojos, (C) globosos y (D) globosos-rojos. Barra = 50 µm.

Figure 1. Microphotographs of the types of nuclei observed during the evaluated interactions: (A) normal, (B) red, (C) globose and (D) globose-roed. Bar = 50 µm.

presencia de gránulos generalmente pequeños y oscuros, con un nucléolo pequeño de color anaranjado (Figura 1A). 2) Rojos, generalmente esféricos u ovalados, condensados (contraídos), de apariencia granulosa y color rojo; los gránulos del núcleo fueron de color rosa oscuro a rojo y el nucléolo con frecuencia no fue distinguible (Figura 1B). 3) Globosos, núcleos grandes y esféricos, de color gris claro, con pocos gránulos oscuros y con un nucléolo grande de color anaranjado brillante situado generalmente en el centro del núcleo (Figura 1C). En todas las plantas testigo, solamente en las células dañadas por la punción se observó la acumulación de polifenoles (formando estructuras esféricas de color rojo y textura lisa) y a las 24 h posteriores a la punción (hpp), las células del tallo mostraron el 98.5% de núcleos con apariencia normal. En cambio en la interacción incompatible (CM334-*Pc*), el colapso de tejidos avanzó hasta la médula del tallo (pero sin degradación aparente de las paredes celulares) a las 24 hpi y el 30.9% de los núcleos de las células de la corteza, no colapsadas, fueron rojos (Figura 1B). Las hifas del oomiceto se encontraron entre las paredes celulares del tejido cortical y medular del tallo y en el 10.9% de los elementos del vaso del xilema. En la interacción compatible (CM334-*Fo*), a las 48 hpi las células localizadas en el sitio de la inoculación mostraron mayor acumulación de polifenoles, en comparación con la incompatible y las células en contacto con ellos se degradaron total o parcialmente. En esta interacción 70.8% de los núcleos visibles en la corteza fueron globosos (Figura 1C), y sólo el 0.3% presentó color rojo y se localizaron en sitios con acumulación de polifenoles o cercanos a las hifas. Estos últimos núcleos, a diferencia de los observados en la interacción incompatible, mantuvieron un nucléolo grande (Figura 1D). Las hifas de *Fo* invadieron inter e intracelularmente al parénquima y al 1.7% de los elementos de vaso del xilema. En la interacción compatible YW-*Pc* casi la tercera parte del diámetro del tallo fue colapsado presentando una evidente degradación de las paredes celulares a las 24 hpi y el 14.3% del total de núcleos observados en la corteza fueron de color rojo y granuloso. Las hifas crecieron intercelularmente en las células del parénquima y también se observaron dentro del 13.2% de los elementos de vaso del xilema.

Dado que *Pc* no avanzó sistémicamente en CM334, se infiere que la planta mostró resistencia al patógeno y que la necrosis observada fue producto de una rápida e intensa RH. En las plantas susceptibles del cv Yolo Wonder todo el tallo mostró necrosis y fue colonizado; así mismo, en la interacción compatible CM334-*Fo*, el patógeno creció sistémicamente a lo largo del tallo como lo indicó el hecho de que en todos los segmentos analizados hubo desarrollo del patógeno, confirmando la susceptibilidad de CM334 a este hongo. Aunque en las tres interacciones evaluadas se presentaron síntomas de necrosamiento, hubo claras diferencias estructurales a nivel de tejidos, lo que indica que los mecanismos responsables de la necrosis fueron diferentes. En las interacciones compatibles YW-*Pc* y CM334-*Fo* fue evidente la degradación de las paredes celulares desde las 12 hpi, debido posiblemente a la actividad de enzimas líticas producidas por estos patógenos

The fixation and embedding in paraffin the stems was carried out by the López *et al.* (2005) protocol. The samples were cut transversely and longitudinally to an 8 µm thickness with a HYRAX M 25 microtome ZEISS brand; then they were placed on slides. Afterwards, a safranin double stain (methyl cellosolve) was performed – fast Green (methyl cellosolve) (López *et al.*, 2005) and the sections were observed under a VE-B6 light microscope Velab brand. The nuclei of cortical and medullary stem cells were counted and characterized in sections observed under the 40X objective; also, the number of xylem cells containing polyphenols or hyphae was recorded. Samples of all times and treatments were observed, but these variables were evaluated only in CM334-*Pc* 24 hdi, CM334-*Fo* 48 hdi, CM334-Control 24hdi, YW-*Pc* 24 hdi and YW-Control 24 hdi. It was during such time frames when there were clear differences among treatments. All of the assessed sections were from the area where both puncture and inoculation had been performed. Only the 24 hpi time was evaluated in the treatments where *Pc* was inoculated due to a lack of evident morphological changes among treatments; furthermore, by the 48 hpi, the entire stem at the puncture and inoculation site had collapsed. A 48 hpi time was chosen in the case of *Fo* inoculation because it was at that time when the most obvious changes, among treatments, were observed.

The first necrosis symptoms, in the YW-*Pc* compatible interaction, occurred at 24 hpi; by the 5 dpi, all of the plants were dead. It was revealed by the presence of mycelium and sporangia along the stem of all plants that the advance of the pathogen did not stop. Necrosis was observed in CM334-*Pc* incompatible interaction at 24 hpi and; necrosis had advanced on the stem only 2.06 cm below the puncture and inoculation site by the 9 dpi. The presence of mycelium or sporangia, in the basal stem segment analyzed, was not detected, thus indicating that the advance of the oomycete was finally stopped. The length of the necrosis in the CM334-*Fo* interaction averaged 0.33 cm at 3 dpi, 0.52 cm at 23 dpi and by the 30 dpi the fungus systematically moved forward to the evaluated stem segment most distant from the inoculation point; the presence of mycelium, microconides and macroconidia was recorded in all fragments.

Neither necrosis nor any other pathogen symptoms were revealed by the plants at 30 dpi. A total of three main types of nucleus were perceived in all other cells, except for the YW-*Pc* treatment: 1) Normal with various shapes (spherical, oval or elongated), light gray and with the presence of granules, usually small and dark, and a small orange nucleolus (Fig. 1A). 2) Red, usually round or oval, condensed (contracted), grainy appearance and reddish; the nucleus granules were from dark pink to red and the nucleus was often not distinguishable (Fig. 1B). 3) Globose, large, spherical nuclei, light gray with few dark granules and large nucleus with a bright orange, usually located in the center of the nucleus (Fig. 1C). A polyphenols accumulation (forming red and soft textured spherical structures) was observed in all of the control plants, but only in the puncture damaged cells, and 24 h post puncture (hpp) a 98.5% nucleus with a normal appearance was revealed by the stem cells. In

(Roncero *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010), y a que los mecanismos de defensa de las plantas no se dispararon tan rápido ni con la magnitud necesaria para defenderse del ataque por el patógeno. En contraste, en las células de los tallos de CM334 inoculados con *Pc*, las paredes celulares no mostraron mayor degradación aunque sí sufrieron colapso. En la interacción CM334-*Pc* la acumulación de compuestos fenólicos pudo haber contribuido a evitar la colonización del tejido por parte del oomiceto, ya que se ha reportado que los ácidos fenólicos solubles contenidos en tallos de variedades resistentes de Chile están asociados con su resistencia a *Pc* (Fernández y Liddell, 1997). Por el contrario, la gran acumulación de compuestos fenólicos en la interacción CM334-*Fo* no pudo evitar la colonización, debido quizás a que estos compuestos no fueron nocivos para este hongo o a que hubo diferencias en el tipo de fenoles acumulados en uno y otro caso. Se sabe que los núcleos de células bajo diferentes tipos de MCP sufren una condensación o contracción y se tornan de coloración oscura (Guimarães y Linden, 2004). Esto coincide con lo observado en células de la interacción CM334-*Pc* donde se presentó el mayor porcentaje de núcleos rojos (30.9%) en comparación con las interacciones compatibles CM334-*Fo* (0.3%) y YW-*Pc* (14.3%). Es posible que en la interacción YW-*Pc* algunas células en las que se observaron núcleos rojos y granulosos también hayan sucumbido por un proceso de MCP, sólo que al presentarse con menor frecuencia (14.3%) en comparación con el genotipo resistente CM334 (30.9%), no se evitó la colonización por el oomiceto. Sin embargo, la posibilidad de que se trate de dos tipos de núcleos rojos con características ultraestructurales diferentes no puede descartarse; de ahí que es necesario verificar bajo microscopía electrónica de transmisión si la ultraestructura de los núcleos rojos de la interacción compatible YW-*Pc* es similar o no a la de la incompatible CM334-*Pc*. Por otro lado, algunas de las características de los núcleos de tipo globoso presentes en la interacción compatible CM334-*Fo* coinciden con las reportadas en interacciones planta-patógeno compatibles, donde los núcleos presentaban un nucléolo grande y prominente o los núcleos no fueron deformados y contenían cromatina menos densa que núcleos de células con MCP (Jones *et al.*, 1974; Kosslak *et al.*, 1997). Estos autores comentan que el núcleo parece ser el primer organelo que reacciona a los estímulos y que los cambios sufridos presumiblemente indican una actividad metabólica nuclear alta. En la presente investigación se encontraron claras diferencias estructurales entre la interacción incompatible CM-334- *Pc* y las interacciones compatibles CM334-*Fo* y YW-*Pc*. A nivel de microscopía de luz, las diferencias en la estructura celular observadas entre las interacciones evaluadas, sugieren que en las interacciones compatibles (YW-*Pc* y CM334-*Fo*) la muerte celular fue producto de la actividad de los metabolitos secretados por el patógeno (a nivel de pared celular), mientras que la muerte celular en la interacción incompatible (CM334-*Pc*) se debió probablemente a una MCP que inhibió el avance del oomiceto a lo largo del tallo de la planta.

contrast, in the CM334-*Pc* incompatible interaction, the collapse progressed to the tissue of the stem pith (but without apparent cell walls degradation) at 24 hpi, and 30.9% of the cells nuclei in the cortex, not collapsed, were red (Fig. 1B). The oomycete hyphae were found between the walls of cortical and medullary tissue of the stem and in 10.9% of the xylem vessel elements. An increased polyphenols accumulation was revealed in the CM334-*Fo* compatible interaction by the cells located in the inoculation site at 48 hpi, in comparison with the incompatible; the cells in contact with them were either totally or partially degraded. A total of 70.8% of the nuclei visible in the cortex, in this interaction, were globose (Fig. 1C), and only 0.3% were red and located at sites with polyphenols accumulation or near the hyphae. Unlike those observed in the incompatible interaction, these latter nuclei maintained large nucleoli (Fig. 1D). The parenchyma was inter and intracellularly invaded by the *Fo* hyphae, and 1.7% of the xylem vessel elements. Almost a third of the stem diameter was collapsed in the YW-*Pc* compatible interaction, by presenting clear cell walls degradation at 24 hpi and the 14.3% of the total nuclei observed in the cortex were red and granular. The hyphae grew intercellularly in the parenchyma cells, and were also observed in 13.2% of the xylem vessel elements.

Since the *Pc* did not systematically moved in CM334, it is inferred that a resistance from the plant to the pathogen was revealed, and that the observed necrosis was due to a rapid and intense HR. Concerning the susceptible Yolo Wonder plants, the whole stem had necrosis and was colonized, also, in the CM334-*Fo* compatible interaction the pathogen grew systematically along the stem, as indicated by the fact that in there was a pathogen development in all of the analyzed segments, confirming CM334 susceptibility to such fungus. Even though necrosis symptoms were revealed in the three evaluated interactions, there were clear structural differences at tissue level, which indicates that the mechanisms responsible for necrosis were different. The cell walls degradation was quite evident since the 12 hpi in the YW-*Pc* and CM334-*Fo* compatible interactions, perhaps due to lytic enzymes activity produced by these pathogens (Roncero *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010), and because the plants defense mechanisms were neither triggered as quickly nor to the extent required in order to defend itself from the attack of the pathogen.

Conversely, in CM334 stem cells *Pc* inoculated, cell walls did not have a higher degradation, although they did experience a collapse. The phenolic compounds accumulation could have contributed to prevent tissue colonization by the oomycete, as it has been reported that the content of soluble phenolic acids in stems of resistant varieties of Chile are associated with resistance to *Pc* (Fernández and Liddell, 1997). Instead, the large phenolic compounds accumulation in the CM334-*Fo* interaction was not sufficient to prevent colonization, probably due to the fact that such compounds were not harmful to the fungus, or because there were differences in the type of phenols accumulated in each case. It is known that the cells nuclei, under different MCP types undergo condensation or

LITERATURA CITADA

- Bonnet J, Danan S, Boudet C, Barchi L, Sage-Palloix A, Caromel B, Palloix A and Lefebvre V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 115: 253-264.
- Feng B, Li P, Wang H and Zhang X. 2010. Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis* 49: 23-31.
- Fernández PS and Liddell CM. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87: 529.
- Glosier BR, Ogundiwin EA, Sidhu GS, Sisco DR and Prince JP. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica* 162: 23-30.
- Guimarães CA and Linden R. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* 271: 1638-1650.
- Jones DR, Graham WG and Ward EWB. 1974. Ultrastructural changes in pepper cells in a compatible interaction with *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 64:1084-1090.
- Kim KH, Yoon JB, Park HG, Park EW and Kim YH. 2004. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathology* 94: 1295-1304.
- Kosslak RM, Chamberlin MA, Palmer RG and Bowen BA. 1997. Programmed cell death in the root cortex of soybean root necrosis mutants. *The Plant Journal* 11: 729-745.
- López CML, Márquez GJ y Murguía SG. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo de Angiospermas. 2a Edición. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Roncero MI, Di Pietro A, Ruiz RMC, Huertas GMD, García MFI, Méglecz E, Jiménez A, Caracuel Z, Sancho ZR, Hera C, Gómez GE, Ruiz RM, González VCI y Páez MJ. 2000. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S47-S53.
- contraction, and become dark colored (Guimarães and Linden, 2004). This is consistent with what has been observed in the CM334-*Pc* interaction, where the highest red nuclei percentage was revealed (30.9%) compared to the CM334-*Fo* (0.3%) and YW-*Pc* (14.3%) compatible interactions. It is possible that in the YW-*Pc* interaction, some of the cells in which red and granular nuclei were observed had also succumbed to an MCP process, but only to appear less frequently (14.3%) compared to the CM334 resistant genotype (30.9%); the oomycete colonization was not prevented. Nevertheless, the possibility that these two types of red nuclei had different structural characteristics cannot be excluded; hence, it is necessary to verify if the red nuclei ultrastructure of the YW-*Pc* compatible interaction is similar or not to CM334-*Pc* incompatible. Furthermore, some of the characteristics of the globose type nuclei present in the CM334-*Fo* incompatible interaction are consistent with those reported in compatible plant-pathogen interactions, where the nuclei had a prominent and large nucleolus, were not deformed, and contained less dense chromatin than the nuclei cells with MCP (Jones *et al.*, 1974; Kosslak *et al.*, 1997). It is discussed by these authors that the nucleus appears to be the first organelle to react to stimuli and that the changes experienced probably indicate a high nuclear metabolic activity. Clear structural differences between the CM-334- *Pc* incompatible interaction and the CM334-*Fo* and YW-*Pc* compatible were revealed in the study hereby. It is suggested by the cellular structure differences observed among the evaluated interactions, at a light microscopy level, that the cellular death observed in the compatible interactions (YW-*Pc* and CM334-*Fo*) was due to the activity of the metabolites secreted by the pathogen (at cellular wall level), whereas the cellular death in the incompatible interaction (CM334-*Pc*) was probably due to an MCP which inhibited the oomycete progress along the stem of the plant.

Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (*Opuntia ficus-indica*) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio

Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladodio

Alba Suaste Dzul, Reyna Isabel Rojas Martínez, Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México, y Daisy Pérez Brito, Centro de Investigación Científica de Yuc., A. C., Laboratorio GeMBio, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97200, México. Correspondencia: rojas@colpos.mx

(Recibido: Diciembre 01, 2011 Aceptado: Febrero 23, 2012)

Suaste DA, Rojas MRI, Zavaleta ME y Pérez BD. 2012. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:72-80.

Resumen. Durante 2010 se detectaron en la zona tunera de Nopaltepec, Estado de México, plantas de nopal con síntomas de deformación y engrosamiento del cladodio, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos en toda la planta o en parte de ella. Dado que el síndrome se ha relacionado con la infección por fitoplasmas, el objetivo de esta investigación fue detectar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia de fitoplasmas en diferentes estratos del cladodio y raíz de plantas de nopal. El ADN extraído de las muestras de plantas con síntomas y asintomáticas, se amplificó primero con los iniciadores universales P1/P7 y P1/Tint, y posteriormente mediante PCR anidada utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, se obtuvo un fragmento de 1 200 pb en todas las muestras con los síntomas antes mencionados. El análisis de los patrones de restricción generados con las endonucleasas *HaeIII*, *KpnI* y *MseI* (*TrU91*), reveló que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII-Mexican periwinkle virescence.

Palabras clave adicionales: *Mollicutes*, PCR anidada, RFLP-PCR, gen 16S rRNA.

Los fitoplasmas son organismos procariontes sin pared celular, Gram positivos, que se encuentran agrupados en la clase *Mollicutes* (Bertaccini *et al.*, 1999; Hogenhout y Segura, 2010). Hasta el momento no se ha logrado su cultivo *in vitro* por lo que su detección, identificación y clasificación se ha realizado mediante el uso de técnicas moleculares como PCR y RFLP y análisis filogenéticos comparando la secuencia del gen ribosomal 16S (Hodgetts *et al.*, 2007). Los fitoplasmas se han asociado con más de 700 enfermedades de importancia económica en plantas hortícolas, forrajeras, ornamentales y silvestres (Weintraub

Abstract. During 2010 in Nopaltepec, Mexico, cactus plants were detected with symptoms of distortion and thickening of the cladode, mosaic, yellowing, proliferation and deformation of fruits in the whole plant or part of it. Since the syndrome has been attributed to phytoplasma infection, the objective of this study was to detect, the presence of phytoplasmas in different strata of the cladode and the roots of cactus plants by Polymerase Chain Reaction (PCR). The DNA extracted from cladodes with symptoms and asymptomatic, was amplified firstly with universal primers P1/P7, and P1/Tint, fragment of phytoplasma 16S rRNA gene, followed by nested PCR using the primers R16F2/R16R2, a fragment of 1 200 bp was obtained. Analysis of restriction patterns generated with endonucleases revealed that the phytoplasma belongs to the Mexican periwinkle virescence-16SrXIII.

Additional Keywords: *Mollicutes*, Nested PCR, RFLP-PCR, 16S rRNA gene.

Résumé. En 2010, dans la région de Nopaltepec, État de Mexico, ont été détectés des plants de figue de barbarie présentant des symptômes de déformation et grossissement du cladode, mosaïque, jaunissement et déformation des fruits sur tout ou partie de la plante. Le syndrome a été associé à une infection occasionnée par phytoplasmes. Le but de cette recherche a été d'identifier par réaction en chaîne par polymérase (PCR) la présence de phytoplasmes dans différents strates du cladode et dans la racine des plants de figue de barbarie. L'ADN extrait d'échantillons de plantes présentant des symptômes et de plantes asymptomatiques, a d'abord été amplifié avec des amorces universelles P1/P7 et amorces P1/Tint, puis par PCR nichée en utilisant des amorces R16F2/R16R2. Un fragment de 1200 pb a été obtenu dans tous les échantillons avec les symptômes ci-dessus. L'analyse des profils de restriction générés par les endonucléases *HaeIII*, *KpnI* et *MseI* (*TrU91*) a révélé que le phytoplasme appartient au groupe 16SRXIII-virescence de la pervenche mexicaine (mexicaine periwinkle virescence).

y Beanland, 2006). En diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Italia, China y Líbano se ha reportado la presencia de fitoplasmas en cactáceas (Bertaccini *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008; Choueiri *et al.*, 2005; Tessitori *et al.*, 2005). En México, algunas ornamentales de *Opuntia* sp. en las que se han detectado fitoplasmas presentan características anatómicas inusuales como son proliferación de brotes, tallos amarillos, mosaicos y coloraciones púrpuras, alteraciones que les confieren un valor económico adicional pues son ofrecidas en altos precios a coleccionistas de cactus en diversos viveros comerciales (Aviña *et al.*, 2009). En la zona de San Martín de la Pirámides, Edo. de México, en el cultivo de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) se ha reportado una enfermedad conocida como "planta macho" atribuida a la presencia de fitoplasmas (Hernández *et al.*, 2009), en los últimos años se le ha considerado como el principal factor limitante de la producción de tunas en el país, ya que las plantas afectadas presentan deformación, proliferación de brotes, engrosamiento y desarrollo de cordiforme del cladodio y detención del crecimiento. En el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se observaron en plantas de nopal tunero síntomas como: engrosamiento, mosaico y amarillamiento, manchas anulares en cladodios, además de proliferación y deformación de frutos que pudieran estar asociados a la presencia de fitoplasmas. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar e identificar mediante PCR-RFLP la presencia de fitoplasmas en nopal tunero con el síndrome descrito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. En una huerta comercial de nopal perteneciente a la comunidad de San Felipe Teotitlán, Municipio de Nopaltepec Edo. de México se colectaron cladodios con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, mosaico, proliferación y deformación de frutos (Figura 1); así como de cladodios asintomáticos. Se obtuvieron un total de 35 cladodios en los meses de enero y julio de 2011, éstos se embebieron en Radix 10 000® (ácido indol-3-butírico 10 000 ppm) y se sembraron en macetas con suelo estéril y se mantuvieron en el invernadero.

Extracción del ADN. Para la extracción de ADN se tomó tejido de la parte superior, media y basal de cada uno de los 35 cladodios colectados con síntomas de engrosamiento, proliferación, deformación de frutos y manchas anulares y de plantas asintomáticas. De las plantas mantenidas en invernadero se tomó tejido radical para llevar a cabo la extracción de ADN.

El ADN se extrajo con el producto DNeasy Mini Kit (QIAGEN®) de la siguiente manera: se pesaron 30-40 mg de tejido y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino sin dejar que la muestra se descongelara. Al tejido macerado se le añadieron 400 µL de buffer de extracción API y se incubó a 65°C en baño de agua (Wheaton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) por 10 min con homogenización ocasional. Después se agregaron 130 µL de buffer AP2 y se incubó durante 5 min en hielo, se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm en una centrifuga Silent SPIN (Continental Lab Products), el sobrenadante se transfirió a una columna QIA shredder Mini Spin, y se volvió a

Mots clés supplémentaires: *Mollicutes*, PCR nichée, RFLP-PCR, gène ARNr 16S.

Phytoplasmas are Gram-positive prokaryotes without a cell wall, that are grouped in the *Mollicutes* class (Bertaccini *et al.*, 1999; Hogenhout and Segura, 2010). Since it is not yet been achieved, isolate phytoplasmas *in vitro*, their detection, identification and classification has been performed by the use of molecular techniques such as PCR, RFLP and phylogenetic analysis comparing the 16S ribosomal gene sequence (Hodgetts *et al.*, 2007). The phytoplasmas have been associated with more than 700 economically important diseases in vegetable, forage, ornamental and wild plants (Weintraub and Beanland, 2006). The presence of cacti phytoplasmas have been reported in different parts of the world like USA, Italy, China and Lebanon (Bertaccini *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008; Choueiri *et al.*, 2005; Tessitori *et al.*, 2005). In Mexico, some ornamental *Opuntia* sp. in which phytoplasmas have been detected showed unusual anatomical features such as proliferation of shoots, yellow stems, purple colorations and mosaics, alterations that confer additional economic value as they are offered at high prices to cacti collectors in various commercial nurseries (Aviña *et al.*, 2009). In the zone of San Martín de las Pirámides in the State of Mexico, a disease attributed to the presence of phytoplasmas known as "male plant disease" has been reported in the cultivation of fig opuntia, also referred to as "prickly pear" (*Opuntia ficus-indica*) (Hernández *et al.*, 2009), in recent years it has been considered as the main limiting factor in the production of tunas in the country, since affected plants show deformation, shoot proliferation, thickening and development of the cordate of the cladodes and growth arrest. In the town of Nopaltepec, State of Mexico, symptoms were observed in prickly pear plants such as; thickening, mosaic and yellow ring shaped spots on cladodes, as well as proliferation and deformation of fruits that may be associated with the presence of phytoplasmas. Based on the foregoing, the objective of this study was to detect and identify by PCR-RFLP the presence of phytoplasmas in indian fig opuntia with the described syndrome.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. In a commercial cacti orchard belonging to the community of San Felipe Teotitlan, Nopaltepec, State of Mexico cladodes with symptoms of thickening, yellowing, mosaic, proliferation and fruit deformation were collected (Figure 1); as well as asymptomatic cladodes. A total of 35 cladodes were obtained in the months of January and July 2011, these were soaked in Radix 10,000® (indole-3-butyric acid 10,000 ppm) and were planted in pots with sterile soil and kept in a greenhouse.

DNA extraction. For the DNA extraction, tissue was taken from the top, middle and the basal parts of each one of the 35 cladodes collected with symptoms of thickening, proliferation, fruit deformation and ring spots and from asymptomatic plants. Root tissue was taken from the plants kept in the greenhouse in order to carry out the DNA

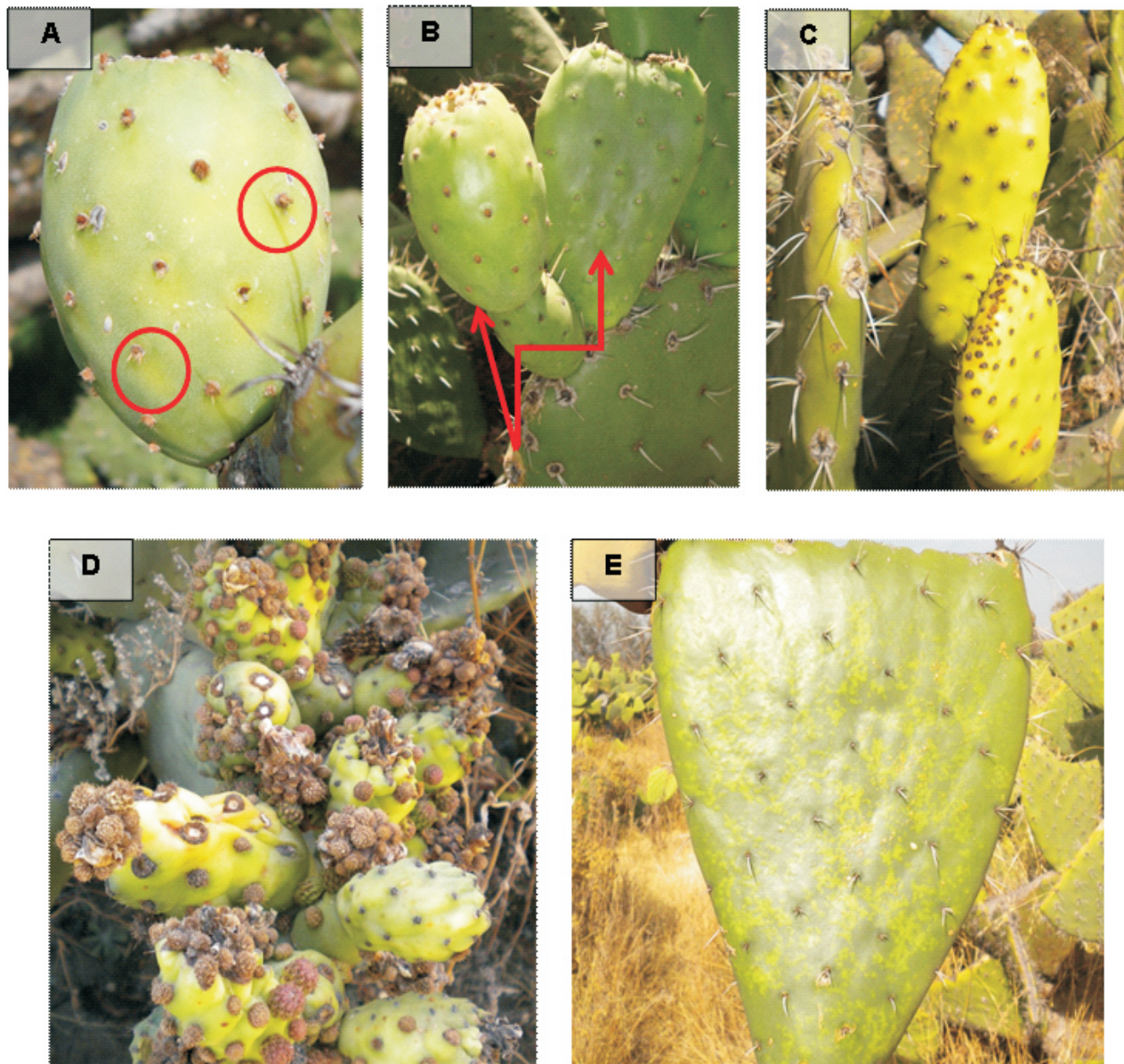


Figura 1. **A.** Síntomas de amarillamiento en fruto. **B.** Deformación del fruto y engrosamiento del cladodio. **C.** Amarillamiento del cladodio. **D.** Proliferación de frutos. **E.** Mosaico en cladodio de nopal tunero.

Figure 1. **A.** Symptoms of yellowing in fruit. **B.** Deformation of the fruit and thickening of the cladode. **C.** Yellowing of the cladode. **D.** Proliferation of fruit. **E.** Mosaic in a fig opuntia cladode.

centrifugar a 14 000 rpm durante 2 min. El nuevo sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf estéril. Posteriormente se agregaron 1.5 µl del buffer AP3 y se transfirió a la columna DNeasy Mini Spin, centrifugándose por 1 min a 8 000 rpm. Una vez capturado el ADN, la columna se lavó dos veces en 500 µL del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm. La columna se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de buffer AE (previamente calentado a 65°C), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.

La determinación de la calidad e integridad del ADN

extraction.

The DNA was extracted with the DNeasy Mini Kit (QIAGEN©) in the following manner: 30-40 mg of tissue was weighed and macerated with liquid nitrogen until a fine powder was obtained without letting the sample thaw. 400 µL of AP1 extraction buffer was added to the macerated tissue and incubated at 65°C in a water bath (Wheaton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) for 10 min with occasional homogenization. 130 µL of AP2 buffer were then added and incubated in ice for 5 min, it was centrifuged for 5 min at 14,000 rpm in a Silent SPIN centrifuge (Continental Lab Products), the supernatant was transferred to a

se hizo en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris acetato-EDTA) mediante electroforesis a 90 V por 40 min y la cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 V 3.2.1) según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Detección de fitoplasmas por PCR. Debido a la baja concentración de estos patógenos dentro de la planta, para detectar su presencia es necesario realizar una doble amplificación por PCR. En la primera reacción (PCR directa) se utilizó el par de iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995) que amplifican un fragmento de 1 800 pb, y la combinación de iniciadores P1/Tint (Smart *et al.*, 1996) que amplifican un fragmento de 1 600 pb, en un volumen de reacción final de 25 µL, que contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Biogénica), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ (Biogénica), 20 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 1U de ADN polimerasa Amplificasa® (Biogénica) y 200 ng de ADN objetivo. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Techne® TC-300, con un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 54 °C y 2 min a 72 °C, y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C.

Para aumentar la sensibilidad de detección, se realizó una segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S rDNA de los fitoplasmas, como molde se utilizó el ADN el producto de amplificación de la primera reacción de PCR, diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)] empleándose las mismas concentraciones y reactivos que en la PCR directa. La amplificación se desarrolló en un termociclador Techne® TC-300, iniciando con una desnaturalización de 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 1.5 min a 53 °C y 72 °C durante 1.5 min, y un paso final de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos (1 200 pb) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en amortiguador TAE 1X a 100 V por 50 min, previamente teñido con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue de 100 pb (Roche®). Las imágenes del gel se visualizaron y analizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UV (Bio Rad®, Gel Doc 2000) con el programa QuantityOne 4.1.1. En todos los casos se utilizó como control positivo ADN de coco infectado con el fitoplasma del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC). Como control negativo se utilizó agua bidestilada estéril libre de DNAsas y RNAsas.

RFLP-PCR. Para determinar el grupo al cual pertenece el fitoplasma detectado, el fragmento amplificado se sometió a un análisis de RFLP. El fragmento se digirió con las endonucleasas de restricción *AluI*, *HaeII*, *HaeIII*, *KpnI*, *Tru91* y *Tsp5091* (Promega® Madison WI, EU) y los productos de restricción se separaron en geles de agarosa 1.5 % teñidos con bromuro de etidio. Los patrones de RFLP obtenidos se compararon con los reportados en la literatura (Lee *et al.*, 1998).

Secuenciación y análisis del gen 16 S rDNA. El producto de la PCR anidada se purificó (Wizard Promega®)

QIAshredder Mini Spin Column, and was once again centrifuged at 14,000 rpm for 2 min. The new supernatant was placed into a sterile eppendorf tube. Subsequently, 1.5 µL of AP3 buffer were added and transferred to the DNeasy Mini Spin Column, being centrifuged for 1 min at 8,000 rpm. Once the DNA was captured, the column was washed twice in 500 µL of AW buffer and was centrifuged for 2 min at 14,000 rpm. The column was transferred to a 1.5 mL sterile eppendorf tube, 50 µL of AE buffer were added (pre-heated to 65 °C), it was incubated for 5 min at room temperature and was then centrifuged for 1 min at 8,000 rpm.

The determination of the quality and integrity of the DNA was made via agarose gel at 1% (w/v) in 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer by electrophoresis at 90 v for 40 min and the quantification of the DNA was performed on a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 V 3.2.1) according to the method described by Sambrook *et al.* (1989).

Phytoplasma detection through PCR. Due to the low concentration of these pathogens within the plant, it is necessary to perform a double amplification by PCR to detect their presence. In the first reaction (direct PCR) a pair of universal primers were used, P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Schneider *et al.*, 1995) which amplify a 1800 bp fragment, and the P1/Tint primer combination (Smart *et al.*, 1996) which amplify a 1600 bp fragment in a final reaction volume of 25 µL that contained 1X of PCR buffer (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Biogénica), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂ (Biogénica), 20 pmol of each primer (Invitrogen®), 1 U of Amplificasa® DNA polymerase (Biogénica) and 200 ng of objective DNA. The amplification was carried out in a Techne® TC-300 thermal cycler, with an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1.5 min at 54 °C and 2 min at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C.

To increase the detection sensitivity, a second amplification was performed (nested PCR) with primers R16F2/R16R2 (Gundersen and Lee, 1996) that amplify the 16s rDNA region of the phytoplasmas, the product DNA of the amplification of the first PCR reaction was used as a template, diluted in distilled sterile water [1:20 (v/v)] using the same concentrations and reactions as in the direct PCR. The amplification was carried out in a Techne® TC-300 thermal cycler, starting with a denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 1.5 min at 53 °C and 1.5 min at 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C. The amplification products obtained (1200 bp) were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel (w/v) in TAE 1X primer at 100 V for 50 min, previously dyed with ethidium bromide. The molecular weight marker used as reference was 100 bp (Roche®). The gel images were viewed and analyzed with ultraviolet light in a UV photo documentation system (Bio Rad®, Gel Doc 2000) with the QuantityOne 4.1.1. program. In all cases, DNA from coconuts infected with phytoplasmas of the Lethal Yellowing Disease of Coconut was used as the positive control and DNAsas/RNAsas-free bi-distilled water was used as the negative control.

RFLP-PCR. In order to determine the group to

y se secuenció (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®). Las secuencias del 16S rADN obtenidas se compararon con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

RESULTADOS

El ADN genómico total de las 35 muestras procesadas mostró buena integridad y calidad con una concentración que varió de 300 hasta 900 ng μL^{-1} , lo cual puede considerarse un excelente rendimiento si se tiene en cuenta que la planta de nopal posee grandes cantidades de carbohidratos, compuestos hidrofílicos y mucílago que dificultan la extracción de los ácidos nucleicos (Nobel *et al.*, 1992). Los valores de pureza fueron de 1.7 a 2, indicando mínima presencia de contaminantes, fenoles y taninos, que dificultan la extracción de ADN de calidad e inhiben la reacción de PCR (Tapia *et al.*, 2005). En las muestras provenientes de los diferentes estratos (superior, medio y basal) de los 35 cladodios sintomáticos y asintomáticos no se logró detectar la presencia de fitoplasmas, la detección fue positiva solamente en las muestras de raíces de plantas de nopal.

En la primera reacción de PCR con los iniciadores

which the detected phytoplasma belongs, the amplified fragment was subjected to RFLP analysis. The fragment was digested with the *AluI*, *HaeII*, *HaeIII*, *KpnI*, *Tru91* and *Tsp5091* restriction endonucleases (Promega® Madison WI, USA) and the products of the restriction were separated in agarose (1.5%) gels dyed with ethidium bromide. The obtained RFLP patterns were compared with those reported in literature (Lee *et al.*, 1998).

Sequencing and analysis of the 16S rDNA gene.

The product of the nested PCR was purified (Wizard Promega®) and sequenced (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®). The obtained sequences of the 16s rDNA were compared against those in the GenBank, using the BLAST tool of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

RESULTS

The total genomic DNA of the 35 samples processed showed good integrity and quality with a concentration ranging from 300 to 900 ng μL^{-1} , which can be considered an excellent yield when you consider that the cactus plant has large amounts of carbohydrates, hydrophilic compounds and mucilage which hinder the extraction of nucleic acids (Nobel *et al.*, 1992). The purity values indicated minimal

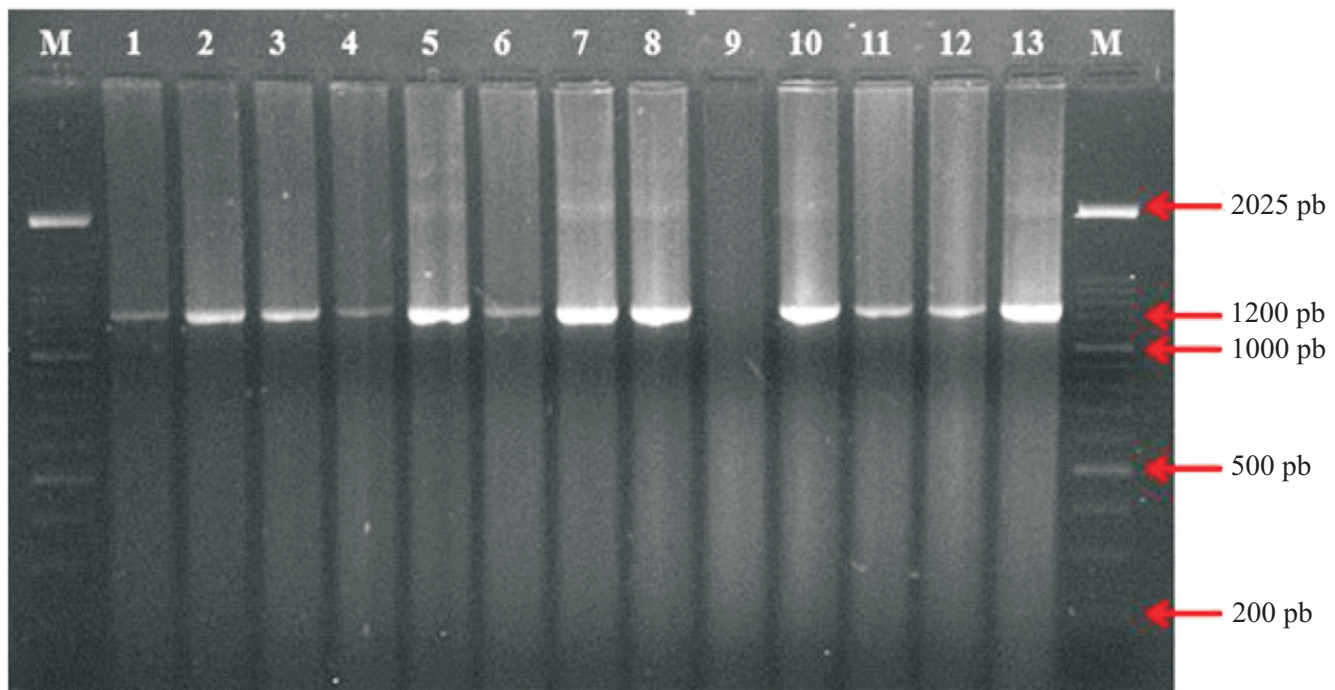


Figura 2. Gel de agarosa al 1% evidenciando los productos de amplificación de la PCR anidada con los iniciadores R16F2/R16R2 para muestras de nopal tunero procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 100 pb; 1-12) muestras Np01, 02, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 07, 16, 17 y 26; 13) control positivo ADN de coco infectado con el fitoplasma del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Figure 2. One percent agarose gel showing the nested PCR amplification products using primers R16F2/R16R2 for fig opuntia samples from Nopaltepec, State of Mexico. Line M) 100bp molecular marker; 1-12) samples Np01, 02, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 07, 16, 17 and 26; 13) Positive control, coconut DNA infected with the phytoplasma of the Lethal Yellowing Disease of Coconut.

P1/P7, se observó el producto de amplificación de 1 800 pb en el control positivo y sólo en cinco de las muestras analizadas.

Con el par de iniciadores P1/Tint, el producto de amplificación esperado de 1 600 pb siempre se obtuvo tanto en las muestras de tejido radical de plantas enfermas como en el control positivo del Amarillamiento Letal del Cocotero (datos no mostrados). En la Figura 2, se observan fragmentos de 1 200 pb obtenidos con PCR anidada que se reportan para establecer la presencia de fitoplasmas sp. (Líneas 1-8, y 10-13), en esta última se ubicó el control positivo para ALC (línea 13). De las 35 muestras de nopal analizadas por PCR anidada en este estudio, 34 resultaron positivas a fitoplasmas sp. (Cuadro 1). La comparación de la secuencia de nucleótidos, utilizando el programa BLAST, del fragmento amplificado con las reportadas en la base de datos del GenBank indicó que el genoma amplificado corresponde a la secuencia nucleotídica de un fitoplasma. El análisis de RFLP obtenidos con las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *KpnI* y *MseI* (*TrU91*), indicó que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence) (Lee *et al.*, 1998) (Figura 3).

DISCUSIÓN

Los síntomas de engrosamiento, proliferación y de formación de frutos han sido asociados a la presencia de fitoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009); sin embargo, en las plantas colectadas en la zona tunera de San Felipe Teotitlán, Edo. de México, también se detectó la presencia de virus en muestras de nopal con mosaico y amarillamiento (datos no publicados). Lo anterior indica que la sintomatología observada puede ser producto de la coinfección de las plantas de nopal por virus y fitoplasmas, de ahí que el diagnóstico basado solamente en síntomas puede ser impreciso.

Es bien conocido que los fitoplasmas se encuentran en tejido del floema de la planta y con frecuencia en bajos títulos (Harrison *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000) por lo que en muchas ocasiones no se pueden detectar en la primera PCR, en nuestro caso con el uso del par de iniciadores P1/Tint se logró amplificar siempre el gen ribosomal 16S del fitoplasma en la PCR directa, aunque en algunas casos, el producto de amplificación se observó tenue. La irregularidad en la detección en la primera reacción de amplificación, posiblemente se debió a que el fitoplasma se encontraba en baja concentración (Hodgetts *et al.*, 2007). En el caso de la muestra Np07 no se detectó la presencia del fitoplasma ni en la PCR directa ni en la PCR anidada a pesar de presentar el síntoma de engrosamiento, lo cual pudiera deberse a la baja titularidad del patógeno en la planta. La dificultad para detectar al fitoplasma en los cladodios del nopal se puede explicar porque la distribución de los mismos en la planta varía según la época del año. En el caso del declinamiento del peral (Pear Decline Phytoplasma) ocasionado por fitoplasmas se ha observado que éstos ya no se detectan en las partes aéreas de los árboles durante los meses de invierno debido a las bajas temperaturas y que sobreviven en las raíces nuevas para recolonizar el tallo y las ramas en la primavera siguiente.

Cuadro 1. Relación de muestras de nopal tunero con diferentes síntomas y resultados de la detección de fitoplasmas por PCR.

Table 1. List of prickly pear samples with different symptoms and results of phytoplasma detection by PCR.

Clave	Síntoma	Fitoplasma
Np01	Engrosamiento	+
Np02	Asintomática	+
Np03	Asintomática	+
Np04	Asintomática	+
Np05	Proliferación	+
Np06	Proliferación	+
Np07	Engrosamiento	-
Np08	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np09	Engrosamiento y mosaico	+
Np10	Mosaico y proliferación	+
Np11	Amarillamiento	+
Np12	Mosaico	+
Np13	Mosaico y deformación cladodio	+
Np14	Asintomática	+
Np15	Engrosamiento y mosaico	+
Np16	Engrosamiento y mosaico	+
Np17	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np18	Engrosamiento	+
Np19	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np20	Engrosamiento y mosaico	+
Np21	Amarillamiento	+
Np22	Mosaico	+
Np23	Engrosamiento y mosaico	+
Np24	Engrosamiento y mosaico	+
Np25	Mosaico	+
Np26	Mosaico	+
Np27	Engrosamiento y mosaico	+
Np28	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np29	Amarillamiento y deformación de frutos	+
Np30	Mosaico	+
Np31	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np32	Engrosamiento y mosaico	+
Np33	Engrosamiento y mosaico	+
Np34	Mosaico y proliferación	+
Np35	Amarillamiento	+

presence of polysaccharides, phenoles and tannins, which makes difficult the extraction of quality DNA difficult and inhibit the PCR reaction (Tapia *et al.*, 2005). In the samples from the different levels (upper, middle and base) of the 35 symptomatic and asymptomatic cladodes, detection of the presence of phytoplasma was not achieved, detection was positive only in samples from the roots of the cacti.

In the first PCR reaction with the P1/P7 primers, the amplification product of 1800 bp was observed in the positive control and only in five of the analyzed samples.

With the P1/Tint primer pair, the expected amplification product of 1600 bp was always obtained in the radical tissue samples of sick plants as well as in the positive

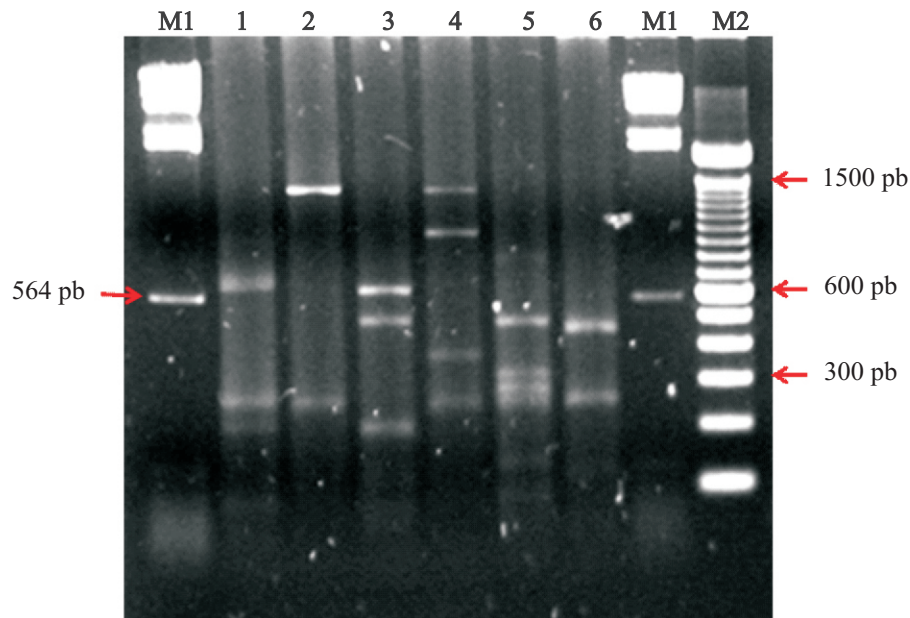


Figura 3. Carriles 1-6. Análisis de los patrones de restricción (RFLP-PCR) a partir de los productos de amplificación de la PCR anidada (R16F2/R16R2) para muestras de nopal tunero con síntomas de engrosamiento, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos del cladodio procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Los productos de PCR fueron digeridos con *AluI* (línea 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Línea M1: Marcador molecular Lambda DNA digerido con *HindIII*. Línea M2: Marcador molecular 100 pb.

Figure 3. Lanes 1-6. Analysis of restriction patterns (RFLP-PCR) from the nested PCR amplification (R16F2/R16R2) for fig opuntia samples with symptoms of thickening, mosaic, yellowing, proliferation and deformation of fruit of the cladodes from Nopaltepec in the State of Mexico. The PCR products were directed with *AluI* (line 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Line M1: Lambda molecular DNA marker directed with *HindIII*. Line M2: 100 bp molecular marker.

Este comportamiento se explica por la nula producción de nuevos elementos cribosos y la disminución considerable de la actividad de los elementos maduros durante el invierno (Errea *et al.*, 2002). El Mulberry Dwarf Phytoplasma tampoco se detecta durante el invierno en los órganos reproductores y las yemas de árboles de mora pero sí en las raíces (Jian *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en las cuatro muestras de nopal asintomáticas también se encontraron fitoplasmas, por lo que es necesario emplear técnicas moleculares para la detección precisa y confiable de este tipo de patógenos, sobre todo durante el proceso de obtención de material propagativo para el establecimiento de nuevas plantaciones. En campo, la presencia de plantas asintomáticas puede tener implicaciones importantes en el progreso temporal y espacial de la enfermedad. El síntoma de engrosamiento del cladodio se reportó por vez primera en México y posteriormente se encontró en Sudáfrica e Italia, sin que se conociera al agente causal (Pimienta, 1990); otros síntomas mostrados por las plantas afectadas incluían proliferación de flores, deformación y amarillamiento de cladodios jóvenes. Hernández *et al.* (2009) reportaron que el fitoplasma asociado con el síndrome de engrosamiento y proliferación del nopal tunero en San Martín de las Pirámides, Estado de México, pertenece al grupo 16SrII, mientras que en la

control of the Lethal Yellowing Disease of Coconut (LYC) (data not shown). In Figure 2, 1200 bp fragments are observed, obtained with Nested PCR, that are reported to establish phytoplasma sp. presence (Lines 1-8, and 10-13), the positive control for the LYC was placed in the last (line 13). Of the 35 cactus samples analyzed by Nested PCR in this study, 34 were positive for phytoplasmas sp. (Table 1). The nucleotide sequence comparison using the BLAST program of the amplified fragment with those reported in the GenBank database indicated that the amplified genome corresponds to the nucleotide sequences of a phytoplasma. The RFLP analysis obtained with the *HaeIII*, *KpnI* and *MseI* (*TrU91*) restriction endonucleases indicated that the phytoplasma belongs to the 16SeXIII group (Mexican periwinkle virescence) (Lee *et al.*, 1998) (Figure 3).

DISCUSSION

The symptoms of thickening, proliferation and deformation of the fruit have been associated to the presence of phytoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009); however, in the plants collected in the cacti orchard zone of San Felipe Teotitlan, in the State of Mexico, the presence of virus was detected in cacti samples with mosaic and yellowing symptoms (data not published). The previous fact indicated that the observed symptomatology may be

presente investigación la secuencia obtenida correspondió al grupo 16SrXIII; esto sugiere que más de un grupo de fitoplasmas puede estar asociado con esta enfermedad.

CONCLUSIONES

En cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento, proliferación, mosaico y amarillamiento provenientes del municipio de Nopaltepec, Edo. de México, se detectó mediante PCR de manera consistente la amplificación del genoma de fitoplasmas, la comparación de secuencias y el análisis de RFLP indicó que se trata de un fitoplasma del grupo 16SrXIII.

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar beca al primer autor del artículo durante los estudios de maestría.

LITERATURA CITADA

- Aviña PK, Parra CF, Ochoa SJC, Perales SC and Martínez SJP 2009. Phytoplasmas associated to diseases of ornamental cacti in Mexico. *Journal of Biological Sciences* 9:268-271.
- Bertaccini A, Calari A, and Felker P. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- Bertaccini A, Fránová J, Paltrinieri S, Martín M, Navrátil L, Nebesárova C and Simkova J. 1999. Leek proliferation: a new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology* 105:487-493.
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1448-1457.
- Choueiri E, Massad R and Jreijiri F. 2005. First report of a 16SrII group phytoplasma associated with shoot proliferation of a cactus (*Opuntia monacantha*) in Lebanon. *Plant Disease* 89:1129-1129.
- Deng S, and Hiruki C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81:1475-1479.
- Gundersen DE and Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Harrison NA, Myrie W, Jones P, Carpio ML, Castillo MM, Doyle M, and Oropeza C. 2002. 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of the Applied Biology* 141:183-193.
- Hernández PR, Noa CJC, Gaspar R, Mata P and Flores EN. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9:62-66.
- Hodgetts J, Ball T, Boonham N, Mumford R and Dickinson M. 2007. Use of terminal restriction fragment length

product of the co-infection of cacti plants by virus and phytoplasmas, therefore the diagnostic based solely on symptoms may be imprecise.

It is well known that phytoplasma are found in the ploem of the plant and frequently in very low concentrations (Harrison *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000) for which in many occasions they cannot be detected in the first PCR, in our particular case and with the use of the primer pair P1/Tint, the ribosomal 16S gene of the phytoplasma was always successfully amplified in the direct PCR although in some cases the amplification product was very dim. The variation in the detection in the first amplification reaction was possibly due to the fact that the phytoplasma was found in a very low concentration (Hodgetts *et al.*, 2007). In the case of sample Np07 the presence of phytoplasma was not detected in the direct PCR nor in the nested PCR in spite of presenting symptoms of thickening, which could be due to the low concentration of the pathogen in the plant. The difficulty to detect the phytoplasma in the cacti cladodes can be explained by their distribution in the plant which varies according to the season of the year. In the case of the Pear decline produced by phytoplasmas, it has been observed that these are not detected anymore in the aerial parts of the trees during the winter months due to the low temperatures and that they survive in the new roots in order to re-colonize the stalk and branches the following spring. This behavior is explained by the null production of new sieve elements and the considerable reduction of the activity of the mature elements during winter (Errea *et al.*, 2002). The Mullberry Dwarf Phytoplasma is also not detected during winter in the reproductive organs and the buds of blackberry trees, but are detected in the roots (Jian *et al.*, 2004).

It is important to point out that in the four samples of asymptomatic cactus, phytoplasmas were also detected, because of this, it is necessary to employ molecular techniques for the precise and trustworthy detection of this type of pathogens, above all during the obtention of propagation material for the establishment of new plantations. In the field, the presence of asymptomatic plants may have important implications in the time-space progress of the disease. The thickening of the cladode was a symptom that was reported for the first time in Mexico and later found in South Africa and Italy, although no causal agent was known at that time (Pimienta, 1990); other symptoms shown by the affected plants included proliferation of the flowers, deformation and yellowing of young cladodes. Hernández *et al.* (2009) reported that the phytoplasma associated with the thickening and proliferation syndrome of the fig *Opuntia* in San Martín de las Pirámides, State of Mexico, belonged to the 16SrII group, whilst in the present investigation the obtained sequence corresponded to the 16SrXIII group; this suggests that more than one group of phytoplasma may be associated with the disease.

CONCLUSIONS

In prickly pear cladodes with symptoms of thickening, proliferation, mosaic and yellowing from the town of Nopaltepec in the State of Mexico, the amplification of the phytoplasma genome was detected through PCR in a

- polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant Pathology* 56:357-365.
- Hogenhout SA and Segura M. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics-What have we learnt? pp.19. In: P.G. Weintraub, and P. Jones (eds.). *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Vol. I. CAB International. Cambridge, Massachusetts, USA. 331 p.
- Jiang H, Wei W, Saiki T, Kawakita H, Watanabe K and Sato M. 2004. Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. *Journal of General Plant Pathology* 70:168-173.
- Lee IM, Gundersen-Rindal D, Davis RE and Bartoszyk I. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M and Gundersen DE. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Bethesda MD, USA. (Consulta, noviembre 2011).
- Nobel PS, Cavalier J and Andrade J.L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *Journal of Experimental Botany* 43: 641-648.
- Pimienta BE 1990. *El nopal tunero*. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Sambrook DJ, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Third edition. Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 728 p.
- consistent manner, the sequence comparison and RFLP analysis indicated that it is a phytoplasma from the 16SrXIII group.

Acknowledgements. To CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for the scholarship granted to the first author of the article.

-
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD and Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pp.369-379. In: S. Razin S and Tully JG (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Vol. I. Academic Press, New York, USA. 483 p.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E and Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma specific PCR primers based on sequence of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Tapia TR, Quijano RA, Rojas HR, Larqué SA and Pérez BD. 2005. A fast, simple and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Molecular Biotechnology* 31:137-139.
- Tessitori M, Masenga V and Marzachi C. 2005. First report of a phytoplasma associated with abnormal proliferation of cladodes in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in Italy. *Plant Disease* 11:47.
- Wei W, Kawakita H and Sato M. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. *Journal of Sericultural Science of Japan* 69:261-269.
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111.

Análisis de la Sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Banano a los Fungicidas Benomyl, Propiconazol y Azoxistrobin

Sensitivity Analysis *in vitro* of *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka of Banana to the Fungicides Benomyl, Propiconazole and Azoxystrobin

Gilberto Manzo Sánchez, Heriberto Carrillo Madrigal, Salvador Guzmán González, Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Laboratorio de Biotecnología, Apdo. Postal 36, Autopista Colima-Manzanillo km 40, Tecmán, Col., CP 28100, México; **Mario Orozco Santos**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Tecmán, Apdo Postal 88, Tecmán, Col., CP 28100, México. Correspondencia: gilberto_manzo@yahoo.com

(Recibido: Junio 07, 2010 Aceptado: Septiembre 02, 2011)

Manzo SG, Carrillo MH, Guzmán GS y Orozco SM. 2012. Análisis de la sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la sigatoka negra del banano a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxistrobin. Revista Mexicana de Fitopatología 30:81-85.

Resumen. Los aislados fueron obtenidos de las regiones productoras de banano de *Mycosphaerella fijiensis* pertenecientes a los estados de Chiapas, Tabasco, Michoacán, Colima y Guerrero. Los fungicidas evaluados fueron benomyl, propiconazol y azoxistrobin. Por otra parte, el análisis de sensibilidad a los fungicidas presentó la pérdida de sensibilidad de 10 aislados a benomyl, siete a propiconazol y nueve a azoxistrobin. Dichos aislados fueron capaces de crecer a las concentraciones que indican la pérdida de sensibilidad. De acuerdo con los resultados de esta investigación, es importante acatar las recomendaciones para el uso de los fungicidas a fin de evitar fallas en el control de la enfermedad. En el caso del benomyl, su uso deberá ser restringido en las localidades que presentaron aislados resistentes.

Palabras clave adicionales: Control químico, *Musa*, pérdida de sensibilidad.

La Sigatoka negra cuyo agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, enfermedad que provoca mayor impacto, debido a la alta demanda de uso de fungicidas necesarios para contrarrestar sus efectos y producir fruta de calidad para exportación (Orozco, 1998; Marín *et al.*, 2003). Esta enfermedad provoca un deterioro paulatino del área foliar, que progresa hacia el desarrollo de una fuerte necrosis (Manzo *et al.*, 2005). Para el control de la enfermedad los fungicidas usados en aplicaciones aéreas son: triazoles (propiconazol, tebuconazol y bitertanol), morfolinas

Abstract. The isolates of were obtained from the banana-producing regions *Mycosphaerella fijiensis* belonging to Chiapas, Tabasco, Michoacan, Colima and Guerrero states. The fungicides evaluated were benomyl, propiconazole and azoxystrobin. The susceptibility analysis showed the loss of fungicide susceptibility of 10 isolates to benomyl, seven to propiconazole and nine to azoxystrobin. These isolates were able to grow with fungicide concentration that highlights the loss of sensitivity. According to the results of this research, it is important to respect the recommendations for the use of fungicides to avoid failures in the control of the disease. In the case of benomyl, its use should be restricted in locations that had resistant isolates.

Additional Keywords: chemical control, *Musa*, sensibility loss.

Résumé. Des isolats de *Micospharella fijiensis*, l'agent causal de la cercosporiose noire ont été obtenus à partir des régions productrices de bananes appartenant aux États de Chiapas, Tabasco, Michoacán, Colima et Guerrero. Les fungicides testés étaient le benomyl, le propiconazole et l'azoxistrobine. L'analyse a montré la perte de sensibilité aux fungicides de dix isolats pour le benomyl, sept pour le propiconazole et neuf pour l'azoxystrobine. Ces isolats ont été capables de pousser en présence de concentrations en fungicides suffisantes à démontrer leur perte de sensibilité. D'après les résultats, il est important de suivre les recommandations pour l'utilisation des fungicides, afin d'éviter les complications dans le contrôle de la maladie. Dans le cas du benomyl, son utilisation devrait être réduite dans les zones qui ont présenté des isolats résistants.

Mots-clés supplémentaires: contrôle chimique, *Musa*, perte de sensibilité.

(tridemorf), benzimidazoles (benomyl) y estrobirulinas (azoxistrobin y trifloxistrobin) (Marín *et al.*, 2003). Para llevar a cabo un manejo de riesgos de evitar la resistencia del patógeno a fungicidas, se ha implementado el uso de estrategias donde se involucra la alternancia de los fungicidas (Orozco, 1998; Romero y Sutton, 1997; FRAC, 2008). Desde hace algunos años se ha detectado la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a carbendazim y benomyl (Fullerton y Tracey, 1984; Romero y Sutton, 1997); incluso se ha demostrado que la resistencia a benomyl persiste aún después de que cesan las aplicaciones por períodos de tres a cinco años (Romero y Sutton, 1997). Igualmente ha sido señalada la resistencia a propiconazol (Romero y Sutton, 1998) y azoxistrobin (Chin *et al.*, 2001). Cabe indicar que la evaluación de sensibilidad a fungicidas es importante para la elaboración de sistemas de preaviso, que permitan alertar a los productores sobre las necesidades de suspender o no la aplicación de un determinado fungicida. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue analizar la sensibilidad *in vitro* de aislados de *M. fijiensis* a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxystrobin. Para el análisis de la sensibilidad de los fungicidas fueron seleccionadas 11 aislados de *M. fijiensis* de los estados de Colima, Michoacán, Guerrero, Tabasco y Chiapas. Los fungicidas usados fueron los siguientes: propiconazole (Tilt®, Syngenta), benomyl (Benlate®, E. I. DuPont de Nemours) y azoxystrobin (Bankit®, Syngenta). Las soluciones stock de los fungicidas fueron preparadas diluyendo una solución concentrada de 1 g L⁻¹. Se utilizaron 0.3, 1, 5 y 10 ppm de i.a. de benomyl (Romero y Sutton, 1997; FRAC, 2008), 0.003, 0.01, 0.1, 1 y 3 ppm de i.a. de propiconazol (Romero y Sutton, 1998) y 0.1, 3 y 10 de azoxistrobin (Sierotzki *et al.*, 2000). Las concentraciones se adicionaron al medio PDA (por calor húmedo a 121°C durante 15 min), el cual fue vaciado en cajas Petri, donde posteriormente se colocaron las colonias monospóricas, con un diámetro de 0.1 mm aproximadamente y de cuatro a cinco días de crecimiento. Se utilizaron como testigo cajas Petri con PDA sin fungicida. La sensibilidad de cada uno de los aislados de *M. fijiensis* se determinan con base en el crecimiento basal de las colonias, midiendo el diámetro de las mismas con ayuda de un microscopio (Olympus CH300) adaptado un micrometro, las lecturas se hicieron tomando el día cero y a los siete días después del cultivo (Romero y Sutton, 1998). Los tratamientos se evaluaron de forma separada, es decir, por fungicida bajo un diseño factorial (factor A, aislados del hongo y factor B, concentraciones de fungicidas) con arreglo combinatorio y distribución completamente al azar. Para cada concentración de fungicida se emplearon cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una caja Petri con cinco colonias monospóricas. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey al 0.05 de probabilidad, empleando el paquete estadístico SAS (SAS, 1998). La sensibilidad a los fungicidas indica la dosis sobre la cual no debe de existir crecimiento del hongo en condiciones *in vitro*, de ocurrir crecimiento alguno, se reconoce que existe resistencia del patógeno hacia el fungicida (FRAC, 2008; Romero y Sutton, 1997; Romero y Sutton, 1998; Sierotzki *et al.*,

Black Sigatoka, whose causal agent is the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, disease that causes a great impact, due to the high demand of use of fungicides to counteract its effects in order to produce export-quality fruit (Orozco, 1998; Marín *et al.*, 2003). This disease causes a gradual deterioration of the leaf area, that progresses into the development of a strong necrosis (Manzo *et al.*, 2005). To control the disease, the fungicides used in aerial applications are: triazoles (propiconazole, tebuconazole and bitertanol), morpholines (tridemorph), benzimidazoles (benomyl) and strobilurins (azoxystrobin and trifloxystrobin) (Marín *et al.*, 2003). To carry out a risk management program to prevent pathogen resistance to fungicides, the use of strategies involving the alternation of fungicides were implemented (Orozco, 1998; Romero and Sutton, 1997; FRAC, 2008). In recent years, decreased sensitivity of *M. fijiensis* to carbendazim and benomyl has been detected (Fullerton and Tracey, 1984; Romero and Sutton, 1997); it has been demonstrated that the resistance to benomyl persists even after the cessation of applications for periods of three to five years (Romero and Sutton, 1997). Resistance to propiconazole (Romero and Sutton, 1998) and azoxystrobin (Chin *et al.*, 2001) have also been reported. It should be noted that the evaluation of sensitivity to fungicides is important for the development of warning systems, that allow to warn the producers of the need to stop or not the application of a certain fungicide. Therefore, the objective of the present study was to analyze the *in vitro* sensitivity of *M. fijiensis* isolates to the fungicides benomyl, propiconazole and azoxystrobin. Eleven isolates of *M. fijiensis* were selected for the fungicide sensitivity analysis from the states of Colima, Michoacan, Guerrero, Tabasco and Chiapas. The fungicides used were the following: propiconazole (Tilt®, Syngenta), benomyl (Benlate®, DuPont) and azoxystrobin (Bankit®, Syngenta). The stock solutions were prepared by diluting a concentrated solution of 1 g L⁻¹ of fungicide. 0.3, 1, 5 and 10 ppm were used of the a.i. benomyl (Romero and Sutton, 1997; FRAC, 2008), 0.003, 0.01, 0.1, 1 and 3 ppm of a.i. propiconazole (Romero and Sutton, 1998) and 0.1, 3 and 10 ppm of a.i. azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000). The concentrations were added to PDA medium (by moist heat at 121°C during 15 min), which was poured into Petri dishes where the monosporic colonies were later placed, with a diameter of approximately 0.1 mm and from four to five days of growth. Petri dishes with PDA without fungicide were used as control. The sensitivity of each one of the isolates of *M. fijiensis* was determined based on the basal growth of the colonies, measuring their diameter with the aid of a microscope (Olympus CH300) with an adapted micrometer, the readings were taken from day zero and at seven days after culture (Romero and Sutton, 1998). The treatments were evaluated separately, *ie* by fungicide under a factorial design (factor A, isolates of the fungi and factor B, concentrations of the fungicides) with a combinatorial design and completely random distribution. Four replications were used for each concentration of every fungicide.

The experimental unit was a Petri dish with five monosporic colonies. The obtained data was submitted to

2000).

Para el caso de benomyl se determinó que 10 aislados mostraron resistencia al fungicida (Cuadro 1), ya que fueron capaces de crecer a la dosis de 10 ppm. Existen reportes en donde se ha detectado la pérdida de sensibilidad a benomyl de algunos aislados de diversos orígenes geográficos, como en las Islas del Pacífico (Fullerton y Tracey, 1984), Costa Rica (Romero y Sutton, 1998) y Colombia (Cañas *et al.*, 2006). En general, los fungicidas de contacto son inhibidores de múltiples sitios de acción y tienen un bajo riesgo de desarrollar resistencia. Pero el uso continuo e indiscriminado de este tipo de fungicidas sin rotación o alternancia con otros tipos de fungicidas podría desarrollar resistencia al hongo. La mayoría de las localidades muestreadas tienen un historial de aplicaciones de benomyl, pero en algunos casos, este fungicida ya no es utilizado para el control de Sigatoka negra. Sin embargo, se ha determinado que la resistencia a benomyl persiste aún después de que cesan las aplicaciones del fungicida por períodos de tres a cinco años (Romero y Sutton, 1998). En cambio, en el caso de propiconazole, se determinó que siete aislados crecieron a la dosis de 1 ppm, lo cual representa la pérdida de sensibilidad del hongo hacia este fungicida. En comparación sobre previos estudios, se ha determinado que *M. fijiensis* muestra resistencia a propiconazole, por ejemplo en aislados de Costa Rica (Romero y Sutton, 1997) y Colombia (Cañas *et al.*, 2006). Por último, para el caso del fungicida azoxystrobin nueve aislados crecieron a la dosis de 3 ppm, en cambio algunos autores mencionan la pérdida de sensibilidad en Costa Rica (Sierotzki *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2001) y Cuba (Peláez *et al.*, 2006). Es importante hacer

ANOVA and Tukey mean test at 0.05 of probability, using the SAS statistical package (SAS, 1998). The sensibility to the fungicides indicates the doses above which growth of the fungi should not exist under *in vitro* conditions, should any growth occur, it is recognized that there is resistance of the pathogen to the fungicide (FRAC, 2008; Romero and Sutton, 1997; Romero and Sutton, 1998; Sierotzki *et al.*, 2000).

In the case of benomyl, it was determined that ten isolates showed resistance to the fungicide (Table 1), as they were able to grow at a dose of 10 ppm. There are reports where a loss of sensitivity to benomyl has been detected in some isolates from different geographical origins, as in the Pacific Islands (Fullerton and Tracey, 1984), Costa Rica (Romero and Sutton, 1998) and Colombia (Cañas *et al.*, 2006). In general, contact fungicides are inhibitors of multiple sites of action and have a low risk of resistance development. But the continuous and indiscriminate use of this type of fungicides without rotation or alternation with other types of fungicides could cause resistance to develop in the fungi. The majority of the sampled sites have a history of benomyl application, but in some cases this fungicide is not used anymore to control Black Sigatoka. However, it has been determined that the resistance to benomyl persists even three to five years after the cessation of the application of the fungicide (Romero and Sutton, 1998). In contrast, in the case of propiconazole it was determined that seven isolates grew at a dose of 1 ppm, which represents a loss of sensitivity of the fungus to this fungicide. In comparison to previous studies, it has been determined that *M. fijiensis* shows resistance to propiconazole, for example in isolates

Cuadro 1. Diámetro de crecimiento de colonias (μm) de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* sobre diferentes concentraciones de benomyl, propiconazole y azoxistrobin.

Table 1. Colony growth diameter (μm) of *Mycosphaerella fijiensis* isolates on different concentrations of benomyl, propiconazole and azoxystrobin.

Estado	Testigo	Concentración del fungicida (ppm)											
		Benomyl				Propiconazole			Azoxistrobin				
		0.3	1.0	5.0	10	0.003	0.01	0.1	1.0	3.0	0.1	3.0	10
Colima	30 ^a	33.5b	27c	39c	0b	0c	0c	0b	0a	0a	18b	0a	0a
Colima	474	75b	195bc	39c	91b	18c	9c	0b	0a	0a	45b	24a	6a
Colima	954	1524a	1599a	1260a	1458a	54c	81c	57b	6a	3a	93ab	48a	36a
Guerrero	180	15b	48b	48c	18b	21c	15c	6b	9a	6a	51b	30a	24a
Colima	576	12b	27c	108c	39b	39c	66c	72b	9a	0a	141ab	27a	21a
Colima	1752	1659a	374a	1487a	18b	54c	33c	9b	21a	0a	66b	102a	33a
Michoacán	492	333b	404b	498b	144b	144c	74c	39b	36a	12a	18b	24a	18a
Michoacán	207	123b	111b	96c	90b	12c	9c	9b	0a	0a	15b	0a	0a
Chiapas	390	278b	171b	306bc	63b	372b	309b	255a	39a	6a	228a	15a	48a
Michoacán	972	330b	375b	606b	21b	27.75c	15c	6b	0a	0a	24b	12a	15a
Tabasco	468	45b	30c	30c	22b	1257a	786a	220ab	24a	0a	60b	15a	27.5a

^aUn micrómetro fue usado para determinar el diámetro de la colonia, la cual fue crecida en medio de PDA embebido con las diferentes concentraciones del fungicida después de siete días a 25°C. Los valores de cada aislado corresponden a la media de cinco colonias por caja de Petri, de un total de cuatro cajas por cada concentración del fungicida.

mención que en previos estudios de sensibilidad, no han encontrado resistencia a benomyl, propiconazol y azoxystrobin (Peláez *et al.*, 2006), esto nos demuestra que haciendo un buen uso de aplicaciones de fungicidas con diferente modo de acción, difícilmente el patógeno presentará resistencia a los fungicidas. Por otra parte, se ha demostrado que los aislados de *M. fijiensis* que presentan resistencia a benomyl, propiconazol y azoxystrobin muestran altos niveles de agresividad sobre plantas de banano, esto en comparación con aislados susceptibles a dichos fungicidas (Romero y Sutton, 1997; Romero y Sutton, 1998; Chin *et al.*, 2001). Por lo tanto, se recomienda intercalar fungicidas con diferente modo de acción y un uso moderado de estos fungicidas. En la última década, se ha implementado el uso de herramientas moleculares para realizar un diagnóstico preciso sobre la caracterización molecular de aislados de *M. fijiensis* resistentes y susceptibles a los fungicidas azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000), benomyl (Cañas *et al.*, 2006) y propiconazol (Cañas *et al.*, 2006). Recientemente, se ha realizado un análisis molecular de 44 aislados para determinar su resistencia o sensibilidad a benomyl, demostrando que 24 aislados fueron resistentes. Finalmente, se demuestra que el análisis de sensibilidad *in vitro* de aislados de *M. fijiensis* a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxystrobin, fue eficiente para comprobar los niveles de sensibilidad hacia los fungicidas de aislados de patógeno nativos de diferentes localidades geográficas y con diferente manejo del cultivo. Ya que existieron aislados resistentes y sensibles a los fungicidas analizados, esto concordó con el tipo de manejo del cultivo. Es importante describir algunas recomendaciones generales propuestas por el comité de acción para la resistencia a fungicidas (FRAC) son las siguientes: Para que una mezcla sea efectiva en una estrategia de manejo de resistencia, la dosis de cada componente usado solo debe ser suficiente para proveer control satisfactorio; se debe respetar la dosis recomendada en la etiqueta para cada componente de la mezcla; los fungicidas de contacto se consideran una herramienta valiosa y necesaria en los programas de control de Sigatoka negra en banano; los fungicidas sitio específico se deben aplicar en suspensiones de aceite o en emulsiones aceite agua (FRAC, 2008).

Agradecimientos. Al CONACyT y Gobierno del Estado de Colima por el apoyo otorgado mediante el sistema FOMIX Colima 2008 al proyecto con clave 80966.

LITERATURACITADA

- Cañas GG, Patiño LF, Rodríguez AE and Arango R. 2006. Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology* 154:403-409.
- Chin KM, Wirz M and Laird D. 2001. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 85:1264-1270.
- FRAC. 2008. Fungicide Resistance Action Committee.
- Fullerton, R.A. and Tracey, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in

from Costa Rica (Romero and Sutton, 1997) and Colombia (Cañas *et al.*, 2006). Lastly, in the case of the fungicide azoxystrobin nine isolates grew in the 3 ppm dosage, whereas some authors mention the loss of sensitivity in Costa Rica (Sierotzki *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2001) and Cuba (Peláez *et al.*, 2006). It is important to mention that resistance to benomyl, propiconazole and azoxystrobin have not been found in previous studies (Peláez *et al.*, 2006), this shows us that making a good use of applications of fungicides of different modes of action, the pathogen will hardly show resistance to the fungicides. On the other hand, it has been shown that the isolates of *M. fijiensis* that showed resistance to benomyl, propiconazole and azoxystrobin show high levels of aggressiveness on banana plants, this in comparison with isolates susceptible to the fungicides mentioned (Romero and Sutton, 1997; Romero and Sutton, 1998; Chin *et al.*, 2001). Therefore, it is recommended to randomize the use of fungicides with different modes of action as well as to moderate their use. In the last decade, the use of molecular tools have been implemented to realize a precise diagnostic over the molecular characterization of resistant and susceptible isolates of *M. fijiensis* to the fungicides: azoxystrobin (Sierotzki *et al.*, 2000), benomyl (Cañas *et al.*, 2006) and propiconazole (Cañas *et al.*, 2006). Recently, a molecular analysis of 44 isolates was realized to determine their resistance or sensitivity to benomyl, demonstrating that 24 isolates were resistant. Finally, it is demonstrated that the *in vitro* sensitivity analysis of *M. fijiensis* isolates to the fungicides benomyl, propiconazole and azoxystrobin, was efficient in proving the levels of sensitivity of pathogen isolates native to different geographical locations towards the fungicides and with different crop managements. Since there were isolates resistant and sensitive to the analyzed fungicides, this concurred with the type of crop management. It is important to describe some general recommendations proposed by the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), which are as follows: In order for a mixture to be effective in a resistance management strategy, the dosage of every component used must be just sufficient to provide satisfactory control; the recommended dosage on the label should be respected for every component of the mixture; contact fungicides are considered a valuable and necessary tool in the Black Sigatoka of Banana control programs; site-specific fungicides should be applied in suspensions of oil or in oil-water emulsions (FRAC, 2008).

Acknowledgements. To CONACyT and The Government of the State of Colima for the support granted through the FOMIX Colima 2008 system to project number 80966.

- the Pacific Islands. *Tropical Agriculture* 61: 133-136.
- Manzo SG, Guzmán GS, Rodríguez GM, James A y Orozco SM. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:122-131.
- Marín DH, Romero RA, Guzmán M, and Sutton TB. 2003. Black Sigatoka: an increasing threat to banana

- cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Orozco SM. 1998. Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecmán, Colima, México, Folleto Técnico No 1. p. 95.
- Peláez MJE, Vásquez D, Díaz B, Castañeda S, Rodríguez B and Arango I. 2006. Use of a micro tittle plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. *Revista Facultad Nacional Agrícola de Medellín* 59:3425-3433.
- Romero RR and Sutton TB. 1997. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of bananas to propiconazol. *Phytopathology* 87: 96-100.
- Romero RR and Sutton TB. 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana in Costa Rica. *Plant Disease* 82: 931-934.
- SAS Institute, Inc., 1998. SAS/STAT User's Guide, release 6.10 ed. SAS Institute Inc; Cary, North California.
- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the *bc1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56:833-841.

Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en Nemátodos de Vida Libre Asociados a la Rizósfera de Papas Cultivadas en la Región del Cofre de Perote, Veracruz, México

Effect of *Paecilomyces lilacinus* in Free-Living Nematodes to the Rhizosphere Associates Potatoes Grown in the Cofre of Perote Region, Veracruz, Mexico

Gloria Carrión y Damaris Desgarenes, Instituto de Ecología, A.C., Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología, A.C., km 2.5 Carretera Antigua a Coatepec 351, Congregación El Haya, Xalapa, Ver., CP91070, México. Correspondencia: gloria.carrión@inecol.edu.mx

(Recibido: Agosto 04, 2011 Aceptado: Octubre 17, 2011)

Carrión G y Desgarenes D. 2012. Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. Revista Mexicana de Fitopatología 30:86-90.

Resumen. Se evaluó la mortalidad de nemátodos de vida libre (NVL) inoculados con una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (IE-430). Se extrajeron nemátodos de vida libre de muestras de suelo de campos de cultivo de papa. Los NVL fueron escogidos al azar e inoculados (cinco repeticiones, N=500) con una suspensión de esporas de *P. lilacinus*, igual cantidad de NVL fue utilizada en el testigo mantenidos en agua destilada estéril. Con el fin de cuantificar los nemátodos muertos, los individuos fueron observados entre las 12 y 120 h posteriores a la inoculación. Éstos nemátodos se identificaron y colocados en medio de cultivo agar-avena para verificar la presencia de *P. lilacinus*. Se identificaron siete morfotipos de NVL de tres grupos tróficos: bacteriófagos, micófagos y omnívoro-depredadores. A las 48 h se encontró diferencia significativa entre el número de nemátodos muertos en el tratamiento con *P. lilacinus* y el testigo.

Palabras clave adicionales: Hongos nematófagos.

Los nemátodos de vida libre (NVL) participan de manera importante en la descomposición, mineralización y flujo de nutrientes en el suelo, además funcionan como reguladores de poblaciones de hongos y bacterias (Yeates y Bongers, 1999; Lavelle y Spain, 2001). Estos nemátodos pueden funcionar como bioindicadores de la calidad del suelo y ser utilizados para evaluar la restauración del mismo (Bongers y Ferris, 1999; Yeates, 2003). En México, los estudios sobre la nematofauna asociada a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, tiene registrados a ocho bacteriófagos, tres micófagos, cuatro omnívoros-predadores y dos fitoparásitos (Desgarenes *et al.*, 2009).

Abstract. The mortality of free-living nematodes (FLN) inoculated with a strain of *Paecilomyces lilacinus* (IE-430) was evaluated. FLN were extracted from soil samples from potato fields. The FLN were picked randomly and inoculated (five repetitions, N=500) with spores suspension of *P. lilacinus* and the other a control with the same amount. In order to quantify dead nematodes, individuals were observed for 12-120 h. One part of dead nematodes was identified and other placed in an agar-oatmeal culture medium to verify the presence of *P. lilacinus*. Eight morphotypes of FLN were identified from three trophic groups: bacterial feeders, fungal feeders, and omnivorous-predators. At 48 h significant difference was found between the number of dead nematodes in the *P. lilacinus* treatment and the control.

Additional keywords: Nematofagous fungi.

Résumé. La mortalité des nématodes vivant en liberté (NVL) inoculés avec une souche de *Paecilomyces lilacinus* (IE-430) a été évaluée. Les nématodes vivant en liberté ont été extraits d'échantillons de sol provenant du champ de culture des pommes de terre. Les NVL ont été choisis au hasard et inoculés (cinq répétitions, N = 500) avec une suspension de spores de *P. lilacinus*. Pour le contrôle, a été utilisée une quantité similaire de NVL conservés dans de l'eau distillée stérile. Afin de quantifier les nématodes morts, les individus ont été observés entre 12 et 120 heures. Ces nématodes ont été identifiés et placés dans milieu de culture d'agar-avoine pour vérifier la présence de *P. lilacinus*. Ont été identifié sept morphotypes de NVL de trois groupes trophiques : les bactériophages, les mycophages et les omnivores-prédateurs. À 48 heures ont été trouvées des différences significatives entre le nombre de nématodes morts dans le traitement avec *P. lilacinus* et le contrôle.

Mots clés supplémentaires: les champignons nématophages.

Dentro de los fitoparásitos registrados, *Globodera rostochiensis* (Heteroderidae: Nematoda) es el de mayor densidad poblacional y por el cual se están probando hongos nematófagos nativos de México como *Paecilomyces lilacinus* para su control. No obstante, poco se sabe sobre el efecto que este hongo pueda tener sobre la nematofauna de vida libre asociada a la rizósfera de papas cultivadas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la mortalidad de los NVL de la rizósfera del cultivo de papa en presencia de una cepa de *P. lilacinus*.

En suelos cultivados con papa en la localidad de 'Pescados', Municipio de Perote, fue tomada una muestra compuesta de cinco submuestras de 100 g de suelo cada una. El suelo se extrajo a 15 cm de profundidad siguiendo un patrón zig-zag (Haydock y Perry, 1998). Los nemátodos fueron extraídos por el método de tamizado-centrifugado (s'Jacob y van Bezooijen, 1984). De los nemátodos extraídos, se tomaron al azar 100 individuos y se colocaron en cajas Petri (5 cm de diámetro) con 2 mL de agua destilada (cinco repeticiones, N= 500). Cada caja se inoculó con 1 mL de una suspensión de esporas de *P. lilacinus* preparada a una alta concentración de conidios (10^6 mL⁻¹) para exponer *in vitro* directamente a los nemátodos con el hongo. Se utilizó la cepa de *P. lilacinus* IE-430 nativa del Cofre Perote, aislada de juveniles (J2) de *G. rostochiensis*, reproducida en placas de agar-avena y depositada en el cepario del Instituto de Ecología, A. C. En el testigo también se colocaron 100 nemátodos en cajas Petri con 3 mL de agua destilada estéril (cinco repeticiones, N= 500). Las cajas se mantuvieron a 20±2°C y cada caja fue revisada a las 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h para cuantificar el número de nemátodos vivos y muertos.

A las 24 h una parte de los nemátodos muertos del tratamiento con *P. lilacinus* y del testigo, extraídos en cada revisión, se aclaró y se fijó para su determinación a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie. Con base en el estudio previamente realizado por Desgarenes *et al.* (2009), fueron determinados aquellos individuos cuyos caracteres morfológicos fueron distinguibles al microscopio, por lo cual no fue posible cuantificar el número de individuos por especie. Se utilizaron claves para los ordenes Dorylaimida (Jairajpuri y Ahmad, 1992), Rhabditida (Andrássy, 1984), Aphelenchida (Hunt, 1993) y Plectida (Holovachov y De Ley, 2006). La otra parte de nemátodos muertos, fue enjuagada dos veces en agua destilada y colocada en blísteres con placas de agar-avena de 1 cm de diámetro (N= 125 nemátodos por tratamiento), antes de ser colocados fueron enjuagados dos veces en agua destilada. Los nemátodos se observaron diariamente para detectar sobre ellos el crecimiento de micelio. Se permitió la esporulación de los hongos crecidos sobre los nemátodos para corroborar la presencia de *Paecilomyces lilacinus* o determinar, al menos a nivel de género, cuando se trató de otros hongos obtenidos de los testigos. Las claves utilizadas para los hongos fueron las de Booth (1971), Ellis (1976), Sutton (1980), Domsch y Gams (1980).

Los datos de mortalidad obtenidos fueron analizados con la prueba ANOVA de Friedman y el Coeficiente de concordancia de Kendall. Además, para cada periodo de

Free-living nematodes (FLN) are significantly involved in the decomposition, mineralization and flow of nutrients in the soil, they also function as fungi and bacteria population regulators (Yeates and Bongers, 1999; Lavelle and Spain, 2001). These nematodes can serve as bio-indicators of soil quality and be used to evaluate their restoration (Bongers and Ferris, 1999; Yeates, 2003). In Mexico, studies on the nematofauna associated with the rhizosphere of potatoes cultivated in the region of Cofre de Perote, have eight registered bacteriophages, three micophages, four omnivore-predators and two phytoparasites (Desgarenes *et al.*, 2009). Within the registered phytoparasites, *Globodera rostochiensis* (Heteroderidae: Nematode) is the one with the highest population, and for whom nematophagous fungi native to Mexico, such as *Paecilomyces lilacinus*, are being tested. Nonetheless, little is known about the effect that this fungi may have on the free-living nematofauna associated to the rhizosphere of cultivated potato. Therefore, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the mortality of the FLN (free-living nematofauna) of this rhizosphere in the presence of a *P. lilacinus* strain.

In soils cultivated with potatoes in the village of 'Pescados', in the town of Perote, a composite sample of five 100 g sub-samples of soil was taken. The soil was extracted from a depth of 15 cm in a zig-zag pattern (Haydock and Perry, 1998). The nematodes were extracted via the sieving-centrifugation technique (s'Jacob and van Bezooijen, 1984). Of the extracted nematodes, 100 individuals were taken at random and placed in Petri dishes (5 cm in diameter) with 2 mL of distilled water (five replications, N=500). Each dish was inoculated with 1 mL of a suspension of *P. lilacinus* spores prepared at a high concentration of conidia (10^6 mL⁻¹) to directly expose the nematodes with the fungi *in vitro*. A strain of *P. lilacinus* (IE-430), native to Cofre de Perote was used, isolated from second-stage juveniles (J2) of *Globodera rostochiensis*, reproduced in oatmeal-agar plates and placed in the strain bank of the Ecology Institute (Instituto de Ecología, A.C.). One hundred nematodes were also placed, as the control, in Petri dishes with 3 mL of sterile distilled water (five replications, N=500). The dishes were kept at 20±2°C and each dish was inspected at 12, 24, 48, 72, 96 and 120 h to quantify the number of living and dead nematodes.

Starting at 24 h, from the dead and extracted nematodes in each inspection, both in the treatment with *P. lilacinus* as well as in the control, half were fixed and cleared for later identification at a genus level and, when possible, to the species level. Based on the study previously done by Desgarenes *et al.* (2009), those individuals whose morphological characteristics were distinguishable under the microscope were determined, so it was not possible to quantify the number of individuals per species. Keys were used for the order Dorylaimida (Jairajpuri and Ahmad, 1992), Rhabditida (Andrássy, 1984), Aphelenchida (Hunt, 1993) and Plectida (Holovachov and De Ley, 2006). The other part of the dead nematodes was placed in blister with oatmeal-agar plates, 1 cm in diameter (N=125 nematodes per treatment), before being placed they were rinsed twice in distilled water. The nematodes were observed daily to detect

observación se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre los tratamientos para la misma variable. Ambos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statistica 8, StatSoft. Los valores promedio van acompañados de su desviación estándar ($\bar{X} \pm DE$).

El número de nemátodos muertos en el tratamiento con *P. lilacinus* y el testigo a las 12 y 24 h fue similar. Sin embargo, a las 48 h se encontró mayor número de nemátodos muertos ($H_{(1, N=10)} = 5.951250$, $P = 0.0147$) en el tratamiento con *P. lilacinus* (Figura 1) que en el testigo (Figura 2). A las 72 h no se encontraron diferencias en la mortalidad promedio de los NVL. Los resultados sugieren que los NVL susceptibles a *P. lilacinus* mueren en las primeras 48 h de

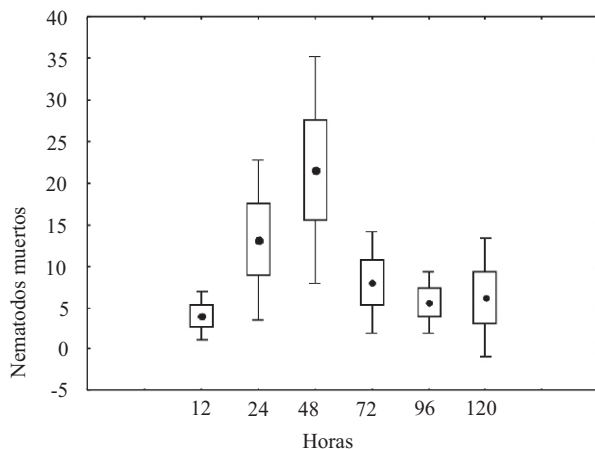


Figura 1. Promedio de nemátodos de vida libre muertos en el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus* en las seis observaciones. • Media, □ Media ± Error Estándar, las barras representan la desviación estándar de la media.

Figure 1. Mean dead free-living nematodes in the treatment with *Paecilomyces lilacinus* in the six observations. • Mean, □ Mean ± Standard error, the bars represent the standard deviation of the mean.

exposición al hongo. Dentro de los nemátodos muertos encontrados en este tratamiento, se determinaron tres bacteriofagos (*Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides* y *Steinernema* sp.) un micófago (*Aphelenchoides* sp.) y un omnívoro-depredador (*Crassolabium* sp.) debido a que en algunos ejemplares los caracteres morfológicos fueron indistinguibles (Figura 3 A-B). En el grupo testigo se determinaron cinco bacteriofagos (*Acrobeles* sp., *Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides*, *Plectus* sp. y *Steinernema* sp.) (Figura 3) y un micófago (*Paraphelenchus* sp.). En este experimento se determinaron ocho NVL de los 13 morfotipos de la nematofauna registrada para estas tierras de cultivo (Desgarenes *et al.*, 2009). Ésto podría considerarse una muestra representativa de la nematofauna asociada a la rizósfera de las papas cultivadas en el sitio de estudio, ya que se encontraron los tres grupos tróficos registrados para éstos suelos. Aunque éstos resultados muestran que *P. lilacinus* no afectó drásticamente a los NVL durante el desarrollo del

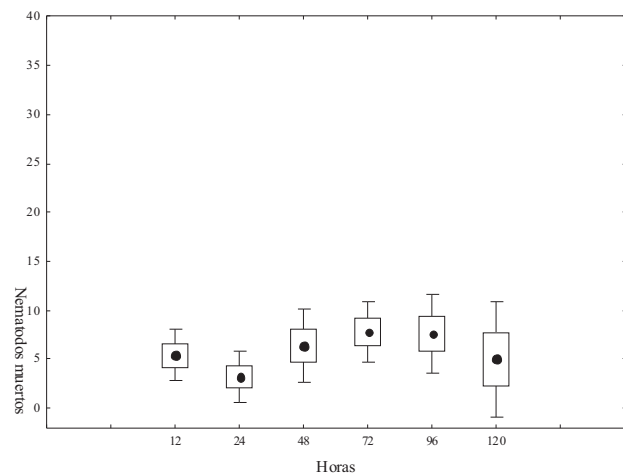


Figura 2. Promedio de nemátodos de vida libre muertos en el testigo en las seis observaciones. • Media, □ Media ± Error estándar, las barras representan la desviación estándar de la media.

Figure 2. Mean dead free-living nematodes in the control in the six observations. • Mean, □ Mean ± Standard error, the bars represent the standard deviation of the mean.

mycelium growth. The sporulation of the fungi grown over the nematodes deposited in the blister was allowed in order to be observed under a microscope to corroborate the presence of *Paecilomyces lilacinus* or determine, at least at a genus level, when it was fungi obtained from the controls. The keys used for the fungi were the ones given by Booth (1971), Ellis (1976), Sutton (1980), Domsch and Gams (1980).

The obtained mortality data was analyzed with Friedman's ANOVA test and Kendall's coefficient of concordance. In addition, a Kruskal-Wallis test was realized for each period of observation to determine the differences between treatments of the same variable. Both analysis were made using the Statistica 8 statistical package from StatSoft. The mean values are accompanied by their standard deviation ($\bar{X} \pm SD$).

The number of dead nematodes in both treatments at 12 and 24 h was similar. However, at 48 h a greater number of dead nematodes ($H_{(1, N=10)} = 5.951250$, $P = 0.0147$) was found in the treatment with *P. lilacinus* (Figure 1) than in the control (Figure 2). After 72 h, once again, no difference in the mean mortality rate was found in the FLN under treatment and the control. Apparently the FLN susceptible to *P. lilacinus* die within 48 h after exposure to the fungi. Among the dead nematodes in the treatment with *P. lilacinus*, it was only possible to determine three bacteriophages (*Cruzinema tripartitum*, *Eucephalobus oxyuroides* and *Steinernema* sp.), one mycophage (*Aphelenchoides* sp.) and one omnivore-predator (*Crassolabium* sp.) due to the fact that in some specimens, the morphological characteristics were indistinguishable (Figure 3 A-B). Five bacteriophages were determined in the control group (*Acrobeles* sp., *Cruzinema tripartitum*,

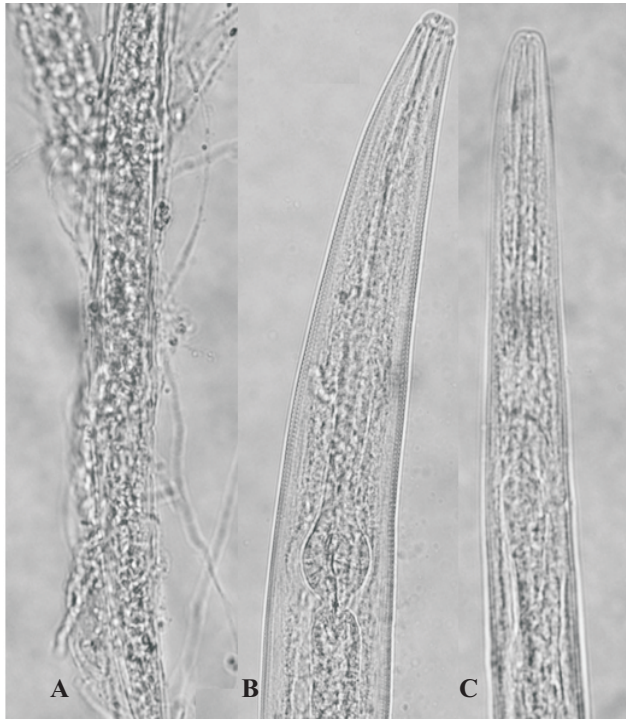


Figura 3. A-B. Nemátodos en el tratamiento con *Paecilomyces lilacinus*; A: Ejemplar con micelio a las 48 h (640X), B: *Plectus* a las 120 h (400X). C. *Steinernema* sp. en el testigo a las 72 h (640X).

Figure 3. A-B. Nematodes in the treatment with *Paecilomyces lilacinus*; A: Specimen with mycelium at 48 h (640X), B: *Plectus* at 120 h (400X). C: *Steinernema* sp. in the control at 72 h (640X).

experimento, algunos nemátodos como *Steinernema* sp. fueron afectados por *P. lilacinus* ya que en las observaciones de las 48, 96 y 120 h se encontraron muertos en el grupo tratado y no en el testigo. Por ello es posible que cepas de hongos nematófagos al interactuar con sus hospedantes presenten cierto grado de especificidad (Mauchline *et al.*, 2004).

Los hongos obtenidos de los nemátodos infectados presentaron micelio y conidióforos de *P. lilacinus*, al cuarto día después de la inoculación en el 44.8% de los nemátodos muertos (56, N=125 nemátodos) y apenas un 0.8% en el testigo (1, N=125). En el testigo, otros hongos fueron encontrados en 16 nemátodos (12.8%): *Cladosporium oxysporum* (2 ejemplares), *Aspergillus* sp. (1), *Fusarium* sp. (3), *Metarhizium* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Phoma* sp. (5) y *Trichoderma* sp. (2). La presencia de siete hongos en los ejemplares del testigo comparada con el tratamiento con *P. lilacinus* podría deberse a que éste último no permite el desarrollo de otros hongos, ya que germina y desarrolla su micelio con mayor rapidez.

La baja mortalidad de NVL en el tratamiento con el hongo sugiere que la aplicación de cepas de *P. lilacinus* aisladas de la misma zona de estudio, podría ser usadas como agentes de control biológico del nematodo dorado de

Eucephalobus oxyuroides, *Plectus* sp. and *Steinernema* sp.) and one mycophage (*Paraphelenchus* sp.) (Figure 3 C). In this experiment, eight FLN were determined out of the 13 morphotypes of the nematofauna registered for these croplands (Desgarenes *et al.*, 2009). This can be considered a representative sample of the nematofauna associated to the rhizosphere of the potatoes cultivated in the site studied, as all three registered trophic groups registered for these lands were used. Although these results show that *P. lilacinus* did not drastically affect the FLN during the development of the experiment, apparently some nematodes such as *Steinernema* sp. were affected by *P. lilacinus* as seen in the observations at 48, 96 and 120 h in which the nematodes were found dead in the treated group and not in the control. It is possible that strains of nematophagous fungi carry some degree of specificity at the time of interaction with their hosts (Mauchline *et al.*, 2004).

As for the fungi obtained from the nematodes, mycelium and conidiophores of *P. lilacinus* were registered four days after inoculation in 44.8% of the dead nematodes (56, N=125 nematodes) and 0.8 in the control (1, N=125). In the control, other fungi were found in 16 nematodes (12.8%): *Cladosporium oxysporum* (2 specimens), *Aspergillus* sp. (1), *Fusarium* sp. (3), *Metarhizium* sp. (1), *Penicillium* sp. (2), *Phoma* sp. (5) and *Trichoderma* sp. (2). The presence of seven fungi in the specimens of the control compared with that of the treatment with *P. lilacinus* may be due to the latter not allowing the growth of other fungi, as it germinates and develops its mycelium more quickly.

The low mortality of the FLN in the treatment with the fungi indicates that the application of strains of *P. lilacinus* isolated from the same area of study can be used as biological control agents for the golden nematode without representing a risk to free-living nematodes, among others (Hajek, 2007). However, before applying any type of control against plague nematodes such as *Globodera rostochiensis* in the field, it is necessary to study their effect on the population dynamics of FLN.

LITERATURA CITADA

- Andrássy I. 1984. Klasse nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). Akademie-Verlag. Berlin, Germany. 509 p.
- Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Surrey, United Kingdom. 237 p.
- Bongers T and Ferris H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. Trends in Ecology and Evolution 14: 224-228.
- Desgarenes D, Sánchez-Nava P, Peña-Santiago R y Carrión G. 2009. Nematofauna asociada a la rizósfera de papas (*Solanum tuberosum*) cultivadas en la zona productora del Cofre de Perote, Veracruz, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 80: 611-614.
- Domsch KH and Gams W. 1980. Compendium of soil fungi, Volume 1. Academic Press. London, United Kingdom. 859 p.
- Ellis MB. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes.

la papa sin representar un riesgo para la nematofauna de vida libre, entre otros (Hajek, 2007). Sin embargo, antes de aplicar algún tipo de control contra nemátodos plaga como *G. rostochiensis* en campo, es necesario hacer estudios sobre su efecto en la dinámica de las poblaciones de NVL.

-
- Oxford University Press. Oxford, United Kingdom. 507 p.
- Hajek AE. 2007. Introduction of a fungus into North America for gypsy moth. pp. 53-62. *In*: Vincent C, Goettel MS and Lazarovits G (eds.). *Biological Control, a Global Perspective*. CAB International, London, United Kingdom. 428 p.
- Haydock PP and Perry JN. 1998. The principles and practice of sampling for the detection of potato cyst nematodes. pp. 61-74. *In*: Marks RJ and Brodie BB (eds.). *Potato Cyst Nematodes, Biology, Distribution and Control*. CAB International. Wallingford, United Kingdom. 408 p.
- Holovachov O and De Ley P. 2006. Order Plectida. pp. 611-647. *In*: Abebe E, Andrassy I and Traunspurger W (eds.). *Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*. CAB International. Oxford, United Kingdom. 752 p.
- Hunt D. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their Systematics and Bionomics. CAB International. Oxford, United Kingdom. 368 p.
- Jairajpuri MS and Ahmad W. 1992. *Dorylaimida free-living, predaceous and plant-parasitic nematodes*. Brill Academic Publisher. Leiden, The Netherlands. 458 p.
- Lavelle P and Spain AV. 2001. *Soil Ecology*. Springer Kluwer Academic. Dordrecht, Germany. 654 p.
- Mauchline TH, Kerry BR and Hirsch PR. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. *Mycological Research* 108: 161-169.
- s'Jacob JJ and van Bezooijen J. 1984. *A manual for practical work in nematology*. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 79 p.
- Sosa MC. 1986. Cyst nematodes in Mexico, Central and South America. *Nematologica* 23: 397-398.
- Sutton BC. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stromata*. CAB International. United Kingdom. 696 p.
- Yeates GW. 2003. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils* 37: 199-210.
- Yeates GW and Bongers T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 174: 113-135.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RGM, Freckman DW and Georgieva SS. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera—an outline for soil ecologists. *Journal of Nematology* 25:315-331.

'Sáwali Oro C2008', Nueva Variedad de Trigo Cristalino para el Noroeste de México

'Sáwali Oro C2008', New Durum Wheat Cultivar for Northwest Mexico

Pedro Figueroa López, Guillermo Fuentes Dávila, Víctor Valenzuela Herrera, Gabriela Chávez Villalba, José Luis Félix Fuentes y José Alberto Mendoza Lugo, Campo Experimental Norman E. Borlaug, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 12 Norman E. Borlaug, Apdo. Postal 155, Cd. Obregón, Son., CP 85000, México. Correspondencia: figueroa.pedro@inifap.gob.mx

(Recibido: Septiembre 20, 2011 Aceptado: Diciembre 29, 2011)

Figueroa LP, Fuentes DG, Valenzuela HV, Chávez VG, Félix FJL y Mendoza LJA. 2012. 'Sáwali Oro C2008', nueva variedad de trigo cristalino para el noroeste de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:91-94.

Resumen. La variedad 'Sáwali Oro C2008' fue desarrollada en el Campo Experimental Norman E. Borlaug, a través de un proyecto colaborativo entre el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias y el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Su pedigrí e historial de selección es MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2//ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, CDSS02Y00786T-0TOPB-0Y-0M-2Y-0M-0Y. Esta variedad es resistente a la roya de la hoja y sus características de calidad para la elaboración de pastas son superiores a la variedad comercial testigo 'Júpate C2001', por lo que se convierte en una mejor opción para el mercado internacional de la exportación para los productores de trigo del noroeste de México. Durante los ciclos agrícolas de evaluación 2006-2007 al 2008-2009, 'Sáwali Oro' mostró un rango de 4.5 a 6.9 t ha⁻¹ en rendimiento experimental de grano, resistencia a la roya de la hoja y la intensidad del pigmento amarillo en el endospermo del grano tuvo en promedio 27.8 puntos en la escala valor b de Minolta. Esta variedad cuenta con el registro TRI-109-240209 en el catálogo nacional de variedades vegetales. La semilla se puede adquirir a través de diversas compañías de semillas.

Palabras clave adicionales: *Triticum durum*, selección, semilla, trigo cristalino.

La producción mundial de trigo duro o cristalino (*Triticum durum*) para el ciclo 2007-2008 fue de 33.1 millones de toneladas (Farmers of North America, 2009). En los estados de Sonora, Baja California, Sinaloa y Baja California Sur, México, se sembró el 63.9% de la superficie nacional con trigo (457,419 ha) en el ciclo otoño-invierno 2008-2009, con un valor de la producción de 4,356 millones de pesos (SIAP, 2009). El trigo en esta región es de hábito de

Abstract. The variety 'Sáwali Oro C2008' was developed at Norman E. Borlaug Experimental Station through a collaborative project between the National Institute for Forestry, Agriculture and Livestock Research and the International Maize and Wheat Improvement Center. Its pedigree and selection history is MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2//ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, CDSS02Y00786T-0TOPB-0Y-0M-2Y-0M-0Y. This cultivar is resistant to leaf rust, and the quality characteristics for pasta-making are better than commercial control variety 'Júpate C2001', so that it becomes a better option for international export for wheat producers from northwestern Mexico. During crop seasons of evaluation 2006-2007 to 2008-2009, 'Sáwali Oro' showed a range of experimental grain yield of 4.5 to 6.9 t ha⁻¹, resistance to leaf rust, and the intensity of the yellow pigment in the grain endosperm showed an average of 27.8 points in the Minolta b value. This cultivar has the registration TRI-109-240209 in the national catalog of cultivars feasible for registration. Seed may be purchased through several seed companies.

Additional keywords: *Triticum durum*, selection, seed, durum wheat.

Résumé. La variété 'Sawali Or C2008' a été développée dans la station expérimentale Norman E. Borlaug, à travers un projet de collaboration entre l'Institut National de la Recherche Forestière Agricole et de l'Élevage et le Centre International d'Amélioration du Maïs et du Blé. Son pedigree et son histoire de sélection sont MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2//ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, CDSS02Y00786T-0TOPB-0Y-0M-2Y-0M-0Y. Cette variété est résistante aux populations de la rouille des feuilles répandues dans le nord-ouest du Mexique, potentiellement de par la présence du gène de résistance Lr 14a. Ses caractéristiques de qualité pour la fabrication de pâtes sont supérieures à la variété commerciale et témoin 'Júpate C2001'. Elle devient ainsi une meilleure option pour

crecimiento de primavera y se cultiva durante el otoño-invierno bajo condiciones de riego. En México, el trigo duro o cristalino se produce principalmente en el estado de Sonora, donde a partir del ciclo 2001-2002, de las 190718 ha sembradas, ocupó más de 70% de la superficie (Camacho *et al.*, 2004). La preferencia por esta clase de trigo por los productores en el noroeste de México, se debe a que tiene un alto potencial de rendimiento, aceptación en el mercado de exportación, tolerancia al carbón parcial y a la roya de la hoja (*Puccinia triticina*). La variedad de trigo cristalino más sembrada en la región hasta el ciclo 2002-2003 fue 'Altar C84', a pesar que su resistencia a la roya de la hoja ya había sido vencida por la nueva raza BBG-BN (Singh *et al.*, 2004), que afectó la producción durante los ciclos 2000-2001 y 2001-2002 (Camacho *et al.*, 2010). La variedad 'Júpate C2001' (Camacho *et al.*, 2004), resistente a las razas de roya de la hoja que atacaron a las variedades de trigo duro liberadas hasta el año 2000, dominó el área dedicada al trigo en el sur de Sonora desde el 2003-2004 hasta el 2008-2009, donde se sembró en 119,327 ha (42.3%). Sin embargo, la roya de la hoja superó la resistencia esta variedad, por lo que no solo se ha buscado diversificar las fuentes de resistencia para esta enfermedad, pero también incrementar el pigmento del grano, característica importante de calidad para el mercado de la exportación.

Con base en las evaluaciones de rendimiento de grano llevadas a cabo a partir del ciclo 2006-2007 en el Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB), se propuso la liberación de la línea experimental de trigo cristalino MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2/ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, como nueva variedad denominada 'Sáwali Oro C2008'. Las comparaciones de rendimiento y calidad se efectuaron con respecto a 'Júpate C2001', la cual ha sido la variedad más cultivada en el estado en los últimos años. 'Sáwali Oro C2008' representa una nueva opción de trigo cristalino para los agricultores de Sonora interesados en la exportación, con potencial de rendimiento aceptable y alta calidad para la elaboración de pastas. Esta variedad se obtuvo por hibridación y selección a través del método genealógico de mejoramiento genético a partir de la cruce MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2/ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, cuyo número de cruce e historia de selección es CDSS02Y00786T-0TOPB-0Y-0M-2Y-0M-0Y. Las selecciones individuales y en masa se llevaron a cabo en forma alterna entre las estaciones experimentales de San Antonio Atizapán (M), Estado de México (19° 17' LN y 2 640 msnm), El Batán (B) (19° 31' 45.69" LN y 98° 50'47.32" LO, 2 249 msnm) y el Valle del Yaqui (Y) (27° 22' 14.39" LN y 109° 55' 52.40" LO, 40 msnm), en Sonora y la purificación de espiga por surco fue llevada a cabo por el programa de trigo del INIFAP en el CENEB. Las condiciones de siembra fueron de temporal en las estaciones de San Antonio Atizapán y el Batán, y de riego en el Valle del Yaqui. La variedad cuenta con el registro TRI-109-240209 en el catálogo de variedades factibles de certificación (CVC).

A partir del ciclo agrícola 2006-2007 se iniciaron las

le marché international d'exportation des producteurs du blé du nord-ouest du Mexique. Pendant les saisons agricoles d'évaluation 2006-2007 à 2008-2009, Sawali Or a montré un rendement expérimental de grain de 4,5 à 6,9 t ha⁻¹, la résistance à la rouille des feuilles ainsi que l'intensité du pigment jaune dans l'endosperme. Il a pris en moyenne 27,8 points dans l'échelle de la valeur b de Minolta. Cette variété est enregistrée sous le code TRI-109-240209 dans le Catalogue National des Variétés Végétales. Les graines peuvent être acquises par diverses compagnies productrices de semences.

Mot clés supplémentaires: *Triticum durum*, sélection, semence, blé cristallin.

The worldwide production of durum wheat (*Triticum durum*) for the 2007-2008 crop season was 33.1 million tons (Farmers of North America, 2009). Out of the area sown with wheat in Mexico, 63.9% (457,419 ha) was planted in the states of Sonora, Sinaloa, Baja California, and South Baja California during the 2008-2009 fall-winter season, with a production value of 4,356 million pesos (SIAP, 2009). Wheat in this region is spring type, and it is cultivated during the fall-winter under irrigated conditions. Durum wheat in Mexico is produced mainly in the state of Sonora, and since the 2001-2002 season, it occupied more than 70% of the 190,718 ha planted (Camacho *et al.*, 2004). Preference for this class of wheat by the producers in Northwestern Mexico is due to its high yield potential, acceptance in the export market, as well as its tolerance to partial bunt and leaf rust (*Puccinia triticina*). 'Altar C84' was the most planted durum wheat cultivar in the region until the 2002-2003 season, despite the loss of resistance to leaf rust new race BBG-BN (Singh *et al.*, 2004), which affected the production during the 2000-2001 and 2001-2002 seasons (Camacho *et al.*, 2010). Wheat cultivar 'Júpate C2001' (Camacho *et al.*, 2004), resistant to the leaf rust races that attacked the durum wheat cultivars released up to the year 2000, dominated the area grown with wheat from 2003-2004 to 2008-2009, occupying 119,327 ha (42.3%) during that last season. However, leaf rust overcame its resistance; therefore, efforts are being carried out not only on diversifying the sources of resistance to this disease, but also, to increase the grains pigment, an important quality characteristic for the export market.

Based on grain yield evaluations carried out since the 2006-2007 season at the Norman E. Borlaug Experimental Station (CENEB), it was proposed the release of the durum wheat experimental line MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2/ILBOR//PATKA_7/YAZI_1 as a new variety under the name 'Sáwali Oro C2008'. Grain yield and quality comparisons were made with regards to 'Júpate C2001', which has been the most widely grown cultivar in recent years. 'Sáwali Oro C2008' represents a new option of durum wheat for farmers in Sonora interested in exports, with an acceptable yield potential and high quality for pasta-making. This cultivar was obtained by hybridization and

evaluaciones de rendimiento y calidad industrial en el CENEB. El rendimiento de grano se determinó en diferentes fechas de siembra, con dos y tres riegos de auxilio. Durante los tres ciclos de evaluación con tres riegos de auxilio en cuatro fechas de siembra, 'Sáwali Oro C2008' presentó un promedio de 5.9 t ha^{-1} , con una diferencia superior de 189 kg con respecto a 'Júpate C2001'. Las fechas de mejor rendimiento fueron entre el 15 y 30 de noviembre con un promedio de 6.9 y 6.7 t ha^{-1} , respectivamente.

'Sáwali Oro C2008' es de planta alta con 89 cm de altura (Figura 1), el ciclo vegetativo de 81 días a



Figura 1. 'Sáwali Oro C2008', variedad de trigo cristalino, tiene hábito de crecimiento erecto y la frecuencia de plantas con la hoja bandera curvada es ausente o baja.

Figure 1. 'Sáwali Oro C2008', durum wheat variety, has an erect growth habit and the frequency of recurved flag leaves is either absent or low.

espigamiento y 122 a madurez fisiológica. La planta tiene hábito de crecimiento erecto y la frecuencia de plantas con la hoja bandera curvada es ausente o baja. Al madurar, los tallos presentan una médula mediana en sección transversal. La espiga tiene perfil de bordes paralelos, densidad media y longitud mediana (8 a 8.5 cm), excluyendo las aristas o barbas que comparadas con la espiga son más largas; produce de 19 a 20 espiguillas, cada espiguilla produce de tres a cinco granos en el tercio inferior de la espiga predominando cuatro, de tres a cinco en el tercio medio predominando cuatro y cinco, y de uno a cinco en el tercio superior predominando cuatro, tres y dos; tiene glaucencia media y la distribución de las barbas, las cuales adquieren color ligeramente café, es en toda la espiga. Antes del inicio de la madurez fisiológica del grano, la intensidad de la cera sobre la espiga es de magnitud media y al final se torna color blanco, manteniendo una vellosidad débil en el margen del primer segmento del ráquis. En el tercio medio de la espiga, la forma de la gluma es alargada y la vellosidad de la superficie externa está ausente; la forma del hombro se presenta redondeada y el ancho es angosto; la longitud de la punta es muy corta y presenta una forma derecha. El grano es semi-elíptico (Figura 2), mide 6.9 mm de longitud, 3 mm de ancho con peso medio de 50 mg ; la vellosidad de la brocha en vista dorsal es mediana y la coloración del grano al ser tratado con fenol puede ser muy tenue o nula. El peso

cross MUSK_1//ACO89/FNFOOT_2/4/MUSK_4/3/PLATA_3//CREX/ALLA/5/OLUS*2//ILBOR//PATKA_7/YAZI_1, with the number and selection history CDSS02Y00786T-0TOPB-0Y-0M-2Y-0M-0Y. Shuttle breeding was carried between the Experimental Stations located in San Antonio Atizapan (M), State of Mexico ($19^\circ 17' \text{ L N}$ and $2\ 640 \text{ masl}$), El Batán (B) ($19^\circ 31' 45.69'' \text{ L N}$ and $98^\circ 50' 47.32'' \text{ L O}$, $2\ 249 \text{ masl}$), and the Yaqui Valley, Sonora (Y) ($27^\circ 22' 14.39'' \text{ L N}$ and $109^\circ 55' 52.40'' \text{ L O}$, 40 masl). Spike per row purification was performed by INIFAP wheat program at CENEB. The crop was cultivated under rainfed conditions in San Antonio Atizapan and El Batán, and under irrigation in the Yaqui Valley. 'Sáwali Oro C2008' has the registration TRI-109-240209 in the catalog of cultivars feasible for certification (CVC).

Grain yield and industrial quality evaluations began at CENEB from the 2006-2007 crop season. Grain yield was determined in different sowing dates, with two and three complementary irrigations. During the three seasons of evaluation, 'Sáwali Oro C2008' showed an average of 5.9 t ha^{-1} , with a difference of 189 kg over Júpate C2001, when cultivated in four sowing dates with three complementary irrigations. The best sowing dates were November 15 and 30 with an average of 6.9 and 6.7 t ha^{-1} , respectively.

The plant of 'Sáwali Oro C2008' is 89 cm tall (Figure 1), with 81 days to heading and 122 to physiological maturity. Plant growth habit is erect and the frequency of recurved flag leaves is either absent or low. At maturity, the straw has a medium pith in cross section. The ear shape is parallel-sided, medium density, and medium length (8 to 8.5 cm), excluding the awns which if compared to the ear, are longer; it produces 19 to 20 spikelets; each spikelet produces three to five grains in the lower third of the ear predominating four; from three to five in the mid-third predominating four and five, and one to five in the upper third predominating four, three and two; glaucosity is medium, and awn distribution, which become light brown, is in the whole length. Before the start of grain physiological maturity, wax intensity on the ear is medium, turning white at the end of the season; a weak hairiness is kept at the margin of the first rachis segment. Glume shape in the mid-third of the ear is elevated, and the hairiness on the external surface is absent; the shoulder shape is rounded and the width is narrow; the length of the beak is very short with a straight shape. The grain is semi-elliptical (Figure 2), 6.9 mm long x 3 mm wide, with an average weight of 50 mg ; the brush hairiness in dorsal view is medium; grain coloration when treated with phenol can be very light or nil. The average specific weight is 83.2 kg hL^{-1} . A resistance reaction to leaf rust and partial bunt was shown by 'Sáwali Oro C2008' during the years of evaluation.

Regarding its resistance to leaf rust, it is known through studies of molecular markers (Dr. Karim Ammar, personal communication), that this cultivar has the *Lr14a* gene, for which the known races in Southern Sonora are avirulent. Therefore, it is likely that this gene confers at least part of the resistance. The resistant reaction to partial bunt was determined by field artificial inoculations during the test seasons in several sowing dates. Semolina quality for

específico medio es de 83.2 kg hL⁻¹. En todos los años de evaluación, 'Sáwali Oro C2008' mostró una reacción de resistencia a la roya de la hoja y al carbón parcial. Respecto a su resistencia a roya de la hoja, es conocido a través de estudios de marcadores moleculares (Dr. Karim Ammar, comunicación personal), que esta variedad posee el gen *Lr14a*, para el cual las razas conocidas en el sur de Sonora son avirulentas, por lo que es muy probable que sea al menos parcialmente el causante de esa resistencia. La reacción de resistencia al carbón parcial, la mostró en evaluaciones de campo mediante inoculaciones artificiales durante los ciclos de prueba en varias fechas de siembra.



Figura 2. El grano de la variedad 'Sáwali Oro C2008' es semielíptico, la vellosidad de la brocha en vista dorsal es mediana y la coloración del grano al ser tratado con fenol puede ser tenue o nula.

Figure 2. The grain of 'Sáwali Oro C2008' is semi-elliptic, brush hairiness on a dorsal view is medium, and grain and coloration when treated with phenol can be light or nil.

El contenido y la calidad de la proteína y el pigmento presente en el endospermo del grano de los trigos cristalinos determinan la calidad de la semolina para la elaboración de pasta. 'Sáwali Oro C2008' tiene alto contenido de proteína (14%) y color valor b de Minolta de 27.8. Supera en forma consistente al testigo 'Júpate C2001' en los contenidos de proteína y de pigmento amarillo en el endospermo del grano.

La siembra de 'Sáwali Oro C2008' se recomienda para el ciclo otoño-invierno en la región del noroeste de México, que comprende parte de los estados de Baja California Sur, Baja California, Sinaloa y Sonora. En el ciclo agrícola otoño-invierno 2009-2010 se sembró en 4,761 ha en el sur de Sonora, representando 1.93% del total de área sembrada con trigo, mientras que en el 2010-2011 se sembró en 14,328 ha (5.65%).

Agradecimientos. A la Coordinadora Nacional de Fundaciones Produce, A. C. (proyecto 40-2007-0900) y al Patronato para la Investigación y Experimentación Agrícola en el estado de Sonora (PIEAES), por el financiamiento parcial de los trabajos de investigación que condujeron a la obtención de la variedad 'Sáwali Oro C2008'. También al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por proporcionar las líneas avanzadas de donde se originó la variedad.

pasta-making is determined by the content and quality of the protein and the pigment present in the grain endosperm of durum wheat. 'Sáwali Oro C2008' has high protein content (14%) and color Minolta b value of 27.8. It is consistently superior to cultivar check 'Júpate C2001' in protein content and yellow pigment in the grain endosperm.

'Sáwali Oro C2008' is recommended for the fall-winter season in the Northwestern region of Mexico, which comprises the states of Baja California, South Baja California, Sinaloa, and Sonora. A total of 4,761 ha were sown with this cultivar in Southern Sonora during the 2009-2010 season, representing 1.93% of the total area sown with wheat, whereas in 2010-2011 it occupied 14,328 ha (5.65%).

Acknowledgements. To the Coordinadora Nacional de Fundaciones Produce, A.C. (project 40-2007-0900) and the Patronato para la Investigación y Experimentación Agrícola en el Estado de Sonora (PIEAES), for the partial funding of the research that led to the release of cultivar 'Sáwali Oro C2008'. Also to the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), for providing the advanced lines from which the cultivar originated.

LITERATURA CITADA

- Camacho CMA, Fuentes DG, Figueroa LP, Peña BRJ, Chávez VG, Valenzuela HV, Félix FJL y Mendoza LA. 2010. Banámichi C2004, nueva variedad de trigo cristalino. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:263-268.
- Camacho CMA, Figueroa LP y Huerta EJ. 2004. Júpate C2001, nueva variedad de trigo duro para su cultivo en el noroeste de México. *Folleto Técnico No. 47. INIFAP-CIRNO, Campo Experimental Valle del Yaqui. Cd. Obregón, Sonora, México.* 16p.
- Farmers of North America. 2009. Durum Wheat: 07/08 Outlook. http://www.fna.ca/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=332 (Consulta, agosto de 2011).
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.* <http://www.sap.gob.mx> (Consulta, mayo de 2011).
- Singh RP, Huerta EJ, Pfeiffer W and Figueroa LP. 2004. Occurrence and impact of a new leaf rust race on durum wheat in the Northwestern Mexico during 2001-2002. *Plant Disease* 88:703-708.

Revista Mexicana de Fitopatología (RMF)

Guía para Autores

Se aceptarán manuscritos en inglés o español de miembros y no miembros de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Los manuscritos podrán ser: Artículos científicos, revisiones, notas de investigación, descripción de variedades y cartas al editor. La publicación es bilingüe y sin costo de traducción. El comité editorial puede solicitar revisiones bibliográficas o contribuciones sobre temas específicos. Para su aceptación, los escritos deben tener las siguientes características:

- 1) Presentar un trabajo original sobre algún aspecto básico o aplicado de la fitopatología.
- 2) Puede ser artículo científico que precise un estudio concluido (repetido en tiempo y espacio), o artículo de revisión sobre hipótesis, teoría u otros temas fitopatológicos.
- 3) Notas fitopatológicas, incluyen originales sobre técnicas, observaciones, aspectos históricos de datos fitopatológicos. No contienen las secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 4) Descripción de variedades o híbridos vegetales, se basa en las características de material vegetativo que manifieste tolerancia o resistencia a enfermedades. No requiere secciones como introducción, materiales y métodos, y resultados y discusión.
- 5) Cartas al editor, pueden ser opiniones concisas sobre trabajos fitopatológicos, principios, reseñas de libros o críticas. El comité editorial se reserva el derecho de publicar o rechazar este tipo de artículos.

La estructura de los manuscritos deberá apegarse a las normas editoriales de la revista, por lo que antes de enviarlo al editor será revisado, si no cumple con las normas se regresará al autor. El comité editorial de la RFM se reserva el derecho de rechazar cualquier trabajo, si no reúne los requisitos de calidad, consistencia y originalidad. Se acepta por anticipado que no han sido ni serán enviados a alguna otra revista.

GUÍA PARA EL FORMATO

Texto. Escriba en una forma clara y concisa. Use las palabras con precisión, claridad y economía. Cada oración debe ser exacta y simple. Describa las observaciones y los experimentos en tiempo pasado, use el presente para generalizaciones. Use oraciones directas y evite la voz pasiva; compare: "Las bacterias producen antibióticos" con "los antibióticos son producidos por bacterias". Evite los superlativos y palabras como: "muy", "mucho", "bastante", etc. También evite el uso de gerundios. Utilizar palabras cuando los números sean menores de 10 y sin estar asociados con medidas. Use las palabras técnicas con su significado preciso; acuda al diccionario especializado cuando haya duda. Se escriben en *itálicas* los nombres científicos y expresiones latinas como: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. Los nombres científicos de plantas o agentes fitopatógenos no llevarán descriptor(es). Al terminar de escribir el manuscrito, estudie

Author's Guide

Manuscripts are accepted in English or Spanish from members and non-members of the Mexican Society of Phytopathology (SMF). Manuscripts may be: scientific articles, reviews, research notes, descriptions of varieties and letters to the editor. The publication is bilingual (English and Spanish) and without translation costs. The editorial board may request literature reviews or contributions on specific topics. For acceptance, the writings must have the following characteristics:

- 1) Submit an original work on some aspect of basic or applied plant pathology.
- 2) Can be a scientific paper that requires completed study (repeated in time and space), or review article on hypothesis, theory or other phytopathology topics.
- 3) Phytopathological notes include original techniques, observations and historical aspects of phytopathology data. They don't contain sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 4) Description of plant varieties or hybrids, it is based on the characteristics of plant material expressing tolerance or resistance to diseases. Does not require sections such as introduction, materials and methods, results and discussion.
- 5) Letters to the editor may be concise opinions on phytopathological studies, principles, book reviews or critics. The editorial board reserves the right to publish or reject such articles.

The structure of the manuscripts should adhere to the editorial standards of the journal, therefore it will be reviewed before sending it to the editor, and if it fails to meet such standards it will be returned to the author. The editorial board of the RMF reserves the right to refuse any work, if it does not meet the requirements of quality, consistency and originality. It is agreed in advance that they have not been and will not be sent to another journal.

FORMAT GUIDE

Text. Write clearly and concisely. Use words with precision, clarity and economy. Each sentence must be accurate and simple. Describe observations and experiments in the past tense, use the present tense to generalize. Use direct sentences and avoid the passive voice; compare: "The bacteria produce antibiotics" with "antibiotics are produced by bacteria". Avoid superlatives and words like "very", "many", "more", etc. Also avoid the use of gerunds. Use words when numbers are under 10 and not associated with measurements. Utilize technical words with their precise meaning; refer to a specialized dictionary when in doubt. Scientific names and phrases in Latin are written in *italics*, such as: *in situ*, *in vivo*, *in vitro*, *et al.*, etc. The scientific names of plants or plant pathogens will not have descriptor(s). When you finish writing the manuscript, study each sentence to determine whether

cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que el manuscrito haya cada oración para determinar si se puede acortar u omitir. Antes de enviarse, asegúrese que el manuscrito haya sido revisado críticamente por sus colaboradores y por dos colegas. Adicionar carta de aprobación de los colaboradores.

Manuscritos. Los textos se escriben con letra Times New Roman, tamaño 12 y con márgenes de 2.5 cm en los cuatro lados. Para artículos científicos y de revisión, el manuscrito no deberá exceder de 20 páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras. Las notas fitopatológicas y la descripción de variedades no deberán exceder de siete páginas escritas a espacio y medio incluyendo cuadros y figuras. El inicio de cada párrafo llevará sangría de 1 cm (excepto el primer párrafo introductorio). Incluya fotografías originales; si contiene gráficas, envíe los datos originales. Los manuscritos deben enviarse por correo electrónico a: **revmexfitopatologia@prodigy.net.mx** en Microsoft Word. La comunicación de los editores será exclusivamente con el autor de correspondencia. Los manuscritos que sean aceptados serán propiedad de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.

ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO

Título. El título debe identificar el contenido del tema; escriba títulos claros, concisos, específicos, no mayores de 15 palabras. Se debe escribir en mayúsculas y minúsculas, en negritas y centrado, evite iniciar con: "Investigación sobre...", "Estudios sobre...", etc. No se aceptarán títulos que indican una serie de trabajos relacionados, a menos que se envíen juntos. Los nombres científicos se escribirán en cursivas y sin incluir el (los) descriptor(es). En seguida del título en español se escribe el título en inglés.

Autor-institución. Abajo del título escriba el nombre completo de los autores con minúsculas, en negritas y justificado. Después de cada autor, escriba con minúsculas y sin negritas el nombre de la institución(es) correspondiente(s). Incluya el departamento, ciudad, estado y código postal, e indique el autor para correspondencia.

Ejemplo: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Departamento de Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados Unidad Irapuato, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

Resumen. El encabezado deberá escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. El resumen debe sintetizar, en un sólo párrafo, los aspectos más relevantes de la investigación, sin exceder más de 200 palabras. No repita el título en el texto del resumen; use la nomenclatura científica y evite las abreviaturas.

Palabras clave adicionales. Debe escribirse en letras

they can be shortened or omitted. Before sending, make sure that the manuscript has been critically reviewed by co-authors and two colleagues. Include letter of approval from co-authors.

Manuscripts. Texts are written in Times New Roman font, size 12 and with margins of 2.5 cm on all four sides. For scientific and revision articles, the manuscript should not exceed 20 pages written in one and a half space, including tables and figures. Phytopathological notes and descriptions of varieties should not exceed seven pages written in one and a half space including tables and figures. The beginning of each paragraph is to be indented 1 cm (except the first introductory paragraph). Include original photographs; if it contains graphs and/or charts, please send the original data. Manuscripts should be submitted by e-mail to **revmexfitopatologia@prodigy.net.mx** in Microsoft Word. Communication from the editors will be exclusively with the corresponding author. Accepted manuscripts will be property of the Mexican Society of Phytopathology. (Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.)

MANUSCRIPT ORGANIZATION

Title. The title should identify the content of the topic; write titles clear, concise, specific and no more than 15 words. It should be written in uppercase and lowercase letters, in bold and centered, avoid starting with: "Research on...", "Study about...", etc. Titles indicating a series of works will not be accepted, unless they are sent together. Scientific names will be written in italics and not including the descriptor(s). The title in English is written next to the title in Spanish.

Author-institution. Write the full names of the authors below the title, in lower case, bold and justified. After each author, write the name of the corresponding institution(s) in lower case and not in bold. Include the department, city, state, zip code, and indicate the corresponding author.

Example: **Emma Zavaleta Mejía**, Laboratorio de Fisiología y Fitopatología Molecular, Especialidad de Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, edo. México, CP 56230, México; **June K. Simpson**, Department of Plant Genetic Engineering, Center for Research and Advanced Studies Irapuato Unit, Instituto Politécnico Nacional, km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto., CP 36821, México. Correspondence: zavaleta@colpos.mx.

Abstract. The header must be written in bold, lower case letters and aligned to the left. The abstract should summarize, in a single paragraph, the most important aspects of the research, without exceeding 200 words. Do not repeat the title in the abstract; use scientific nomenclature and avoid abbreviations.

Additional key words. Must be written in lowercase letters and aligned to the left. Provide a list of up to six key words below the abstract, for the purpose of international compilation, that are not included in the title of the work.

minúsculas y a la izquierda. Abajo del resumen proporcione una lista de hasta seis palabras clave que sirvan para fines de compilación internacional, que no se incluyan en el título del trabajo.

Resumen. Esta sección debe escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. Proporcione una traducción fiel en inglés de lo escrito en el resumen en español.

Palabras claves adicionales. Debe escribirse en letras minúsculas y a la izquierda. Abajo del abstract proporcione una traducción fiel en inglés de la lista de las palabras señaladas en la sección de Palabras clave adicionales.

Los títulos de las secciones de Resultados, Discusión, Conclusiones y Literatura Citada, se escriben con mayúsculas, en negritas, en un solo renglón y a la izquierda de la hoja. Los subtítulos se escriben en minúsculas, en negritas y con punto y seguido.

INTRODUCCIÓN. Este encabezado se omite. La introducción incluye la descripción del problema. Justifique su investigación con referencias actuales y relevantes, y explique los objetivos del trabajo. La cita de referencias en el texto debe presentarse de la forma siguiente: Hasta dos autores, el apellido y año; más de dos autores, apellido del primer autor y *et al.*, seguido del año de publicación. El uso del paréntesis depende de la estructura general de la oración. Ejemplos: Un autor, Pfender (2010) o (Pfender, 2010); dos autores, Funnell y Pedersen (2009) o (Funnell y Pedersen, 2009); y tres o más autores, Angulo *et al.* (2009) o (Angulo *et al.*, 2009). Si el autor(es) y años son idénticos para más de una referencia, inserte una letra minúscula (en secuencia alfabética) después del año. Ejemplo: Ascencio *et al.* (2008a) o (Ascencio *et al.*, 2008b). Use punto y coma para separar varias referencias. Ejemplo: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS. En esta sección se describa los materiales y la metodología empleados con el detalle necesario, como para que otra persona pueda repetir exactamente el procedimiento. Se citará el lugar, fecha, tratamiento, método, diseño experimental, variables evaluadas, forma y época donde se obtuvieron los datos, análisis realizado, comparación de medias y programa estadístico. Cuando se trate de metodologías específicas, indique la referencia bibliográfica de donde se tomó, e indique las modificaciones pertinentes. Presente la información de una manera clara, ordenada y coherente. Use fotografías, cuadros y dibujos, solamente cuando ayuden a aclarar y documentar el texto. Las ilustraciones deben ser funcionales y no repetir el material descrito en el texto.

RESULTADOS. Presente datos concisos sobre los principales efectos con base en métodos estadísticos apropiados. Cuando se señalen diferencias entre dos grupos de resultados, mencione la significancia, evite señalar tendencias. La discusión de los resultados se puede presentar bajo un encabezado separado; sin embargo, si el

Abstract. This section should be written in bold, lowercase letters and aligned to the left. Provide an accurate translation in Spanish of what was written in English in the Abstract section.

Additional keywords. Must be written in lowercase letters aligned to the left. Below the “Resumen” provide an accurate translation in Spanish of the key words list mentioned in the section Additional Key Words.

The titles of sections Results, Discussion, Conclusions, and Literature Cited, are written in capital, bold letters of no more than one line and aligned to the left of the page. Subtitles are written in lowercase, bold letters followed by a semicolon.

INTRODUCTION. This header is omitted. The introduction includes a description of the problem. Justify your research with current and relevant references, and explain the objectives of the work. The citation of references in the text should be presented in the following manner: Up to two authors, last name and year; more than two authors, last name of the first author and *et al.*, followed by the year published. The use of parenthesis depends on the general structure of the sentence.

Examples: One author, Pfender (2010) or (Pfender, 2010); two authors, Funnell and Pedersen (2009) or (Funnell and Pedersen, 2009); and two or more authors, Angulo *et al.* (2009) or (Angulo *et al.*, 2009). If the author(s) and year(s) are identical for more than one reference, insert a lower case letter (in alphabetical order) after the year. Example: Ascencio *et al.* (2008a) or (Ascencio *et al.*, 2008b). Use a semicolon to separate multiple references. Example: (Alvarado *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2011).

MATERIALS AND METHODS. This section describes the materials and methodology employed with the necessary detail, so that someone else can repeat the procedure exactly. Citing the location, date, treatment, method, experimental design, variables measured, manner and time where data were obtained, analysis carried out, comparison of means and statistical program. In the case of specific methodologies, indicate where the bibliographic reference was made, and indicate the necessary modifications. Present information in a clear, orderly and coherent manner. Use photographs, tables, graphs and drawings, only when they help to clarify and document the text. Illustrations must be functional and not repeat the material described in the text.

RESULTS. Present concise data on the main effects based on appropriate statistical methods. When you point out differences between two sets of results, mention the significance, do not identify trends. The discussion of the results can be presented under a separate header; however, if the author prefers, both issues can be presented under RESULTS AND DISCUSSION.

DISCUSSION. Should interpret the results of the work and

autor lo prefiere, ambos temas se pueden presentar bajo RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

DISCUSIÓN. Debe interpretar los resultados del trabajo y relacionarlos con investigaciones previas o con trabajos similares reportados en la literatura, incluir deducciones lógicas, no caer en especulaciones carentes de sustento, además, se pueden añadir sugerencias para estudios futuros.

CONCLUSIONES. En este apartado se anotarán de manera breve, sin numeración, las aportaciones concretas al conocimiento en función a los resultados obtenidos en el estudio.

Agradecimientos. El encabezado deberá escribirse en letras negritas, minúsculas y a la izquierda. En esta sección se deberá expresar las gratitudes y reconocimientos de personas o instituciones. Puede mencionar la ayuda técnica, económica, o de cualquier otra naturaleza, así como si es parte de una tesis.

LITERATURA CITADA. Contendrá la lista de todas las citas mencionadas en el texto, las cuales se presentarán en orden alfabético y en sangría 'francesa'. Se debe incluir sólo trabajos publicados o en prensa, sometidos a procesos formales de arbitraje y edición, accesibles a través de bibliotecas o sistemas de información. No use "anónimo" como referencia, utilice las siglas y el nombre de la institución o fuente que publica la información. La estructura seguirá la secuencia siguiente:

1. Revistas científicas

- a) Autor(es). El apellido paterno seguido de las iniciales del apellido materno y nombre(s). Separe con una coma la última inicial del primer autor y siga con el apellido e iniciales de los coautores.
- b) Año de publicación.
- c) Título del trabajo. Sólo la primera letra de la primera palabra en un título en mayúsculas, a menos que se incluyan nombres propios.
- d) Nombre completo de la revista en que fue publicado el trabajo.
- e) Volumen y páginas.

Ejemplos: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:97-110.

2. Libros

Autor(es), año, título (en mayúsculas y minúsculas), edición, casa editorial, lugar de publicación y el número de páginas. Ejemplos: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition.

relate them to previous investigations or similar work reported in literature, include logical deductions, do not fall into unsubstantiated speculation, also, suggestions for future research can be added.

CONCLUSIONS. This section will contain concrete contributions to knowledge according to the results obtained in the study. They will be written briefly and without numbering.

Acknowledgements. The header must be written in bold, lowercase letters, aligned to the left. This section should express gratitude and appreciation of individuals or institutions. You may mention technical, economic or help of any nature, as if part of a thesis.

LITERATURE CITED. This will contain the list of all citations mentioned in the text, which will be presented in alphabetical order. It includes only works published or in press, subjected to formal processes of arbitration and editing, accessible through libraries or information systems. Do not use "anonymous" as a reference, use the initials and the name of the institution or source that published the information. The structure will have the following sequence:

1. Scientific Journals

- a) Author(s). Last name followed by the initial of mother's surname (if available) and first name(s). Separate with a comma the last initial of the first author and follow with the last names and initials of the co-authors.
- b) Year of publication.
- c) Title of the work. Only the first letter of the first word on the title in capitals, unless proper names are included.
- d) Full name of the journal that published the work.
- e) Volume and pages.

Examples: Segarra G, Casanova E, Avilés M and Trillas I. 2010. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls Fusarium wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron. *Microbial Ecology* 59:141-149.

Pérez ML, Navarro LJ, Ramírez MR y Mendoza CB. 2010. Impacto e identificación de virus fitopatógenos sobre rendimiento y calidad de ajo (*Allium sativum* L.) en el estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:97-110.

2. Books

Author(s), year, title (capital and lowercase letters), edition, publisher, place of publication, and number of pages.

Examples: Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.

Rueda PJ. 2009. *Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal*. Plaza y Valdés. México. 141p.

3. Book chapter

Academic Press. New York, USA. 922p. Rueda PJ. 2009. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal. Plaza y Valdés. México. 141p.

3. Capítulo de libro

Autor(es), año, título (minúsculas), páginas, editor(es), título del libro (mayúsculas y minúsculas), volumen, empresa editora, lugar de la publicación y número total de páginas.

Ejemplos: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible. Plaza y Valdés. México. 255p.*

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.*

4. Folletos

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppla N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

5. Consultas en web

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8.* www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/ (consulta, junio 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index (consulta, septiembre 2011).

Cuadros. Deben tener títulos entendibles sin necesidad de referirse al texto. Los cuadros deben documentar, pero no duplicar los datos que se presentan en el texto. Incluirlos de manera numerada, según el texto, en hojas separadas y a continuación de la literatura citada. La leyenda se escribe con minúsculas. Identifique las notas al pie de los cuadros con letras minúsculas del final del alfabeto (en secuencia: x, y, z). Para indicar niveles de significancia estadística, utilice asteriscos (*= p 0.05, **= p 0.01). En cifras usar solo un decimal, p. ej. 3.2% y no 3.195%.

Figuras. Numere cada figura (gráficas dibujos, fotografías, etc.) para que corresponda con la referencia del texto. Las leyendas se deben escribir en minúsculas, en una hoja por separado y anexarse a continuación de los cuadros. Las fotografías deben ser originales y pueden ser en blanco y

Author(s), year, title (lowercase), pages, editor(s), title of the book (capital and lowercase letters), volume, publisher, place of publication and total number of pages.

Examples: Ferrera CR y Alarcón A. 2008. Biotecnología de los hongos micorrízicos arbusculares. Pp:25-38. *In: Díaz FA y Mayek PN. (eds.). Biofertilización como Tecnología Sostenible. Plaza y Valdés. México. 255p.*

Reddy BBS, Ramesh S and Reddy PS. 2006. Sorghum genetic resources, cytogenetics and improvement. Pp:309-363. *In: Singh RJ and Jauhar PP (eds.). Genetics Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol. 2. Cereals. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 366p.*

4. Booklets

Velásquez VR, Mena CJ, Amador RM y Reveles HM. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando chile y jitomate en Zacatecas. Campo Experimental Zacatecas, INIFAP. Folleto Técnico No. 20. Calera, Zac., México. 24p.

Funderburk J, Reitz S, Stansly P, Schuster D, Nuessly G and Leppla N. 2009. Managing thrips in pepper and eggplant. University of Florida, IFAS. Publ. 658. USA. 10p.

5. Web queries

Koenning S, Mueller J, Kemerait R and Phipps P. 2008. Soybean rust. *North Carolina State University. Information Note 8.* www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/soybean/soy008/ (consulted, June 2010).

SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. www.siap.gob.mx/index (consulted, September 2011).

Tables. Titles should be understood without the need to refer to the text. Tables should document, but not duplicate the data presented in the text. Include them listed by number, according to the text, in separate pages, after the Literature Cited section. The legend is written in lowercase letters. Identify the notes at the bottom of the tables with lowercase letters starting with the last (in sequence: x, y, z). To indicate levels of statistical significance, use asterisks (*= p 0.05, **= p 0.01). Use only one digit after the decimal, for example 3.2% and not 3.195%.

Figures. Number each figure (graph, drawing, photograph, etc.) to match references in the text. Legends should be written in lowercase, in a separate page and attached after the tables. Photographs must be original and can be in black & white or color. Poor quality photographs will not be accepted. Do not write or draw arrows on original photos. Abbreviations and symbols used in the figures should match the same style used in the text. When a set of figures are presented with a single legend, the components will be identified by capital letters of the same type and size.

negro o a color. No se aceptarán fotografías de mala calidad. No escriba o pegue flechas sobre las fotos originales. Las abreviaturas y símbolos usados en las figuras deben concordar con el mismo estilo usado en el texto. Cuando un conjunto de figuras son presentadas con una sola leyenda, los componentes se identificarán con letras mayúsculas del mismo tipo y tamaño.

Fertilizantes. Describa las dosis de fertilizantes en términos elementales (ejemplo: N, P, K, etc.). Si es necesario se puede señalar la fuente del fertilizante.

Plaguicidas. Use el nombre técnico (ingrediente activo) y concentración de los plaguicidas, el nombre comercial puede incluirse en paréntesis. Manuscritos sobre manejo de agroquímicos se considerarán siempre y cuando su contenido aporte nuevos conocimientos técnico-científicos.

Medidas. Se utilizará el sistema métrico decimal. Las abreviaturas serán en singular sin estar seguidas de punto. Las más comunes son:

Celsius = °C
Centímetro = cm
Gramo = g
Hectárea = ha
Hora = h
Kilogramo = kg
Kilogramos por hectárea = kg ha⁻¹
Kilómetro = km
Litro = L
Metro = m
Micron = μm
Miligramo = mg
Mililitro = mL
Milímetro = mm
Milimicra = mμ
Minuto = min
Nanómetro = nm
Segundo = seg
Temperatura = temp
Tonelada = t

Algunas referencias útiles para escribir artículos científicos en la RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.
Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub 1/.

© Copyright Sociedad Mexicana de Fitopatología

Fertilizers. Describe the doses of fertilizers in terms of elements (e.g.: N, P, K, etc.). If necessary, the source of the fertilizer may be pointed out.

Pesticides. Use the technical name (active ingredient) and concentration of the pesticides, the commercial name may be included in parenthesis. Manuscripts on agricultural chemical management will be considered as long as the content provides new technical and scientific knowledge.

Measurements. The metric system will be used. The abbreviations will be in the singular form and will not be followed by a period. The most common are:

Celsius = °C
Centimeter = cm
Gram = g
Hectare = ha
Hour = h
Kilogram = kg
Kilograms per hectare = kg ha⁻¹
Kilometer = km
Liter = L
Meter = m
Micron = μm
Milligram = mg
Milliliter = mL
Millimeter = mm
Millimicrons = mμ
Minute = min
Nanometer = nm
Second = sec
Temperature = temp
Ton = t

Some useful references for writing scientific articles in the RMF:

Alvarado L. 2000. Redacción y Preparación del Artículo Científico. Segunda edición. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo y Colegio de Posgraduados. Texcoco, Edo. México. 241p.
Mari M. 2004. Manual de redacción científica. Caribbean Journal of Science. Publicación Especial No. 3. www.caribjusci.org/epub 1/.

© Copyright Sociedad Mexicana de Fitopatología