

# Review of diagnosis techniques for *Brenneria* spp in walnut (*Juglans regia*)

## Revisión de técnicas de diagnóstico de *Brenneria* spp en nogal (*Juglans regia*)

Julia Anguiano Cabello, Roberto Arredondo Valdés, Ernesto Cerna Chávez, Mariana Beltran Beache, Juan Carlos Delgado Ortiz, Yisa María Ochoa Fuentes\*. Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México. \*Autor de Correspondencia: yisa8a@yahoo.com

Recibido: 20 de Enero, 2016

Aceptado: 01 de Mayo, 2016

Anguiano-Castellano J, Arredondo-Valdés R, Cerna-Chávez E, Beltran-Beache M, Delgado-Ortiz JC y Ochoa-Fuentes YM. Revisión de técnicas de diagnóstico de *Brenneria* spp en nogal (*Juglans regia*). Revista Mexicana de Fitopatología 34: 158-172.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1601-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-3)

Primera publicación DOI: 09 de mayo 2016

First DOI publication: May 9th of 2016

### RESUMEN

*Brenneria nigrifluens* y *Brenneria rubrifaciens*, causan el cancro superficial y profundo de la corteza del nogal, respectivamente. *B. nigrifluens* ocasiona necrosis en la corteza exterior y manchas dispersas de exudado marrón oscuro. Los síntomas de *B. nigrifluens* involucra hoyos en la madera, grietas profundas longitudinales en el tronco, exudado color oscuro marrón con bacterias que fluyen de las grietas de las ramas. Finalmente, las dos enfermedades pueden ocasionar pérdida de vigor y muerte de los árboles. El cancro del nogal ocasionado por especies de *Brenneria* se ha reportado principal-

### ABSTRACT

*Brenneria nigrifluens* and *B. rubrifaciens* cause superficial and deep canker in walnut bark, respectively. *B. nigrifluens* causes necrosis in the outer bark and scattered dark brown exudate spots. The symptoms of *Brenneria nigrifluens* involve holes in the wood, deep longitudinal cracking in the trunk; dark brown bacterial exudate flowing through branch cracks, and eventually the two diseases can cause loss of vigor and death of the trees. Walnut canker caused by *Brenneria* species has been reported in USA, France, Spain, Italy, Hungary, Persia and Iran. These symptoms have not been reported in Mexico; however, SENASICA (National Service of Health, Food Safety and Food Quality) has developed risk maps to prevent *Brenneria*, since walnut in Mexico is a profitable crop that reached 125 758.45 tons in 2014, equivalent to more than 6 173 538 million pesos. Due to *Brenneria*'s bacterial pathogenicity timely diagnosis is crucial to achieve good disease management. The main diagnosis methods for *Brenneria* genera are: Traditional techniques,

mente en Estados Unidos, Francia, España, Italia, Hungría, Persia e Irán. En México no se han reportado, sin embargo, SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) ha establecido mapas de riesgo, ya que en México el nogal pecanero es un cultivo rentable, para el año 2014, se tuvo una producción de 125 758 ton, con un valor mayor a 6 173 millones de pesos. Debido a la patogenicidad de las bacterias, el diagnóstico oportuno es clave en el manejo de la enfermedad. Los principales métodos de diagnóstico del género *Brenneria* spp son: observación de signos y síntomas, pruebas bioquímicas como el sistema API, Biolog y el análisis de los ácidos grasos celulares; técnicas serológicas; técnicas moleculares como PCR punto final y tiempo real; así como técnicas cromatográficas (HPLC, CCD) para detección de metabolitos específicos como la rubrifacina. El trabajo tiene como objetivo presentar la situación a nivel nacional y mundial del cancro del nogal, así como revisión de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad.

**Palabras clave adicionales:** *Brenneria*, cancro, nogal, epidemiología, síntomas, diagnóstico.

El género *Brenneria* fue descrito en 1998 (Hauben *et al.*, 1998) para agrupar a seis especies bacterianas, anteriormente incluidas en el género *Erwinia* (González *et al.*, 2002). Las 6 especies incluidas en el género *Brenneria* son: *B. alni*, *B. nigrifluens*, *B. paradisiaca*, *B. quercina*, *B. rubrifacies* y *B. salicis*. De las especies antes mencionadas, *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* son las más estudiadas debido a que afectan al nogal de castilla (*Juglans regia* L.), que es un cultivo de alto valor económico en el mundo. *B. nigrifluens* es causante del cancro superficial de la corteza y *B. rubrifaciens*

biochemical test (API system, Biolog and fatty-acid cell analysis); the serological technique; molecular methods such as end-point PCR and real-time PCR; as well as chromatographic techniques (HPLC, CCD) for the detection of specific metabolites like rubrifacine. The purpose of this work is to provide an outlook of domestic and global walnut canker, as well as reviewing the diagnosis techniques for this disease.

**Additional Keywords:** *Brenneria*, canker, walnut, epidemiology, symptoms, diagnosis.

The genus *Brenneria* was described in 1998 (Hauben *et al.*, 1998) to group six bacterial species, previously included in the genus *Erwinia* (González *et al.*, 2002). The six species included in the genus *Brenneria* are: *B. alni*, *B. nigrifluens*, *B. paradisiaca*, *B. quercina*, *B. Rubrifacies*, and *B. salicis*. Of these species, *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* are the most studied, since they attack the common walnut tree (*Juglans regia* L.), which is a crop with a high economic value worldwide. *B. nigrifluens* causes surface bark canker and *B. Rubrifaciens*, deep bark canker in common walnut trees. In Europe, *B. nigrifluens* was identified in walnut orchards. The bacteria was later found in France and Italy in young plants and adult trees (Saccardi *et al.*, 1998; Morone *et al.*, 1998; Ménard *et al.*, 2004; Nelson and Hudler, 2007; Scortichini 2008; Abeysekara, 2014; Narayanasamy, 2011). In Spain, *B. rubrifaciens* has been reported in walnut trees and trees imported from California (González *et al.*, 2002; Nelson and Hudler, 2007). In Mexico, no *Brenneria* has been reported in the plantations of the pecan trees *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch or common walnut trees, although SENASICA has established risk maps due to the national economic importance of walnut trees, since in Mexico, the

del cancro profundo de la corteza del nogal de castilla. En Europa *B. nigrifluens* fue identificado en huertas de nogal de castilla. Posteriormente, la bacteria fue detectada en Francia e Italia en plantas jóvenes y árboles adultos (Saccardi *et al.*, 1998; Morone *et al.*, 1998; Ménard *et al.*, 2004; Nelson y Hudler, 2007; Scortichini, 2008; Abeysekara, 2014; Narayanasamy, 2011). En España *B. rubrifaciens* ha sido reportada en nogales de castilla y en árboles importados de California (González *et al.*, 2002; Nelson y Hudler, 2007). En México no se ha reportado *Brenneria* en los cultivos de nogales pecanero *Carya illinoensis* (Wang.) K. Koch ni de castilla, pero SENASICA ha establecido mapas de riesgo por la importancia económica del nogal pecanero a nivel nacional, ya que en el país, la superficie sembrada fue según SIAP (2014) de 108 011 ha, con una superficie cosechada de 75 439 ha, con una producción de 125 758 ton y un rendimiento de 1.67 ton ha<sup>-1</sup>. Los principales estados productores de nuez pecanera son: Chihuahua con el 54 % del volumen nacional, Sonora 16 %, Coahuila 14 %, Durango 6 % y Nuevo León 5 %. El 98.8 % de la nuez es pecanera, 1.1 % de castilla y 0.1 % criolla (SAGARPA-SIAP, 2013). En el país la producción de nuez de castilla se obtiene de forma tradicional desde hace tres siglos, esta se concentra en los estados de Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Oaxaca y Querétaro (Luna *et al.*, 2013). La importancia de la enfermedad y dificultades en el control de *Brenneria* spp. resaltan el impacto de un diagnóstico oportuno (Bettiol *et al.*, 2014; López y Peñalver, 2005), sin embargo, la enfermedad puede ser asintomática en un inicio, esto puede dificultar el diagnóstico. Entre las técnicas para el diagnóstico de *Brenneria* se encuentran las pruebas bioquímicas, utilización de medios selectivos, técnicas moleculares, técnicas serológicas y pruebas de patogenicidad (Moretti y Buonario, 2010). En el presente trabajo se tiene como objetivo presentar la situación a nivel nacional y mundial del cancro del nogal, así

surface planted was, according to SIAP (2014) of 108 011 ha, with a surface harvested of 75 439 ha, a production of 125,758 tons, and a yield of 1.67 tons ha<sup>-1</sup>. The main walnut producing states are: Chihuahua, with 54% of the total national volume, Sonora 16 %, Coahuila 14 %, Durango 6 %, and Nuevo León 5 %; 98.8 % of the walnut trees are pecans, 1.1 % are common walnut, and 0.1 % is native (SAGARPA-SIAP, 2013). In Mexico, walnut production is three centuries old, and is concentrated in the states of Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Oaxaca and Querétaro (Luna *et al.*, 2013). The importance of the disease and difficulties in the control of *Brenneria* spp. highlight the impact of a timely diagnosis (Bettiol *et al.*, 2014; López and Peñalver, 2005). However, the disease may be initially asymptomatic, and this may make the diagnose more difficult. Some of the techniques used to diagnose *Brenneria* are biochemical tests, the use of selective media, molecular techniques, serological techniques, and pathogenicity tests (Moretti and Buonario, 2010). The aim of this work is to provide an outlook of domestic and global walnut canker, as well as reviewing the diagnosis techniques for this disease..

#### DISTRIBUTION OF THE DISEASE

**Worldwide.** *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* have been reported in different as the causes of the walnut canker. The main countries in which they have been reported are Iran (Yousefi *et al.*, 2007; Jamalzade *et al.*, 2012; Roshangar and Harighi, 2009), France, Spain (Loreti *et al.*, 2008), Italy (Loreti *et al.*, 2005; Pardatscher and Schweigkofler, 2009) and the United States (Wilson *et al.*, 1957). Table 1 summarizes reports of *Brenneria* that causes walnut canker in different areas of the world, as well as the techniques used to identify the pathogens.

como la revisión de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad.

### DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

**Nivel mundial.** *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* han sido reportados en distintas regiones del mundo como causantes del cancro del nogal. Los principales países en los que se han reportado son: Irán (Yousefi *et al.*, 2007; Jamalzade *et al.*, 2012; Roshangar y Harighi, 2009), Francia, España (Loreti *et al.*, 2008), Italia (Loreti *et al.*, 2005; Pardatscher y Schweigkofler, 2009) y Estados Unidos (Wilson *et al.*, 1957). En el Cuadro 1 se resumen reportes de *Brenneria* causante de cancro del nogal en distintas regiones del mundo, así como las técnicas utilizadas para la identificación de los patógenos.

**Nivel nacional.** En México no existen reportes de infección de nogales pecaneros con *B. rubrifaciens* o *B. nigrifluens*. No obstante, existen zonas con hospederos y condiciones climáticas similares a otras regiones del mundo en los que se ha presentado la enfermedad. Según las estadísticas mostradas por SIAP (2013) *B. rubrifaciens* representa un elevado riesgo para México ya que el nogal pecanero es uno de los cultivos más rentables a nivel nacional. Para el año 2011, la superficie sembrada fue superior a las 96 000 ha (SIAP, 2013). Por estas razones SENASICA (2013) ha establecido mapas de riesgo indicando las zonas de posible incidencia de *B. rubrifaciens*. La cercanía a Estados Unidos también pone en riesgo los cultivos de Nogal, ya que existen reportes de presencia del cancro del nogal en California y Texas (SENASICA, 2013). Por el riesgo de la infección de nogales en México, SENASICA colocó el cancro del nogal ocasionado por *B. rubrifaciens* en la lista de “Plagas bajo vigilancia activa” en el 2010 y 2011 (López, 2013).

### BIOLOGÍA DEL PATÓGENO

**National level.** In Mexico there are no reports of infections of pecans with *B. rubrifaciens* or *B. nigrifluens*. However, there are areas with hosts and weather conditions similar to other areas of the world in which the disease has presented itself. According to statistics presented by SIAP (2013) *B. rubrifaciens* represents a high risk for Mexico, since the pecan is one of the most profitable crops in the country. By the year 2011, the surface planted with this crop was higher than 96,000 ha (SIAP, 2013). For these reasons, SENASICA (2013) has established a risk map, indicating areas of possible incidence of *B. rubrifaciens*. The proximity with the United States also places the walnut plantations at risk, since there are reports of walnut canker in California and Texas (SENASICA, 2013). Due to the risk of infection of walnut trees in Mexico, SENASICA placed the walnut canker caused by *B. rubrifaciens* in the list of “Pests under active surveillance” in 2010 and 2011 (López, 2013).

### BIOLOGY OF THE PATHOGEN

*B. rubrifaciens* becomes active towards the end of the spring, and begins to emerge from the cankers along with the sap of the plant (SENASICA, 2013). The bacteria spreads through the bark and the phloem, affecting the transportation of nutrients (UC IPM, 2007, SENASICA, 2013). Investigations suggest that *B. rubrifaciens* can reside in the vascular tissue of trees and remain latent until a change in weather conditions (such as water stress) activate it (McClellan and Kluepfel, 2010).

### DIAGNOSIS TECHNIQUES

#### Traditional techniques

**Symptoms and signs.** *B. rubrifaciens* present late symptoms in trees older than 15 years, causing a chronic reduction of vigor and yield (McClellan

**Cuadro 1.** Reportes de *Brenneria* sp. como causante del cancro del nogal y técnicas de diagnóstico.  
**Table 1.** Reports of *Brenneria* sp. as the cause of the walnut canker and diagnosis techniques.

Región	Hospedero	Patógeno	Técnica de diagnóstico	Referencia
California	Nogal Inglés ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Erwinia nigrifluens</i>	Síntomas, pruebas bioquímicas	Wilson <i>et al.</i> , 1957
Persia	Nogal persa ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria rubrifaciens</i> ( <i>Erwinia rubrifaciens</i> )	Signos y síntomas	Schaad y Wilson, 1971
Irán	Nogal persa ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Caracterización bioquímica	Rahimian, 1989
España	Nogal persa ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Caracterización bioquímica	López <i>et al.</i> , 1994
Italia	Nogal persa ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Erwinia nigrifluens</i>	Caracterización bioquímica	Morone <i>et al.</i> , 1998
Europa	<i>Juglans hindsii</i>	<i>Brenneria rubrifaciens</i>	Caracterización bioquímica por API, ELISA y pruebas de patogenicidad	González <i>et al.</i> , 2002
Francia	Nogal ( <i>Juglans regia</i> persas)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Pruebas bioquímicas y pruebas de patogenicidad.	Ménard <i>et al.</i> , 2004
Iran	Nogales persas ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	PCR (gen 16s)	Roshangar y Harighi, 2009
No específica	Nogal ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria rubrifaciens</i> , <i>Brenneria nigrifluens</i> , otros.	Estudios de ADN, mutagénesis y ensayo de virulencia.	McClellan y Kluepfel, 2009
Francia, Nueva Zelandia, Italia	Nogales ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria</i> sp. and <i>Xanthomonas</i> sp.	Pruebas bioquímicas, pruebas de patogenicidad y F-AFLP	Hajri <i>et al.</i> , 2010
Iran	Nogales persas ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	rep-PCR, secuencias de inserción (IS50-PCR), RAPD	Charkhabi <i>et al.</i> , 2010
Italia	Nogal ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria rubrifaciens</i>	PCR de genes responsables de la producción de rubrifacina. Hibridación dot blot.	Thapa <i>et al.</i> , 2010
Iran	Nogales persas ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Pruebas bioquímicas, patrones electroforéticos y rep-PCR.	Jamalzade <i>et al.</i> , 2012.
Serbia	Nogal ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Pruebas bioquímicas y PCR (gen 16s).	Popović, <i>et al.</i> , 2013
Hungría	Nogal ( <i>Juglans regia</i> L.)	<i>Brenneria nigrifluens</i>	Pruebas bioquímicas, pruebas de patogenicidad, PCR (gen 16s), RT-PCR.	Végh <i>et al.</i> , 2014

*B. rubrifaciens* se activa al final de la primavera y comienza a brotar de los canchros junto con la savia de la planta (SENASICA, 2013). La bacteria se propaga por la corteza y por el floema, afectando el transporte de nutrientes (UC IPM, 2007; SENASICA, 2013). Investigaciones sugieren que *B. rubrifaciens* pueden residir en el tejido vascular de los árboles y permanecer latente hasta que un cambio en las condiciones ambientales (como el estrés

and Kluepfel, 2010). The symptoms of this disease involve holes in the wood, deep and long cracks in the trunk, a dark brown exudate filled with bacteriae that flow from the cracks in branches, and deep cankers. Internally, black lines and dark channels are displayed in the bark of the walnut tree. Long and deep ruptures can appear with a dark brown to black color, and it exudates sap (SENASICA,

hídrico) lo activen (McClean y Kluepfel, 2010).

## TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### Técnicas tradicionales

**Síntomas y signos.** *B. rubrifaciens* presenta síntomas tardíos en árboles mayores a 15 años de edad, ocasionando una crónica disminución de vigor y rendimiento (McClean y Kluepfel, 2010). Los síntomas de esta enfermedad involucran hoyos en la madera, grietas profundas longitudinales en el tronco, exudado color oscuro marrón cargado de bacterias que fluyen de las grietas de las ramas y cancro profundo. Internamente, se observa en el cancro profundo de la corteza del nogal, líneas negras y zanjas oscuras. Además se pueden presentar largas y profundas rupturas con un color café marrón a negro, y exuda savia (SENASICA, 2013; Growing and protecting New Zealand, 2008; SAGARPA, Guía de síntomas de cancro profundo de la corteza del nogal (*Brenneria rubrifaciens*); McClean y Kluepfel, 2010).

Dworkin *et al* (2006) *B. nigrifluens* causa el cancro profundo en nogales ingleses. Mientras que, en el manual de “Post-Entry Quarantine Testing” de Nueva Zelanda en el 2008 señala que *B. nigrifluens* es responsable del cancro superficial de la corteza del nogal y ocasiona necrosis en la corteza exterior y manchas dispersas de exudado marrón oscuro en la corteza del árbol.

Otras especies de *Brenneria* como *B. alni* provoca cancos en la corteza, ramas y troncos, así como exudados en grietas. *B. quercina* en robles presenta síntomas similares. *B. salicis* es el agente causal de la “enfermedad de marca de agua” en los sauces, la cual reside dentro de los vasos del xilema de los árboles infectados y provoca marchitez seca con coloración marrón de las hojas (Dworkin *et al.*,

2013; Growing and protecting New Zealand, 2008; SAGARPA, Guía de síntomas de cancro profundo de la corteza del nogal (*Brenneria rubrifaciens*); McClean and Kluepfel, 2010).

Dworkin *et al* (2006) *B. nigrifluens* causes deep cankers in English walnuts. Meanwhile, the “Post-Entry Quarantine Testing” 2008 manual from New Zealand, indicates that *B. nigrifluens* is responsible for surface canker of the bark of the walnut tree, and it causes necrosis in the outer bark, as well as disperse spots of brown exudate on the bark of the tree.

Other *Brenneria* species such as *B. alni* causes cankers on the bark, branches, and trunks, along with exudates in cracks. *B. quercina* displays similar symptoms in oak trees. *B. salicis* is the cause of the “watermark disease” in willows, which resides in the xylem vessels of the infected trees and causes dry wilting with a brown color in leaves (Dworkin *et al.*, 2006).

**Specific and differential media.** These help identify *Brenneria* according to the production of specific metabolites. The media King B (KB) is appropriate for the isolation of *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* from canker exudates. *B. rubrifaciens* in media KB and YPGA (agar, yeast extract, peptone, glucose, and soluble starch) produces a characteristic pink pigment. In a KB medium, after 48 hours of incubation at 26-28 °C, *B. rubrifaciens* cultures grown in a circular fashion, smooth, and with a light cream color (Biosca and López, 2012). The differentiation of *Pseudomonas* species from *Brenneria* species, is achieved by examining under ultraviolet light; in this way, *B. rubrifaciens* produces a pink pigment, diffusible in YDCA. The YPGA or YDCA media (yeast dextrose carbonate agar) are used to isolate *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens*, respectively (Loreti *et al.*, 2008; McClean *et al.*, 2008; Biosca *et al.*, 2008). *B. rubrifaciens* produces a red pigment in YDCA

2006).

**Medios específicos y diferenciales.** Permiten identificar a *Brenneria* según la producción de metabolitos específicos. El medio King B (KB) es apropiado para el aislamiento de *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* a partir de exudados de canchales. *B. rubrifaciens* en medios KB y YPGA (agar, extracto de levadura, peptona, glucosa y almidón soluble) produce un característico pigmento rosa. En medio KB, las colonias de *B. rubrifaciens* después de 48 h de incubación a 26-28 °C, crecen de forma circular, lisa, de color crema claro (Biosca y López, 2012). La diferenciación de especies de *Pseudomonas* de especies de *Brenneria*, se logra tras la examinación con luz ultravioleta; así *B. rubrifaciens* produce un pigmento rosa difusible en YDCA. El medio YPGA o el YDCA (agar dextrosa carbonato de calcio extracto de levadura) se utilizan para aislar *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens*, respectivamente (Loreti *et al.*, 2008; McClean *et al.*, 2008; Biosca *et al.*, 2008). *B. rubrifaciens* produce un pigmento rojo en YDCA llamado rubrifacina (SENASICA, 2013).

*Brenneria* sp. se caracteriza por su resistencia a algunos antibióticos. McClean *et al.*, (2006) evaluó 11 antibióticos que revelaron que *B. rubrifaciens* es resistente a la eritromicina y novobiocina a una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup> y 30 mgL<sup>-1</sup>, respectivamente. Por ello el uso de estos antibióticos en el medio de cultivo hace posible la elaboración de medios semiselectivos para *B. rubrifaciens*. Ambos antibióticos afectan la fisiología bacteriana comúnmente, la eritromicina inhibe la síntesis de proteínas y la novobiocina inhibe la enzima de enrollamiento del ADN. Dichos antibióticos pueden ser añadidos a medios de cultivo como YDCA, 10 % TSA, LBA o M9 medio mínimo para la elaboración del medio semiselectivo de *B. rubrifaciens*.

**Aislamiento.** Biosca *et al.* (2008), obtuvieron ais-

called rubrifaciens (SENASICA, 2013).

*Brenneria* sp. Displays a characteristic resistance to some antibiotics. McClean *et al.* (2006) evaluated 11 antibiotics that revealed that *B. rubrifaciens* is resistant to erythromycin and novobiocin at a concentration of 10 mgL<sup>-1</sup> and 30 mgL<sup>-1</sup>, respectively. Due to this, the use of these antibiotics in the culture medium helps create semi-selective media for *B. rubrifaciens*. Both antibiotics commonly affect bacterial physiology, the erythromycin inhibits protein synthesis, and novobiocin inhibits the DNA-coiling enzyme ADN. Such antibiotics can be added to culture media such as YDCA, 10% TSA, LBA, or minimum M9 medium for the elaboration of the semi-selective *B. Rubrifaciens* medium.

**Isolation.** Biosca *et al.* (2008), obtained *Brenneria* isolations from plant material (peridermis, cortical parenchyma, exudates, and fruits). These isolations were observed after 48 h of incubation at 26 °C in a King B medium, supplemented or not with cycloheximide (used to inhibit fungal growth). The isolation can be obtained from the external or internal canker or exudate tissue, the sample can be taken from the edge between infected and apparently healthy tissue (Biosca and López, 2012). The tissue must be disinfected with sodium hypochlorite and alcohol solutions and grinded in 5 mL of sterile PBS (8 g of NaCl; 0,2 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,15 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g of KCl, pH 7.2 by 1 liter of distilled water) or sterile salt solution (SS) (0,9 % of NaCl in distilled water, pH 7,0). Later, the culture medium chosen in planted (Biosca and López, 2012; Charkhabi *et al.*, 2011). The optimum temperature for the development of the bacteria in culture media is 30 to 33 °C. Within this range and with oxygen, the bacteria fluoresces and produces a cream- to white-colored colony (SENASICA, 2013).

lamientos de *Brenneria* de material vegetal (peridermis, parénquima cortical, exudados y frutos). Dichos aislamientos fueron observados tras 48 h de incubación a 26 °C en medio B de King suplementado o no con cicloheximida (utilizado para inhibir el crecimiento de hongos). El aislamiento puede ser obtenido a partir de tejido exterior o interior del cancro y de exudados, la muestra se puede tomar del borde entre parte de tejido enfermo y parte de tejido aparentemente sano (Biosca y López, 2012). El tejido debe ser desinfectado con soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol y triturado en 5 mL de PBS estéril (8 g de NaCl; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g de KCl, pH 7.2 por 1 litro de agua destilada) o solución salina estéril (SS) (0,9 % de NaCl en agua destilada, pH 7,0). Posteriormente se siembra el medio de cultivo seleccionado (Biosca y López, 2012; Charkhabi *et al.*, 2011). La temperatura óptima para el desarrollo de la bacteria en medios de cultivo es de 30 a 33 °C. En este rango y con oxígeno la bacteria fluoresce y produce colonia crema a blanco (SENASICA, 2013).

**Pruebas de patogenicidad.** Árboles inoculados artificialmente con *B. nigrifluens*, han puesto de manifiesto la dificultad de reproducir los chancros observados en condiciones naturales (Biosca *et al.*, 2008). En el nogal de castilla Ménard *et al.*, (2004) comprobaron la patogenicidad de tres cepas, al inocular con 10<sup>8</sup> UFC heridas de ramas de 7 años de edad. La cepa de referencia y agua fueron inoculadas de manera similar como testigos. Dos y cinco meses más tarde, se observaron lesiones necróticas en el interior de la corteza y líneas oscuras en la madera interna, pero no chancros externos sobre los árboles inoculados con las cepas locales y de referencia. Posteriormente, *B. nigrifluens* se reaisló de las líneas oscuras en la madera interna hasta aproximadamente 10 cm desde el punto de inoculación.

**Pathogenicity tests.** Trees artificially inoculated with *B. nigrifluens* have shown the difficulty of reproducing the cankers observed in natural conditions (Biosca *et al.*, 2008). In English walnut trees, Ménard *et al.*, (2004) showed the pathogenicity of three strains, inoculating wounds on 7-year old branches with 10<sup>8</sup> UFC. The reference strain and water were inoculated in a similar fashion as controls. Two and five months later, necrotic lesions were observed inside the bark, along with dark lines in the internal wood, but no external cankers on the trees inoculated with local and reference strains. Later, *B. nigrifluens* was reisolated from the dark lines in the internal wood up to approximately 10 cm from the point of inoculation.

### Biochemical techniques

**Phenotypical characterization.** Biosca, in the year 2008, carried out a phenotypical characterization using the system API 20 E, API 20 NE, API 50 CH, API ZYM, the Biolog system and the analysis of cellular fatty acids (Moretti *et al.*, 2007). Dworkin *et al.*, (2006) carried out the diagnose for conventional biochemical tests. *Brenneria* spp. are Gram-negative bacteria, oxidase negative, catalase-positive, fermentative bacilli, 1.3 to 3 µm long by 0.5 to 1 µm wide (Hauben, 1998). Biochemically, the species of *Brenneria* are similar to *Pantoea*, *Pectobacterium*, and *Erwinia*, since they produce no arginine dehydrolase and cannot decarboxylate amino acids such as ornithine and lysine. *Brenneria* produces acids from the fermentation of D-glucose, D-fructose, salicin, mannose, and sucrose and produces no amylases. The majority of species are sensitive to carbenicillin, cephalothin, chloramphenicol, nalidixic acid and tetracycline, and resistant to bacitracin, erythromycin, and gentamicin (Dworkin *et al.*, 2006). The differential



### Técnicas bioquímicas

**Caracterización fenotípica.** Biosca en el 2008, realizó la caracterización fenotípica por medio de sistema API 20 E, API 20 NE, API 50 CH, API ZYM, el sistema Biolog y el análisis de los ácidos grasos celulares (Moretti *et al.*, 2007). Dworkin *et al.*, (2006) llevaron a cabo el diagnóstico por pruebas bioquímicas convencionales. *Brenneria* spp. son bacterias Gram-negativas, oxidasa negativa, catalasa-positiva, bacilos fermentivos de 1.3 a 3 µm de largo por 0.5 a 1 µm de ancho (Hauben, 1998). Bioquímicamente, las especies de *Brenneria* son similares a *Pantoea*, *Pectobacterim* y *Erwinia* debido a que no producen arginina dehidrolasa y no pueden descarboxilar aminoácidos como la ornitina y lisina. *Brenneria* produce ácidos de la fermentación de D-glucosa, D-fructuosa, salicina, manosa y sucrosa y no produce amilasas. La mayoría de las especies son sensibles a carbenicilina, cefalotina, cloranfenicol, ácido nalidixico y tetraciclina, y resistente a bacitracina, eritromicina y gentamicina (Dworkin *et al.*, 2006). Las características diferenciales para clasificar especies del género se muestran en el Cuadro 2.

De las especies de *Brenneria*, *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* son las principales causantes del cancro del nogal de castilla por lo que Biosca y López en el 2012 utilizaron un sistema API para señalar las diferencias bioquímicas de ambas especies. Los

characteristics for the classification of species in the genus are shown in Table 2.

Out of the *Brenneria* species, *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* are the main causes of canker in the English walnut tree, therefore in 2012, Biosca and López used an API system to point out the biochemical differences between both species. The results of the API test to indicate the differences between *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* are shown in Table 3.

### Serological techniques

No specific monoclonal antibodies are yet available for *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens*. Some antibodies have been evaluated but have presented crossed reactions with other species of *Brenneria* (Biosca and López, 2012).

### Molecular techniques

Among the molecular diagnose methods is the Polymerase Chain Reaction (PCR) (Poza-Carrión *et al.*, 2008; Frutos D, 2010). McClean *et al.* (2008) developed real time PCR techniques based on the identification of *B. rubrifaciens* in inoculated soil and leaves, although they did not identify pure bacteria or infected samples. Prasad *et al.*, (2010) carried out the PCR technique to identify *B.*

**Cuadro 2.** Características diferenciales entre especies de *Brenneria* (Dowrin *et al.*, 2006; Hauben *et al.*, 1998; Lelliott y Dickey, 1984).

**Table 2.** Differential characteristics between *Brenneria* species (Dowrin *et al.*, 2006; Hauben *et al.*, 1998; Lelliott and Dickey, 1984).

Característica	<i>B. alni</i>	<i>B. nigrifluens</i>	<i>B. paradisiaca</i>	<i>B. quercina</i>	<i>B. rubrifaciens</i>	<i>B. salicis</i>
Indol	-	-	+	-	-	-
B-Galactosidasa	-	+	+	+	+	+
Degradación de pectato	-	-	+	-	+	+
Producción de ácidos a partir de:						
L-arabinosa	+	+	+	-	+	-
Rafinosa	-	+	+	-	-	+
Xilosa	+	+	+	-	-	-

**Cuadro 3.** Fisiología general y características bioquímicas de cepas de *B. nigrifluens* y *B. rubrifluens* (Biosca y López, 2012).**Table 3.** General physiology and biochemical characteristics of *B. nigrifluens* and *B. rubrifluens* strains (Biosca and López, 2012).

Prueba*	<i>B. nigrifluens</i> NCPPB 564 <sup>T</sup>	<i>B. rubrifaciens</i> NCPPB 2020 <sup>T</sup>
Tinción de Gram o KOH 3 %	-	-
Oxidasa	-	+
Catalasa	+	+
O/F	+/+	+/+
Reducción de nitrato dihidrolasa arginina	-	-
Ureasa	-	-
Indol	-	-
Hidrólisis de esculina	+	+
Degradación de pectato	-	-
β-galactosidasa	+	-
producción de ácido a partir de:		
L-arabinosa	+	+
Rafinosa	+	-
Xilosa	+	-
Crecimiento a 36 °C	+	-
Crecimiento a 39 °C	-	-

\* Resultados a partir de 48h de inoculación a 26-28 °C / \*Results after 48h of inoculation at 26-28 °C.

resultados de la prueba API para señalar las diferencias bioquímicas entre *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* se muestra en el Cuadro 3.

### Técnicas serológicas

No están disponibles aún anticuerpos monoclonales específicos para *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens*. Algunos anticuerpos han sido evaluados pero han presentado reacciones cruzados con otras especies de *Brenneria* (Biosca y López, 2012).

### Técnicas moleculares

Dentro de los métodos moleculares de diagnóstico se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Poza-Carrión *et al.*, 2008; Frutos D, 2010). McClean *et al.*, (2008) desarrollaron técni-

*rubrifaciens* using the gene responsible for the synthesis of rubrifaciens, the red pigment produced by *B. rubrifaciens*, present in this species only, as the author indicates. The pairs of indicators used by Prasad (2010) were (a) BrAF and BrAR, which correspond to the positions 33-54 and 548-569 of the gene *B. rubrifaciens* asparagine synthetase (Genbank accession no. FJ205695) abd (b) 2BrIF y 2BrIR (see Table 4) (McClean and Kluepfel, 2009) designed for the synthetase self-inducing gene involved in the production of rubrifaciens, with an expected size of amplicons from 536 to 671 pb. The detection limit, according to work by Prasad *et al.* (2010) was of  $\sim 5 \times 10^2$  and  $5 \times 10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> ( $\sim 5$  bacterial cells per reaction) of bacterial suspension, and  $\sim 5$ -50 pg total genomic DNA, respectively.

McClean *et al* (2006) described a pair of primers, BR-1 and BR-3, that amplify a region of

cas de PCR tiempo real, basado en la identificación en de *B. rubrifaciens* en suelo y hojas inoculadas, sin embargo, no identificaron bacterias puras o de muestras infectadas. Prasad *et al.* (2010) realizaron la técnica PCR para la identificación de *B. rubrifaciens* utilizando el gen responsable de la síntesis del pigmento rojo rubrifacina producido por *B. rubrifaciens*, presente solo en esta especie, según indica el autor. Los pares de iniciadores utilizados por Prasad (2010) fueron (a) BrAF y BrAR los cuales corresponden a las posiciones 33-54 y 548-569 del gen *B. rubrifaciens* asparagina sintetasa (Genbank accession no. FJ205695) y (b) 2BrIF y 2BrIR (ver, cuadro 4) (McClellan y Kluepfel, 2009) diseñado para el gen autoinductor de sintetasa involucrados en la producción de rubrifacina, con tamaño de amplicones esperados de 536 a 671 pb. El límite de detección según el trabajo de Prasad *et al.*, (2010) fue de  $\sim 5 \times 10^2$  y  $5 \times 10^4$  UFCmL<sup>-1</sup> ( $\sim 5$  células bacterianas por reacción) de suspensión bacteriana y  $\sim 5$ -50 pg ADN genómico total, respectivamente.

McClellan *et al.* (2006) describió un par de iniciadores, BR-1 y BR-3, que amplifican una región de 409 pb de la secuencia 16S rDNA, los cuales demostraron sensibilidad y especificidad para la detección de *B. rubrifaciens*. Al utilizar estos iniciadores en PCR-tiempo real es posible detectar ocho unidades formadoras de colonia (UFC), con límite de detección de 0.45 UFC. Además se puede identificar *Brenneria* spp mediante análisis de secuenciación parcial del 16S rDNA (Biosca *et al.*, 2006). Los primers diseñados para *B. nigrifluens* y *B. rubrifaciens* se resumen en el Cuadro 4 (Biosca y López, 2012).

### Métodos cromatográficos

*Brenneria* así como otros microorganismos, se pueden identificar por la producción de algunos metabolitos, utilizando técnicas cromatográficas,

409 pb of the sequence 16S rDNA, which displayed sensitivity and specificity for the detection of *B. rubrifaciens*. By using these primers in PCR-real time, it is possible to detect eight colony-forming units (UFC), with a limit of detection of 0.45 UFC. Also, it is possible to identify *Brenneria* spp using partial sequencing analysis of the 16S rDNA (Biosca *et al.*, 2006). The primers designed for *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* are summarized in Table 4 (Biosca and López, 2012).

### Chromatography methods

*Brenneria* and other microorganisms can be identified by the production of some metabolite, using chromatography techniques, in which comparing with standards can help identify signs of a particular compound. Such is the case of the study by McClellan *et al.* in 2012, which is based on the production of the red pigment rubrifaciens and homoserine lactone acyl (HLA) by strains of *Brenneria*. This author used HPLC for *B. rubrifaciens*, which was cultivated in a YDC medium at 28°C. Repeated extractions were performed from the broths using ethyl acetate, and were dried with nitrogen gas. The samples were resuspended in 200 µL of 50 % methanol and separated using a chromatography column C18 in a reverse phase HPLC (with a methanol gradient of 10 to 100 %, flow range of 1 mLmin<sup>-1</sup>, with a duration of 70min), with the purpose of quantifying total endogen AHLs; calibration curves were carried out earlier.

Thin-layer chromatography, in which the ethanol extracts (EtOAc) which contain AHLs of *Brenneria* strains are run with 60:40 methanol-water in a thin-layer chromatography chamber, comparing with standards. This technique was described in 2012 by McClellan, who describes the analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LCMS) of

**Cuadro 4.** Primers para *Brenneria nigrifluens* y *Brenneria rubrifaciens*.  
**Table 4.** Primers for *Brenneria nigrifluens* and *Brenneria rubrifaciens*.

Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
F1 C3	CCTGCGCCATGTTGCCAGATCGCTAT ACCTGAGTAGCAGTTTCGACTATTT	Loreti <i>et al.</i> , 2008 ( <i>B. nigrifluens</i> )
BR1 BR3 GSP1F GSP1R GSP2F GSP2R	CAGCGGGAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGG TGAAAAAGTCTCTCTTAAACCTTTCC TAGTGTTCATTAGCCGATTTAG GCATTTAAAGACTATGTTTCCTG CATTACTGTTTCTCCTCGCTAATG GATGTAAATTAGCCATACACGGAATG	McClellan <i>et al.</i> , 2008 ( <i>B. rubrifaciens</i> )
BrAF BrAR 2 BrIF 2 BrIR	ATGTACGCGAGTCTCTATTTGG CCATCAGCCTGAAATAACTCA CGGGATCCATGTTAGAAATATTTCGATGTC ATCAGCTGTCAAGCCTCTTCCTTTTGG	McClellan y Kuepfel, 2009; Thapa <i>et al.</i> , 2010 ( <i>B. rubrifaciens</i> )

en las que comparando con estándares se identifican señales de algún compuesto en particular. Tal es el caso del estudio de McClellan *et al.* en 2012, el cual se basa en la producción del pigmento rojo rubrifacina y acil-homoserina lactona (AHL) por cepas de *Brenneria*. Dicho autor utilizó HPLC para *B. rubrifaciens*, el cual fue cultivado en medio YDC a 28 °C. De los caldos de cultivo se realizaron extracciones repetidas con acetato de etilo y fueron secados con gas nitrógeno. Las muestras fueron resuspendidas en 200 µL de 50 % metanol y separadas utilizando columna cromatográfica C18 en HPLC fase reversa (con gradiente de metanol de 10 a 100 %, rango de flujo de 1 mLmin<sup>-1</sup>, con duración de 70min), esto con el propósito de cuantificar AHLs endógena total. Realizando previamente curvas de calibración.

Cromatografía en capa delgada, en la cual los extractos etanólicos (EtOAc) que contienen AHLs de cepas de *Brenneria* son corridos con 60:40 metanol-agua en una cámara de cromatografía de capa delgada, comparando con estándares. Dicha técnica fue descrita por McClellan en 2012. El mismo autor, describe el análisis por cromatografía líquida-espectroscopia de masas (LCMS) de los extractos

the EtOAc extracts of *B. rubrifaciens* and *B. nigrifluens* in which these are diluted 1:5 before the KCMS analysis. The spectres are acquired with a mass spectrophotometry with an HPLC system and a source of ionization atomizer, operating in positive ion mode. In this study, the mobile phase contained 0.1 % formic acid in water (solvent A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (solvent B). Finally, the samples were separated with a C18 chromatography column using a linear gradient of 5 to 90 % solvent B/solvent A, with 60 min of flow at a flow range of 200 mLmin<sup>-1</sup>.

## CONTROL

The *Brenneria rubrifaciens* control for the English walnut tree outside of Mexico, since the disease has not been found in the country, and in consequence, no treatment or diagnose method has been evaluated. The cultural control may be used, which involves maintaining the vigor of the tree through cultural practices; particularly water use del agua, using a tensometer to monitor soil moisture. Mechanical control by the removal of infected tissue (branches, trunks) is not very

EtOAc de *B. rubrifaciens* y *B. nigrifluens* en la que estos son diluidos 1:5 previo al análisis LCMS. Los espectros son adquiridos con espectrómetro de masas con un sistema HPLC y una fuente de un atomizador de ionización, operando en el modo de ión positivo. En dicho estudio, la fase móvil contenía 0.1 % de ácido fórmico en agua (solvente A) y 0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B). Finalmente, las muestras se separaron con una columna cromatográfica C18 utilizando un gradiente lineal de 5 a 90 % solvente B/solvente A, con 60 min de flujo a un rango de flujo de 200 mLmin<sup>-1</sup>.

### CONTROL

El control de *Brenneria rubrifaciens* para el nogal de castilla fuera de México, ya que la enfermedad no se ha detectado en el país y consecuentemente no se ha evaluado tratamiento, ni método de diagnóstico alguno. Puede utilizarse el control cultural, que involucra mantener el vigor del árbol a través de prácticas culturales; en especial el manejo del agua, empleando tensiómetros para monitorear la humedad del suelo. El control mecánico por remoción de tejido infectado (ramas, troncos) no es muy recomendado porque deja vulnerable al árbol y no elimina con efectividad al patógeno (SENASICA, 2013).

### CONCLUSIÓN

Debido a la importancia de las enfermedades ocasionadas por *Brenneria* spp. en plantas leñosas, el diagnóstico oportuno es fundamental. Razón por la que se han desarrollado diferentes métodos que buscan que el diagnóstico se lleve a cabo de una manera más eficiente, incluso en aquellos árboles que no se presentan síntomas. Entre las técnicas más estudiadas para el diagnóstico de *Brenneria*

recomendable, since it leaves the tree vulnerable and does not eliminate the pathogen effectively (SENASICA, 2013).

### CONCLUSION

Due to the importance of the diseases caused by *Brenneria* spp. in woody plants, a timely diagnose is crucial, which is why different methods have been developed that attempt to carry out a more efficient diagnose, even in trees that present no symptoms. Among the most widely used techniques for diagnosing *Brenneria* spp. are biochemical tests, the use of selective methods, molecular techniques, serological techniques, and pathogenicity tests. However, the method of choice will depend on the resources available, the speed with which one desires to obtain results, as well as the standardized normativity and methodology of each country. Most importantly, one should value the cost-benefit that a timely diagnosis can bring at the end of the production.

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

spp. se encuentran las pruebas bioquímicas, utilización de medios selectivos, técnicas moleculares, técnicas serológicas y de patogenicidad. Sin embargo, la elección del método dependerá de los recursos con los que se cuentan, la rapidez con la que se desean obtener los resultados, así también como de la normatividad y metodologías estandarizadas de cada país. Lo importante es valorar el costo beneficio que el diagnóstico oportuno puede traer al final de la producción.

## LITERATURA CITADA

- Abeyssekara N. 2014. Index for Volume 98 of Plant Disease. Plant Disease, 1751.
- Achille G and Massino G. 2014. Necrosi corticali da *Brenneria nigrifluens* e Altri batteri su noce in impianti piemontesi: studio dell'evoluzione della malattia in campo e caratterizzazione di isolati con rep-pcr. The Italian Society of Silviculture and Forest Ecology. DOI: 10.3832/EFOR1335-01
- Bettiol W, Rivera MC, Mondino P, Montealegre JR y Colmenárez YC (eds.). 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe ISBN: 978-9974-0-1091-8.
- Biosca EG, Pérez-Laorga E, Águila Clarés B, Catalá-Senent R, Delgado Santander JF, González Abolafio R A y López González MM. 2008. Distribución de *Brenneria* spp. en la comunidad valenciana y especies forestales a las que afecta. Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales. 26: 113-118.
- Biosca, EG. and López MM. 2012. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to Stone fruits and nuts. Journal of Plant Pathology, 94 (1, Supplement), S1.105-S1.113 Edizioni ETS Pisa, 2012 S1.105. DOI: 10.4454/jpp.v94i1sup.017
- Biosca EG, Martín S, Águila B, Arahali DR, López-Ocaña L and López MM. 2006. *Brenneria* sp. causing bark cankers in Spanish poplars. In: J. Elphinstone, S. Weller, R. Thwaites, N. Parkinson, D. Stead & G. Saddler (eds.), Proceedings of the 11th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria: 140. SASA, Edimburgo, U.K.
- Charkhabi NF, Shams-Bakhsh M and Arahimian H. 2010. Genetic diversity among *Brenneria nigrifluens* strains in Iran. European journal of plant pathology, 128(3), 303-310. DOI 10.1007/s10658-010-9667-0.
- Charkhabi NF, Shams-Bakhsh M, Rahimian H, and Khodayegan P. 2011. Identification of *Brenneria nigrifluens* ISO-LATES. Iranian Journal of Plant Pathology, 47(3).
- Dworkin M, Falkow S and Rosenberg E. 2006. The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Editorial Springer.
- Frutos D. 2010. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. Journal of Plant Pathology 92: S1.79-S1.85. [online] URL: <http://www.jstor.org/stable/41998759>
- González, R., López-López, M. J., Biosca, E. G., López, F., Santiago, R., & López, M. M. (2002). First report of bacterial deep bark canker of walnut caused by *Brenneria* (*Erwinia*) *rubrifaciens* in Europe. *Plant Disease*, 86(6), 696-696.
- Growing and Protecting New Zealand. Post-Entry Quarantine Testing Manual. 2008. Juglans (Walnut). Biosecurity New Zealand. Plant Health & Environment Lab, IDC-Tamaki, 231 Morrin Road, St Johns, PO Box 2095, Auckland, New Zealand. 27 p.
- Hajri A, Meyer D, Delort F, Guillaumes J, Brin C and Manseau C. 2010. Identification of a genetic lineage within *Xanthomonas arboricola* pv. juglandis as the causal agent of vertical oozing canker of Persian (English) walnut in France. *Plant pathology*, 59(6), 1014-1022. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02362.x
- Hauben LE, Moore L, Vauterin M, Steenackers J, Mergaert L, Verdonck A and Swings J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*. 21: 384-397.
- Jamalzade A, Shamsbakhsh M and Rahimian H. 2012. Genetic Diversity of *Brenneria nigrifluens* Strains in North of Iran (Margin of Caspian Sea). *Cercetari Agronomice in Moldova*. Volume 45, Issue 2, Pages 57-68, ISSN (Online) 2067-1865, ISSN (Print) 0379-5837, DOI: 10.2478/v10298-012-0015-8.
- Lelliott RA and Dickey RS. 1984. Genus VII: *Erwinia*. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. 1:469-476.
- López B. 2013. Plagas Reglamentadas bajo el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF) 2013.
- López MM, Marti R, Morente C, Oreliana N, Ninot T and Aleñá N, 1994. Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetal Fuera de Serie* 2, 307-314.
- López MM y Peñalver R. 2005. Control biológico de bacterias fitopatógenas. *El control biológico de plagas y enfermedades*, 5, 131.
- Loreti S, Galleli A, Piccirillo P and Belisario A. 2005. Bacterial bark canker on English walnut. *Acta Horticulturae*, 705,433-435.
- Loreti, S, De Simone D and Galleli A. 2008. Detection and identification of *Brenneria nigrifluens*, the causal agent of the shallow bark canker of walnut by, PCR amplification. *Journal of phytopathology*, 156(7-8), 464-469. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2007.01393.x
- Luna-Méndez N, Jaramillo-Villanueva JL, Ramírez-Juárez, Escobedo-Garrido S, Bustamante-González A, Campos-Ríos G. 2013. Tipología de unidades de producción de nuez de castilla en sistema de producción tradicional. *Agricultura Sociedad y Desarrollo* Vol.10 No.3 283-303 pp.
- McClean AE and Kluepfel DA. 2009. Genetic loci involved in rubrifacine production in the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*. *Phytopathology*. 99: 145-151. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0145>
- McClean AE and Kluepfel DA. 2010. Biology of *Brenneria rubrifaciens*: screening for genes involved in pathogenesis. En línea <http://ceking.ucdavis.edu/files/47896.pdf>.
- McClean AE, Sudarshana P and Kluepfel DA. 2008. Enhanced detection and isolation of the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*: causal agent of deep bark canker. *European Journal of Plant Pathology*. 122: 413-424.
- McClean AE, Duerkop BA, Greenberg EP and Kluepfel DA. 2012. AHL Signals Induce Rubrifacine Production in a *brl1* Mutant of *Brenneria rubrifaciens*. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0111>. Vol. 102, No. 2, 2012 195.
- McClean AE, Sudarshana P and Kluepfel DA. 2006. Real-Time PCR Detection and Development of a Bioassay for the Deep Bark Canker Pathogen, *Brenneria rubrifaciens*. Pag. 247. En línea como PDF <http://ceking.ucanr.edu/files/19155.pdf>.
- Ménard M, Delort, F, Baudry A and Le Saux, M. 2004. First

- report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. *Plant Disease*, 88(2), 220-220.
- Moretti C, Silvestri FM, Rossini E, Natalini G and Buonaurio R. 2007. A Protocol for Rapid Identification of *Brenneria nigrifluens* among Bacteria Isolated from Bark Cankers in Persian Walnut Plants. *Journal of Plant Pathology* (2007), 89(2), 211-218 Edizioni ETS Pisa.
- Moretti C and Buonaurio R. 2010. Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Sezione di Arboricoltura e Protezione delle Piante, Via Borgo XX Giugno 74, 06121 Perugia, Italy Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity SHORT NOTES. *Phytopathologia Mediterranea Journal* (2010) 49, 80–83. [http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-3112](http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3112)
- Morone C, Janse JD and Scortichini M. 1998. Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) tree incited by *Erwinia nigri-fluens* in Italy. *Journal of Phytopathology* 146: 637-639.
- Narayanasamy P. 2011. Diagnosis of bacterial diseases of plants. In *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*: (pp. 233-246). Springer Netherlands.
- Nelson AH, and Hudler GW. 2007. A summary of North American hardwood tree diseases with bleeding canker symptoms. *Arboriculture and urban forestry*, 33(2), 122.
- Pardatscher R, and Schweigkofler W. 2009. Microbial biodiversity associated with walnut *Juglans regia* L. in south Tyrol (Italy). *Mitt Klosterneuburg*, 59, 17-23.
- Popović T, Ivanović Ž, Živković S, Trkulja N and Ignjatov M. 2013. First Report of *Brenneria nigrifluens* as the Causal Agent of Shallow-Bark Canker on Walnut Trees (*Juglans regia*) in Serbia. *Forest*, 97(11), 1504. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0267-PDN>
- Poza-Carrión C, Aguilar I, Gallego FJ, Nuñez-Moreno Y, Biosca EG, González R, López MM and Rodríguez-Palenzuela P. 2008. *Brenneria quercina* and *Serratia* spp. isolated from Spanish oak trees: molecular characterization and development of PCR primers. *Plant pathology*, 57(2), 308-319. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2007.01778.x
- Prasad S, Keun C, Kyu S, Mo J, Hyun J and Hwan D. 2010. Direct detection of *Brenneria rubrifaciens* by (polymerase chain reaction) PCR-based assay using rubrifacine synthetic gene. Full length Research Paper. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(16), pp. 1754-1757, 18 August, 2010. ISSN 1996-0808 ©2010 Academic Journals.
- Rahimian H. 1989. Bacterial canker of walnut trees in Sari. Proceeding of 9<sup>th</sup> Plant protection congress Iran (p.150). Mashhad. University of Fredowsi.
- Roshangar R and Harighi B. 2009. Investigation of the phenotypic and genetic properties of *Brenneria nigrifluens* strains, the causal agent of walnut bark canker in Kurdistan province, Iran. *Forest Pathology*, 39: 335–342. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2009.00594.x
- Saccardi A, Bonetti V, Melegatti A and Cristanini M. 1998. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) tree in the Veneto region (Northern Italy). *Journal of Phytopathology* 80: 63-65.
- SAGARPA. Guía de síntomas de Cancro profundo de la corteza del nogal (*Brenneria rubrifaciens*). [http://C:/Users/Ceci%20Faona/Downloads/Guia%20de%20sintomas\\_BR.pdf](http://C:/Users/Ceci%20Faona/Downloads/Guia%20de%20sintomas_BR.pdf). Consultado en marzo del 2014.
- Schaad NW and Wilson EE. 1971. The ecology of *Erwinia rubrifaciens* and the development of phloem canker of Persian walnut. *Annals of Applied Biology*, 69(2), 125-136.
- Scortichini M. 2008. Bacterial diseases of nuts and stone fruits. [http://www.cost873.ch/\\_uploads/\\_files/m\\_Scortichini\\_CSL\\_1.pdf](http://www.cost873.ch/_uploads/_files/m_Scortichini_CSL_1.pdf).
- SENASICA. 2013. Cancro profundo de la corteza del nogal (*Brenneria rubrifaciens*). Dirección General de Sanidad Vegetal. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. D.F. Ficha técnica No. 9. 15p.
- SIAP. 2013. Anuario estadístico de la producción Agrícola 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?id-Liga=1148&tipo=1>.
- SIAP. 2014. Anuario estadístico de la producción Agrícola 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. [http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/consultada 24 de Marzo de 2016](http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/consultada%2024%20de%20Marzo%20de%202016).
- Thapa SP, Lim CK, Kim SK, Cho JM, Hur JH and Park D.H. 2010. Direct detection of *Brenneria rubrifaciens* by PCR-based assay using rubrifacine synthetic gene. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1754-1757.
- UC. IPM. 2012. Walnut Deep Bark Canker. Consultado en línea el 13 de marzo del 2016 en: <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r881100511.htm-1#SYMPTOMS>
- Végh A, Tóth A, Zámbo Á, Borsos G and Palkovics L. 2014. First Report of Bacterial Bark Canker of Walnut Caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. *Plant Disease*, 98(7), 988-988. DOI: 10.1094/PDIS-09-13-0949-PDN
- Wilson EE, Starr MP and Berger JA. 1957. Bark canker, a bacterial disease of the Persian walnut tree. *Phytopathology* 47, 669–673.
- Yousefi KF, Taghavi M and Banihashemi Z. 2007. Occurrence of shallow bark canker of walnut (*Juglans regia*) in southern provinces of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(9), 1507–1512.