

ISSN-2007-8080

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

VOLUMEN 36, NÚMERO 1, Enero 2018



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

Editor en Jefe * Editor in Chief

Dr. Gustavo Mora Aguilera, Colegio de Postgraduados.

Editor Técnico * Technical Editor

Tec. Noemi De La Rosa Sánchez, RMF.

Composición Web * Web Composition

M.C. Eduardo Guzmán Hernández, LANREF, Colegio de Postgraduados.

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH.

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH.

Dr. Ángel Rebollar Alviter, UACH.

Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD.

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dr. Rodrigo Valverde, LSU, USA.

Dr. Sami Jorge Micheref, Universidad Federal Rural de Pernambuco, Br.

Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.

Dr. Vicente Febres, University of Florida, USA.

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Nadia Landero Valenzuela, UPFIM.

Dr. Luis Pérez Moreno, UGTO.

Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS.

Dra. Yuridia Mercado Flores, UPP.

Dr. Gabriel Rincón Enríquez, CIATEJ.

Dr. Misael Martínez Bolaños, INIFAP.

Dr. Víctor Manuel Guerrero Prieto, UACH.

MC. Hilda Elizabet Flores Moctezuma, IPN.

Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez, COLPOS.

Dr. Claudio Rios Velasco, CIAD.

Dr. Hipolito Cortez Madrigal, IPN.

Dr. Remigio Anastacio Guzmán Plazola, COLPOS.

Portada: Malezas asociadas al cultivo de papayo con síntomas de virales de PRSV.

Original: Juan Florencio Gómez Leyva/Pág. 1-15.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, Mexico** * Presencia de *Papaya ringspot virus* (PRSV) en arvenses asociadas a *Carica papaya* en Colima, México. 1
Bermúdez-Guzmán MJ, Guzmán-González S, Lara-Reyna J, Palmeros-Suárez PA, López-Muraira IG, Gómez-Leyva JF.

- Detection of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in *Saccharum* spp. in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco** * Detección del *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) en *Saccharum* spp. en México y origen filogenético de un aislado de Jalisco. 16
Bermúdez-Guzmán MJ, Delgado-Virgen FJ, Cervantes-Preciado JF, García-Preciado JC, Farías-Cervantes VS.

- Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines** * Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. 35
Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aranda-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Goodwin PH, Leyva-Mir SG.

ARTÍCULOS DE REVISIÓN * REVIEW ARTICLES

- Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents** * Preservadores maderables y exudados microbianos con actividad antagonista contra agentes biológicos deletéreos. 56
García-Ortiz VR, Benítez-Rocha G, Martínez-Pacheco M, Velázquez-Becerra C.

- Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems** * Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos. 79
Yáñez-Juárez MG, López-Orona CA, Ayala-Tafoya F, Partida-Ruvalcaba L, Velázquez-Alcaraz TJ, Medina-López R.

- The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity** * El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. 95
Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos-Villalobos S.

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATHOLOGICAL NOTES

- Variability and symptoms caused by *Iris yellow spot virus* in *Nicotiana benthamiana*** 131
* Variabilidad y síntomas causados por *Iris yellow spot virus* en *Nicotiana benthamiana*.
Ornelas-Ocampo K, Ochoa-Martínez DL, Aranda-Ocampo S, Ramírez-Rojas S, García-Ruíz H.
- Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals** * Efecto de aceites naturales contra *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones *in vitro* y detección de fitoquímicos activos. 141
Gutiérrez-Jiménez E, Pedroza-Sandoval A, Martínez-Bolaños L, Samaniego-Gaxiola JA, García-González F.
- Differential gene expression of avocado defense genes in response to avocado sun-blotch viroid infection** * Expresión diferencial de genes de defensa en aguacate en respuesta a la infección del viroide de la mancha de sol del aguacate. 151
López-Rivera LA, Ramírez-Ramírez I, González-Hernández VA, Cruz-Huerta N, Téliz-Ortiz D.
- In vitro* antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima*** * Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima*. 162
Muy-Rangel MD, Osuna-Valle JR, García-Estrada RS, San Martín-Hernández C, Quintana-Obregón EA.
- Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*)** * Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*). 172
Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villarnovo GLL, Hernández-Leal TI.
- Morphological and molecular identification of *Mortierella* species associated to rhizosphere of apple trees with symptoms of root diseases** * Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares. 184
Mares-Ponce de León Y, Muñoz-Castellanos LN, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Berlanga-Reyes DI, Rios-Velasco C.

Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, Mexico

Presencia de *Papaya ringspot virus* (PRSV) en arvenses asociadas a *Carica papaya* en Colima, México

Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán, INIFAP Campo experimental Tecomán. Km 35 Autopista Colima-Manzanillo. C.P. 28100, Tecomán, Colima; **Salvador Guzmán-González**, Universidad de Colima, Km 40 Autopista Colima-Manzanillo, C.P. 28100, Tecomán, Colima; **Joel Lara-Reyna**, Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Km. Carretera Haltunchen-Edzna Km. 17.5, C.P. 24450, Sihochac, Champotón, Campeche; **Paola A. Palmeros-Suárez**, CUCBA. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, C.P. 45200, Zapopan, Jalisco; **Irma G. López-Muraira, Juan Florencio Gómez-Leyva***, TecNM-Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 Carretera a San Miguel de Cuyutlán, C.P. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. *Autor para correspondencia: jfgleyva@hotmail.com.

Recibido: 21 de Junio, 2017.

Aceptado: 31 de Agosto, 2017.

Bermúdez-Guzmán MJ, Guzmán-González S, Lara-Reyna J, Palmeros-Suárez PA, López-Muraira IG, Gómez-Leyva JF. 2017. Presence of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in weed associated with *Carica papaya* in Colima, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1):1-15.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-2

Primera publicación DOI: 17 de Octubre, 2017.

First DOI publication: October 17, 2017.

Resumen. *Papaya ringspot virus* (PRSV) es un *Potyvirus* de importancia económica para el cultivo de papayo (*Carica papaya* L.) produciendo síntomas de mosaico, clorosis y deformación en las hojas, así como manchas características en forma de anillo en el fruto. En México no existen reportes de especies de arvenses asociadas a este cultivo que actúen como reservorio del *Potyvirus*. En el presente trabajo, se identificó la presencia de PRSV

Abstract. *Papaya ringspot virus* (PRSV) is a *Potyvirus* of economic importance for papaya crops (*Carica papaya* L.) whose main symptoms are mosaic, chlorosis and deformation in leaves, as well as ring-like characteristic spots on the fruit. In Mexico, there is no report on weed species associated with this crop that act as reservoir of *Potyvirus*. In the present study, the presence of PRSV in weeds of commercial papaya plantations was identified in the state of Colima, Mexico. In a sample of 139 papaya plants and 70 weed samples with symptoms of viral infections, PRSV was detected in 40 and 50% for *Carica papaya* and *Cucurbita pepo*, respectively, using DAS-ELISA (Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assays). Nucleotide sequence analyses of the 350 base pairs fragments of the PRbV N1b region generated by RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) allowed the identification of *Potyvirus* in 40-90% of the total samples of *Abutilon*

en arvenses de plantaciones comerciales de papayo del estado de Colima, México. En un muestreo de 139 plantas de papayo y 70 arvenses con sintomatología de virosis, se detectó a PRSV en un 40 y 50% para *Carica papaya* y *Cucurbita pepo* respectivamente mediante DAS-ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas con doble anticuerpo en sándwich), mientras que el análisis de la secuencia de 350 pares de bases de la región NIB de PRSV generados por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa) permitió identificar al *Potyvirus* en un 40 a 90% del total de muestras de *Abutilon abutilastrum* y *Anoda cristata* (Malvaceae), así como *Solanum rostratum* (Solanaceae), lo que representa un nuevo reporte de arvenses reservorio de PRSV asociadas a plantaciones de papayo en México.

Palabras clave: maleza, hospederos alternos, DAS-ELISA, RT-PCR, *Potyvirus*.

El papayo (*Carica papaya* L.) es una planta herbácea tropical nativa de México y Centroamérica, cuyo fruto es comercialmente importante. México es el quinto exportador de papaya a nivel mundial, con una producción de 951,921 toneladas. Colima es el segundo estado con mayor producción de papaya en el país con 146,244 toneladas, tiene una superficie de aproximadamente 1,800 ha sembradas, y ocupa el primer lugar con el 60% de las exportaciones. El cultivo genera alrededor de 1,500 empleos directos y una derrama económica de entre 300 y 400 millones de pesos al año (SIAP, 2016).

Las plagas y enfermedades son factores importantes que afectan la calidad del fruto de papaya para el consumo humano. Los virus que infectan plantas de papayo han causado enfermedades de importancia económica a nivel mundial, representando serios problemas en la reducción de la producción de fruta, e incluso, en la destrucción total de

abutilastrum and *Anoda cristata* (Malvaceae), as well as *Solanum rostratum* (Solanaceae), which represents a new report on PRSV reservoir weeds associated with papaya crops in Mexico.

Key words: weed, alternate hosts, DAS-ELISA, RT-PCR, *Potyvirus*.

Papaya (*Carica papaya* L.) is a tropical herbaceous plant native to Mexico and Central America whose fruit is commercially important. Ranked fifth among exporters worldwide, Mexico produces 951,921 tons of papaya. Colima holds the second place in papaya domestic production with 146,244 ton on an area of nearly 1,800 ha, and the first place with 60% of papaya exports. Papaya cultivation creates around 1,500 direct employments and economic benefits ranging from 300 to 400 million pesos a year (SIAP, 2016).

Plague and diseases are important factors that reduce the quality of papaya fruit for human consumption. Viruses affecting papaya crops cause diseases of economic importance worldwide that pose a serious threaten because they reduce fruit production or even cause the total loss of infested plantations (Navanath *et al.*, 2017). Over 10 viruses affecting papaya have been reported worldwide from which the most important are *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya melaira virus* (PMeV) and *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Abreu *et al.*, 2015). The latter belongs to the family *Potyviridae*, genus *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005), it is transmitted by vector aphids in a non-persistent manner, develops symptoms in the form of mosaics, chlorosis, leaf distortion and ring-like spots, and is responsible for crop losses ranging from 50 to 90%, and from 30 to 40% at postharvest (Hernández-Castro *et al.*, 2004; Hernández-Castro *et al.*, 2015).

huertos infestados (Navanath *et al.*, 2017). Se han reportado más de 10 virus que afectan este cultivo en todo el mundo, entre estos los más importantes son *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLD-MV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya mosaic virus* (PapMV), *Papaya melaira virus* (PMeV) y *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Abreu *et al.*, 2015). Este último virus pertenece a la familia *Potyviridae* y al género *Potyvirus* (Fauquet *et al.*, 2005), el cual se transmite por áfidos vectores de manera no persistente y genera síntomas de mosaicos, clorosis, distorsión en las hojas y manchas características en forma de anillo en el fruto, ocasionando pérdidas del 50 al 90% del cultivo y 30 al 40% en postcosecha (Hernández-Castro *et al.*, 2004; Hernández-Castro *et al.*, 2015).

Se ha observado, que la supervivencia del PRSV depende en gran medida de su capacidad para dispersarse a nuevos hospederos, donde las arvenses que se encuentran en los cultivos del papayo pueden fungir como reservorios del mismo. Los aislados de este virus pertenecen principalmente a dos cepas diferentes, denominadas como PRSV-P (papaya) y PRSV-W (watermelon), donde el rango de hospederos de la cepa P se limita a plantas de las familias *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae*, mientras que los aislados de la cepa W infectan principalmente a plantas de las familias *Cucurbitaceae* y *Chenopodiaceae* (Chin *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2008).

A nivel internacional, se han desarrollado trabajos encaminados en identificar maleza del cultivo de papayo portadoras de PRSV. En Brasil se efectuó un estudio para evaluar la infección natural de especies de cucurbitáceas localizadas dentro y

It has been observed that PRSV's survival greatly depends on its capacity to spread from host to host and that weeds in papaya crops can serve as PRSV reservoirs. Isolates of this virus belong mainly to two different strains known as PRSV-P (papaya) and PRSV-W (watermelon), where the hosts range of the P strain is limited to plants of the *Caricaceae*, *Cucurbitaceae* and *Chenopodiaceae* families, whereas the isolates of the W strain mainly infect plants of the *Cucurbitaceae* and *Chenopodiaceae* families (Chin *et al.*, 2007; Tripathi *et al.*, 2008).

Research has been conducted at international level to identify papaya weeds carrying PRSV. In Brazil, a study was conducted to evaluate natural infection of cucurbitaceous species inside and outside of papaya crops infected with PRSV-P using ELISA and RT-PCR tests (Mansilla *et al.*, 2013). In Florida, the presence of PRSV-W was reported in plant species of the family *Cucurbitaceae* that damage cucumber, squash, melon and watermelon crops; PRSV-W was also reported as a host of *Momordica balsamina*, *Melothria pendula* and *Coccinia grandis* (Goyal *et al.*, 2012; Tantiwanich *et al.*, 2014). In Jamaica, using DAS-ELISA, it was found that *M. charantia* is a host for PRSV-P (Chin *et al.*, 2007). In addition to reports from other countries, in Mexico there is not a description of PRSV host weeds associated with papaya crops considering that there is about 30% to 100% of incidence of such virus (Hernández-Castro *et al.*, 2015). This research was aimed at determining the presence of PRSV in some virus-host plant weed species associated with papaya commercial crops in Colima, Mexico, using serological and molecular techniques.

fuera de cultivos de papayo infectados con PRSV-P utilizando ELISA y RT-PCR (Mansilla *et al.*, 2013). En Florida, se reportó la presencia de PRSV-W en especies vegetales de la familia Cucurbitaceae, afectando los cultivos de pepino, calabaza, melón y sandía; también se detectó como hospedante de maleza, entre las cuales están *Momordica balsamina*, *Melothria pendula* y *Coccinia grandis* (Goyal *et al.*, 2012; Tantiwanich *et al.*, 2014). En el país de Jamaica se determinó mediante DAS-ELISA que *M. charantia* es una maleza hospedante del PRSV-P (Chin *et al.*, 2007). A pesar de la información reportada en otros países, en México no se tiene una descripción sobre maleza hospedantes del PRSV asociada a cultivos de papayo, considerando que existe cerca de un 30% hasta 100% de incidencia de este virus (Hernández-Castro *et al.*, 2015). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de PRSV, mediante técnicas serológicas y moleculares, en algunas especies vegetales de maleza hospedantes del virus asociadas a plantaciones comerciales de papayo en Colima, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El muestreo de plantas de papayo y maleza se realizaron en el estado de Colima, México, en el periodo de marzo a septiembre del 2014 en tres plantaciones ubicadas en las localidades de La Cumbre y Los Asmoles del municipio de Colima y Camino a Chanchopa del municipio de Tecomán. Se muestrearon hojas de varias especies de maleza con síntomas virales en general (mal formación de hoja, clorosis, mosaico y hoja corrugada principalmente).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

A sampling of papaya plants and weeds was conducted in the state of Colima, Mexico, from March to September 2014, in three plantations at La Cumbre and Los Asmoles, localities from the municipality of Colima, and Camino to Chanchopa from the municipality of Tecomán. Leaves of various weed species showing overall viral symptoms (leaf malformation, chlorosis, mosaic and corrugated leaves) were sampled. Leaves of different papaya plants with PRSV characteristic symptoms were also collected at the same plantations. To identify the gender and species of the collected weeds, dichotomous keys were used according to Fryxell, (1988).

Serological detection of PRSV

The serological detection of PRSV in all leaf samples was performed using DAS-ELISA and the PhatoScreen® (Agdia) kit. The samples were macerated in an extraction shock-absorber and then 100 µL of raw extract were taken and placed in ELISA plates along with the positive and negative controls provided in the kit. The incubations, the enzyme-substrate conjugate, as well as the corresponding washings were conducted following the manufacturer's instructions, this is, measuring wells at 405 nm. The absorbance value three times higher than that of the absorbance of the negative control was taken as a positive value. Each analysis was carried out in triplicate. Based on those results, a descriptive analysis was performed to determine the percentage of the samples positive to PRSV.

También se colectaron hojas de diferentes plantas de papayo con síntomas característicos de PRSV de las mismas plantaciones. Para la identificación de las maleza colectadas a nivel de género y especie, se utilizaron claves dicotómicas de acuerdo a Fryxell, (1988).

Detección serológica de PRSV

La identificación serológica del PRSV de todas las muestras foliares se llevó a cabo mediante DAS-ELISA, se utilizó el kit PhatoScreen® (Agdia). Las muestras se maceraron en amortiguador de extracción y se tomaron 100 µL del extracto crudo. Se depositaron en placas de ELISA junto con controles positivo y negativo suministrados en el kit. Las incubaciones, el conjugado de la enzima-sustrato, así como los lavados correspondientes con las soluciones amortiguadoras se realizaron según indicaciones del fabricante realizando la lectura de los pozos a 405 nm. Se consideró como un resultado positivo el valor de la absorbancia tres veces más alto comparado con la absorbancia del testigo negativo. Cada análisis se realizó por triplicado. A partir de estos datos se realizó un análisis descriptivo para determinar los porcentajes de muestras positivas a PRSV.

Extracción y purificación de RNA

Para la extracción de RNA viral de PRSV, se pesaron 0.5 g de hojas y se pulverizaron con nitrógeno líquido. Se tomaron 50 mg e inmediatamente se adicionaron 500 µL de TRIZOL® (LifeTechnologies™). La mezcla se homogeneizó y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 100 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante tres min. Esta

Extraction and purification of RNA

To extract PRSV viral RNA, 0.5 g of leaves were weighed and powdered with liquid nitrogen. Fifty mg of powder were immediately dissolved in 500 µL de TRIZOL® (LifeTechnologies™). The mixture was homogenized and incubated for 5 min at room temperature. It was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C, and the aqueous phase was transferred to a new tube adding 100 µL of chloroform; the mixture was vigorously agitated and incubated at room temperature for 3 min. The mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at 4 °C. To the aqueous phase recovered, 250 µL of cold isopropyl alcohol were added, and then centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C. The pellet obtained in the previous process was washed in 500 µL of 75% ethanol, dried at room temperature and re-suspended in RNA-free water treated with diethyl dicarbonate. The RNA concentration and purity were verified in a NanoDrop spectrophotometer with an absorbance ratio of 260 and 280 nm, while the RNA integrity was verified in 1% agarose gel electrophoresis with 10 mM sodium borate buffer stained with ethidium bromide.

Detection of *Potyvirus* through reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The RNA reverse transcription (RT) was performed with the kit “GoScript™ Reverse Transcription System” (Promega A5001. Madison, WI. USA). The RNA was denatured at 70 °C for 10 min while the RT reaction mixture was prepared; the mixture contained 2 µL of ribonuclease inhibitor (Recombinant RNasin), 8 U of AMV reverse transcriptase (0.32 µL), 0.25 µg of random oligonucleotides (0.5 µL) and 5 µL of

mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 250 µL de alcohol isopropílico frío y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. La pastilla obtenida se lavó en 500 µL de etanol al 75%; se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de RNAasa tratada con dietilpirocarbonato. La concentración y pureza del RNA se verificó en un espectrofotómetro NanoDrop mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm; mientras que la integridad del mismo se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador borato de sodio 10 mM, teñido con bromuro de etidio.

Detección de *Potyvirus* mediante reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La reverso transcripción (RT) del RNA se realizó utilizando el kit “GoScript™ Reverse Transcription System” (Promega A5001. Madison, WI. USA). El RNA fue desnaturalizado a 70 °C durante 10 min mientras se preparó la mezcla de reacción RT que contenía 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de amortiguador RT 10X, 1 µL de dNTPs 10 mM, 0.25 µL de inhibidor de ribonucleasa (RNasin recombinante), 8 U de transcriptasa reversa AMV (0.32 µL), oligonucleótidos al azar 0.25 µg (0.5 µL) y 5 µL de RNA total (5 ng). La mezcla anterior se incubó a temperatura ambiente 10 min y luego a 48 °C durante 45 min. Inmediatamente después se incubó a 94 °C durante 2 min y finalmente a 5 °C. El DNAc fue amplificado por PCR empleando oligonucleótidos universales para *Potyvirus* descritos por Zheng *et al.* (2010). La mezcla final de reacción para la PCR se realizó en un volumen de 25 µL, la cual consistió de 17.5 µL de agua

total RNA (5 ng). The mixture was incubated at room temperature for 10 min and then at 48 °C for 45 min. Immediately afterward it was incubated at 94 °C for 2 min, and finally at 5 °C. The DNAc was amplified using PCR and universal oligonucleotides for *Potyvirus* as described by Zheng *et al.* (2010). The last reaction mixture for PCR was prepared in a 25 µL volume containing 17.5 µL of MQ water, 2.5 µL of 10X polymerase buffer, 1 µL of MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL of dNTPs 10 mM, 1 µL of each of the oligonucleotides Nib2F (GTI TGY GTI GAY GAY TTY AAY AA) and Nib3R (TCI ACI ACI GTI GAI GGY TGN CC), 0.5 µL of Taq DNA polymerase (5U/µL) (Invitrogen) and 1 µL of DNAc. The reaction mixture was incubated in a thermocycler under the following conditions: denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 denaturation cycles at 95 °C for 45 sec, alignment at 45 °C for 45 sec, extension at 72 °C for 45 sec, and a final extension at 72 °C for 5 min. When the experiment ended, the mixture was kept at 4 °C. 12.5 µL of the PCR product was tested by 1% agarose gel electrophoresis using SB (sodium borate, 10 mM) at 100 V. Finally, the amplification products were visualized using a transilluminator with UV light.

Cloning of PCR products

The PCR products were purified using the “PCR Clean-up” (Lamda Biotech) kit, but those showing more than one amplified band were purified using agarose gel and the “Rapid Gel Extraction System” kit (Marligen). Later on, the purified fragments were cloned in the commercial vector “pGEM-T Easy” (Promega) and inserted into competent *E. coli* cells JM109 (Promega), according to the methodology of Riley *et al.* (2008).

MQ, 2.5 µL de buffer Taq polimerasa 10X, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL de dNTPs 10 mM, 1 µL de cada oligonucleótido Nib2F (GTI TGY GTI GAY GAY TTY AAY AA) y Nib3R (TCI ACI ACI GTI GAI GGY TGN CC), 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL) (Invitrogen) y 1 µL de DNAc. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador con el siguiente programa: desnaturalización de 95 °C por 3 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 45 seg, alineamiento a 45 °C por 45 seg, extensión a 72 °C por 45 seg y una extensión final a 72 °C por 5 min; al término, se mantuvo la temperatura a 4 °C. 12.5 µL del producto de PCR se corrieron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer SB (borato de sodio, 10 mM) a 100 V. Finalmente, los productos de la amplificación se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador con luz UV.

Clonación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados empleando el kit “PCR Clean-up” (Lamda Biotech), mientras que aquellos que mostraron más de una banda amplificada, se purificaron a partir del gel de agarosa con el kit “Rapid Gel Extraction System” (Marligen). Posteriormente, los fragmentos purificados se clonaron en el vector comercial “pGEM-T Easy” (Promega), y se introdujeron en células competentes de *E. coli* JM109 (Promega) de acuerdo a la metodología descrita por Riley *et al.* (2008).

Secuenciación y análisis de las secuencias

La extracción del DNA plasmídico se realizó empleando el kit “Pure Link® Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen) y el plásmido fue secuenciado en un equipo ABI PRISM 310 Genetic Analyzer por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems. El análisis bioinformático

Secuencing and secuencing analysis

The extraction of plasmidic DNA was performed using the “Pure Link® Quick Plasmid Miniprep” (Invitrogen) kit; the plasmid was then sequenced in a ABI PRISM 310 Genetic Analyzer by the termination method using Big Dye from Applied Biosystems. The bioinformatics analysis was performed using CLC Genomics Workbench version 4. The similarity of the obtained sequences was compared with the sequences reported for PRSV in the NCBI database using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) to determine the origin of the isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

Identifying weeds and alternative hosts for PRSV

The genus of the grass-type weed was identified as *Eragrostis spp.* Another group of weeds were identified within the *Herissantia* genus. In this research, all the weed species that gave positive for PRSV were identified according to their morphology and the use of descriptors, according to Fryxell (1988). Papaya plantations showed different phenology and cultural labor to control weeds (Figure 1). The papaya crops at La Cumbre and Chanchopa were being harvested at 13 and 12 months of age, respectively. At La Cumbre there were several papaya plantations that were different ages; the weed samples were collected from a one-month old crop that was at the vegetative development stage. Weeds were managed adequately at the plantations at La Cumbre and Chanchopa, while at the Los Asmoles site there was no weed management; as a result, a great diversity and quantity of weed species

se realizó con el programa CLC Genomics Workbench versión 4; y se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para PRSV en la base de datos de NCBI empleando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) para determinar el origen de los aislados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de maleza y hospederos alternos para PRSV

La maleza de tipo pasto fue identificada a nivel de género como *Eragrosis* spp. Otro grupo de plantas arvenses se identificaron dentro del género *Herissantia* spp., en este estudio todas las especies de maleza que dieron positivo al PRSV fueron identificadas con base a su morfología y el uso de los descriptores según Fryxell, (1988). Las plantaciones de papayo presentaron diferente fenología y labores culturales en el control de maleza (Figura 1). Los cultivos de papayo de La Cumbre y Chanchopa se encontraron en plena cosecha de frutos y tenían 13 y 12 meses de edad, respectivamente. En la cumbre, se encontraron varias plantaciones de papayo con diferentes edades; las muestras de maleza se colectaron en una plantación del cultivo en desarrollo vegetativo con un mes de edad. Las plantaciones de La Cumbre y Chanchopa, presentaron un manejo adecuado de la maleza, mientras que el sitio Los Asmoles no tuvo labores de manejo en este sentido, por lo que presentó una gran cantidad y diversidad de especies arvenses. Lo anterior representa un foco de infección para los fitopatógenos, ya que en cultivos abandonados o con nulo manejo de maleza son más recurrentes las infecciones virales mixtas (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016). En algunos casos la presencia de maleza es intercalada en el cultivo a manera de cultivos

sprang up there. This condition represents a source of infection for phytopathogens, because when crops are abandoned, or there are no weed management practices, mixed viral infections become increasingly frequent (Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016). In some cases, weeds are interspersed with plants in the form of tramp crops. However, it is very important to ensure that such weeds are not virus hosts that attract possible vectors like aphids that contribute to the rapid spread of the virus (Kalleshwaraswamy and Kumar, 2008). Overall, the sampled papaya plants showed mosaic, leaf deformation, oily stains in the stem and ring-like spots in fruit, all of them characteristic symptoms of PRSV (Figure 1). The symptoms observed in the field were similar to those reported in papaya plants in several states of Mexico, as well as in Hawaii, Florida, Taiwan and Thailand, to name a few (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2008).

Martins *et al.* (2016) recently collected in Brazil aphid vectors present in 22 weed species in papaya plantations, most of them belonging to the *Euphorbiaceae*, *Commelinaceae*, *Brassicaceae* and *Malvaceae* families. They also identified one Solanaceae species: *Solanum americanum*. Chin *et al.* (2007) reported that *Momordica charantia* is a PRSV-P carrier; however, Spadotti *et al.* (2013), after evaluating it through mechanical inoculation and aphid vectors, stated that *Momordica charantia* is not susceptible to any of the PRSV strains (P and W). In this research, we found a *M. charantia* specimen from Los Asmoles that appeared healthy and gave negative DAS-ELISA and RT-PCR test results. However, in the future it would be useful to analyze a greater number of samples of this species to determine if *M. charantia* can act as a reservoir of the virus.

The expression of the multiple viral symptoms in weeds associated with papaya crop in three localities in Colima is shown in Figure 2. The weed

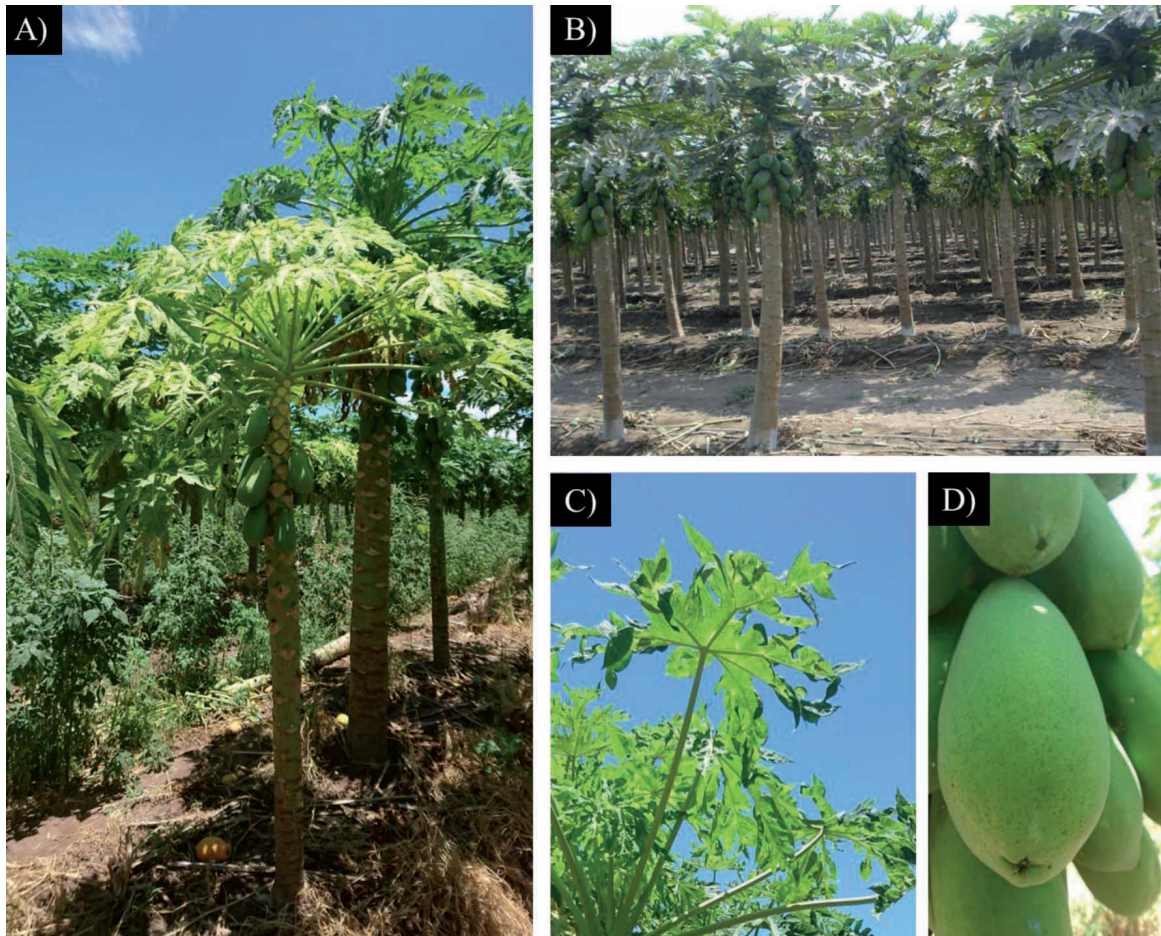


Figura 1. A) Síntomas de PRSV en plantación de papayo mostrando la abundancia de maleza intercalada, B) Plantación con control total de maleza, C) Hojas distorsionadas de papaya con síntomas de clorosis y mosaico, D) Frutos con anillos característicos de PRSV.

Figure 1. A) Symptoms of PRSV in a papaya plantation where there are abundant interspersed weeds; B) Plantation with full control of weeds; C) Distorted leaves of papaya with chlorosis and mosaic symptoms; D) Fruit with characteristic rings caused by PRSV.

trampa, sin embargo será de gran importancia identificar que estos no sean hospederos de virus y funcionen como atrayentes de posibles vectores como los áfidos que contribuye a la rápida propagación del virus (Kalleshwaraswamy y Kumar, 2008). En general, las plantas de papayo que se muestrearon, presentaron síntomas de mosaico y deformación de hojas, manchas aceitosas en tallos y manchas anulares en frutos, todos ellos característicos del PRSV

samples that developed symptoms account for 72% of the total sampling, except for *Eragrosis* spp. and *Herissantia* spp. Mosaics were observed in plants identified as abutilon (*Abutilon abutilastrum*), spurred anoda (*Anoda cristata*) and buffalobur nightshade (*Solanum rostratum*). The latter species also developed leaf distortion and chlorosis, the same as summer squash (*Cucurbita pepo*), whose leaf deformation was quite severe. On the other

(Figura 1). Estos síntomas observados en campo son similares a los reportados en plantas de papayo en varios estados de México y otros países como Hawaii, Florida, Taiwan y Tailandia, entre otros (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2008).

Recientemente, Martins *et al.* (2016), colectaron en Brasil áfidos vectores presentes en 22 especies arvenses de plantaciones de papayo, la mayoría pertenecientes a las familias Euphorbiaceae, Commelinaceae, Brassicaceae y Malvaceae, también se identificó una Solanaceae: *Solanum americanum*. Chin *et al.* (2007) reportaron a *Momordica charantia* como portadora de PRSV-P, sin embargo, Spadotti *et al.* (2013) determinaron que ésta especie no es susceptible a ninguna de las cepas de PRSV (P y W), tras evaluar su inoculación mecánica y mediante áfidos vectores en la especie antes mencionada. En este estudio se encontró un ejemplar de *M. charantia* proveniente de Los Asmoles, el cual tuvo una apariencia sana y presentó un resultado negativo a PRSV por DAS-ELISA y RT-PCR, sin embargo, resulta conveniente analizar en un futuro un mayor número de muestras de esta especie para determinar si puede actuar como reservorio del virus.

La expresión de la diversidad de síntomas virales en maleza asociada al cultivo del papayo en tres localidades de Colima se muestra en la Figura 2. Las muestras de maleza que presentaron síntomas representa un 72.6% del total muestreado, exceptuando las especies de *Eragrosis* spp. y *Herissantia* spp. Se observaron mosaicos en plantas identificadas como abutilón (*Abutilon abutilastrum*), violeta de campo (*Anoda cristata*) y mala mujer (*Solanum rostratum*). Esta última especie también presentó distorsión de la hoja y clorosis, al igual que la calabacilla (*Cucurbita pepo*), cuya deformación de hoja fue muy severa. Por otra parte, se encontró un ejemplar asintomático de *Momordica charantia* en la localidad de Los Asmoles, la cual está reportada

hand, an asymptomatic specimen of *Momordica charantia* was found in Los Asmoles, which has been reported as host for several viruses; *C. pepo*, *S. rostratum* and *A. cristata* are susceptible to 62, 8 and 1 viruses, respectively; for the *Abutilon* genus, five viral phytopathogens have been reported (Brunt *et al.*, 1996). When weeds serve as a reservoir of a large number of viruses, this often means that the symptoms observed are the result of the synergic expression of a mixture of viral infections (Zhang *et al.*, 2001; Hii *et al.*, 2002; Gastélum *et al.*, 2007; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016).

Detection of PRSV

Data on the detection of PRSV through DAS-ELISA and RT-PCR in plants of *C. papaya* and weeds associated with the crop from three Colima sites are shown in Table 1. From the 130 collected samples, 57 collected at La Cumbre were analyzed using DAS-ELISA and gave positive to PRSV in *C. papaya* and *C. pepo*. This result may be explained by the fact that the analyzed samples did not reach the minimum viral concentration since, according to reports, the DAS-ELISA technique does not detect virus in plants if its concentration level is less than 0.1 ng of virus per mL (Salazar, 1996). In this study, up to 50% of positive samples was reported by DAS-ELISA, a percentage highly significant and different from the percentage obtained by Hernández de la Cruz *et al.* (2007), who detected 2.43% of PVY^{NTN} in potato tubers using the DAS-ELISA technique.

The BLASTn analysis of the 13 sequences obtained in the present research that correspond to the NIB region of PRSV allowed for the first time the identification of *A. abutilastrum*, *A. cristata* and *S. rostratum* as new natural host species for PRSV. Isolated sequences of *C. papaya* and *C. pepo* were also included, but they have been

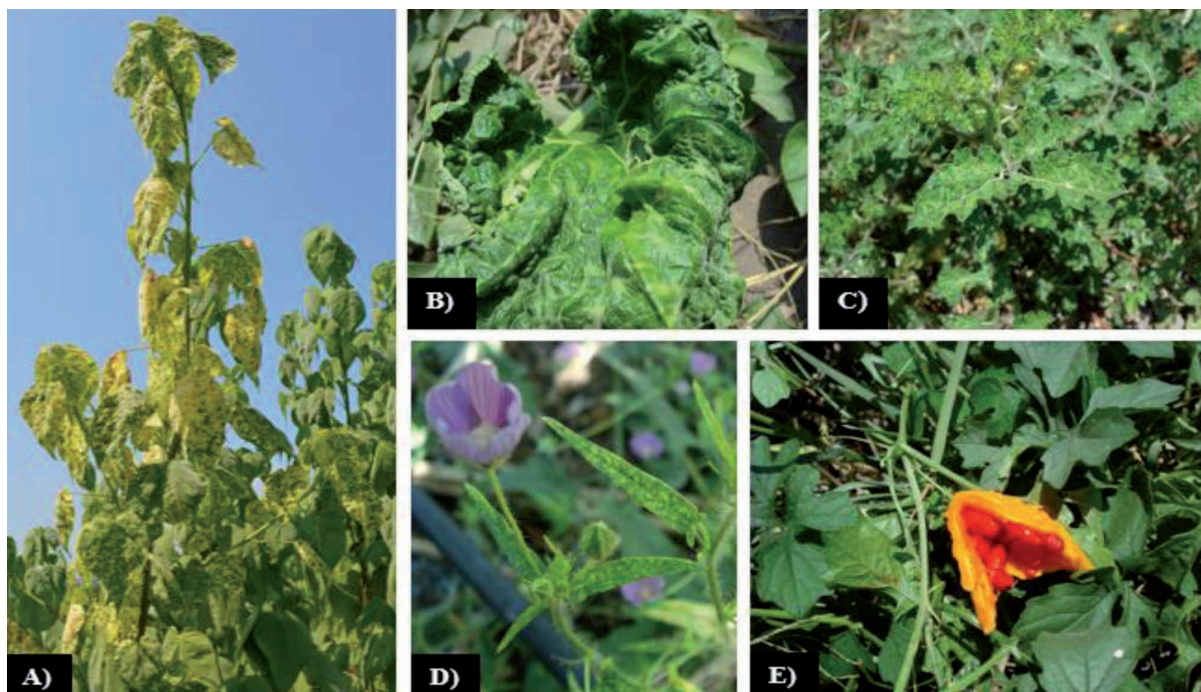


Figura 2. Diversidad de maleza localizada en tres plantaciones de papayo con síntomas virales. A) *A. abutilastrum* con mosaicos en hojas. B) *C. pepo* con deformación severa de hoja C) *S. rostratum* con mosaicos y clorosis. D) *A. cristata* con mosaicos en hojas. E) *Momordica charantia* asintomática.

Figure 2. Diverse weeds in three papaya plantations with viral symptoms. A) *A. abutilastrum* with mosaics in leaves. B) *C. pepo* with severe deformation of leaves. C) *S. rostratum* with mosaics and chlorosis. D) *A. cristata* with mosaic in leaves. E) *Momordica charantia* asymptomatic.

como hospedera de varios virus, mientras que *C. pepo*, *S. rostratum* y *A. cristata* son susceptibles a 62, 8 y 1 virus, respectivamente, así como para el género *Abutilon* se reportan cinco fitopatógenos virales (Brunt *et al.*, 1996). Esta condición en que la maleza sirve como reservorio de una gran cantidad de virus ocasiona frecuentemente que los síntomas observados sean producto de la expresión sinérgica de infecciones virales mixtas (Zhang *et al.*, 2001; Hii *et al.*, 2002; Gastélum *et al.*, 2007; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2016).

DetECCIÓN DE PRSV

La detección de PRSV mediante DAS-ELISA y RT-PCR en plantas de *C. papaya* y maleza asociada

extensamente reportada como hospedera de PRSV (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Sreenivasulu and Sai-Gopal, 2010; Goyal *et al.*, 2012; Mansilla *et al.*, 2013). Phylogenetics (Figure 3) was useful to identify three similar sequence groups. A clear grouping is seen according to the plantation zone; for example, it was observed that sample 11 and 12 corresponding to *C. pepo* and *A. abutilastrum*, respectively, was the same as the one found in *C. papaya* corresponding to sequences 9 and 8 from Los Asmoles. This finding clearly confirms that the weed transmits the same virus to papaya plants. Another major finding was the diverse sequences identified for the Colima zone which are markedly different from other isolates, even from the one reported for Veracruz (AY231130) with 92%

al cultivo procedentes de tres localidades de Colima son mostrados en el Cuadro 1. De las 139 muestras colectadas se analizaron por DAS-ELISA 57 de ellas, provenientes de la localidad de La Cumbre, y resultaron positivas para PRSV *C. papaya* y *C. pepo*. Lo anterior puede atribuirse a que las muestras analizadas no alcanzaron la concentración mínima viral, ya que está reportado que la técnica de DAS-ELISA no detecta virus en plantas si su concentración es menor de 0.1 ng de virus por mL (Salazar, 1996). En el presente estudio se reportó hasta un 50% de muestras positivas por DAS-ELISA; porcentaje significativamente elevado a diferencia del obtenido por Hernández de la Cruz *et al.* (2007) quienes detectaron el 2.43% de PVY^{NTN} en tubérculos de papa por DAS-ELISA.

El análisis de BLASTn de 13 secuencias generadas en el presente trabajo correspondientes a la región Nib de PRSV permitió identificar por primera vez a *A. abutilastrum*, *A. cristata* y *S. rostratum* como nuevas especies hospedantes naturales

homology. Such diversity of PRSV isolates has been observed in regions of China due to the high mutation rate of the virus (Zhao *et al.*, 2016), which makes difficult to implement control strategies. As expected, other Potyvirus such as: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV) were located farther away in the dendrogram with 70 to 73% identity in the sequence.

28.15% of papaya plants analyzed in this research developed viral symptoms but they gave negative to PRSV when tested using RT-PCR. This may be due to the fact that *C. papaya* is susceptible to more than eight phytopathogen viruses such as *Papaya apical necrosis virus* (PANV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya Mosaic Virus* (PMV), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), among others (Lastra and Quintero, 1981; Brunt *et al.*, 1996), so it may be that the viral symptom may be caused by some of those viruses.

Cuadro 1. Detección por métodos serológicos y moleculares de PRSV en maleza asociada al cultivo de papayo en tres localidades de Colima, México.

Table 1. Detection of PRSV in weeds associated with papaya crop in three sites in Colima Mexico, using serological and molecular methods.

Localidad	Muestras colectadas	Especie	Familia	Positivas a PRSV (%)	
				DAS-ELISA	RT-PCR
La Cumbre	57	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	40
		<i>A. cristata</i>	Malvaceae	0	21
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	50	54
		<i>Eragrosis spp.</i>	Poaceae	0	0
		<i>S. rostratum</i>	Solanaceae	0	18
Los Asmoles	35	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	90
		<i>A. abutilastrum</i>	Malvaceae	0	28
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	50	80
		<i>M. charantia</i>	Cucurbitaceae	0	0
		<i>S. rostratum</i>	Solanaceae	20	33
Chanchopa	47	<i>C. papaya</i>	Caricaceae	40	75
		<i>C. pepo</i>	Cucurbitaceae	0	0
		<i>Herissantia spp.</i>	Malvaceae	0	0

de PRSV. Además, también se incluyeron secuencias aisladas de *C. papaya* y *C. pepo*, aunque estas ya están ampliamente reportadas como hospederas de PRSV (Noa-Carranza *et al.*, 2006; Sreenivasulu y Sai-Gopal, 2010; Goyal *et al.*, 2012; Mansilla *et al.*, 2013). La filogenia (Figura 3) permitió identificar tres grupos de secuencias similares. Se observa una clara agrupación de acuerdo a la zona de plantación, en las que se observó la muestra 11 y 12 correspondiente a *C. pepo* y *A. abutilastrum* respectivamente fue la misma que la encontrada en *C. papaya* correspondiente a la secuencia 9 y 8 perteneciente a Los Asmoles. Este hallazgo confirma de manera clara que la maleza aporta el mismo virus a

CONCLUSIONS

The DAS-ELISA technique allowed the detection of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in *C. papaya* and any other weed present in papaya crops. However, the number of positive samples was underestimated when they were compared using RT-PCR. This technique was useful to identify the presence of PRSV in weed species associated with papaya crop, such as *A. abutilastrum*, *A. cristata*, *C. pepo* and *S. rostratum*. PRSV was not detected in *M. charantia*. This research reports for the first time that *A. abutilastrum* and *A. cristata*, belonging to the Malvaceae family, and *S. rostratum* belonging

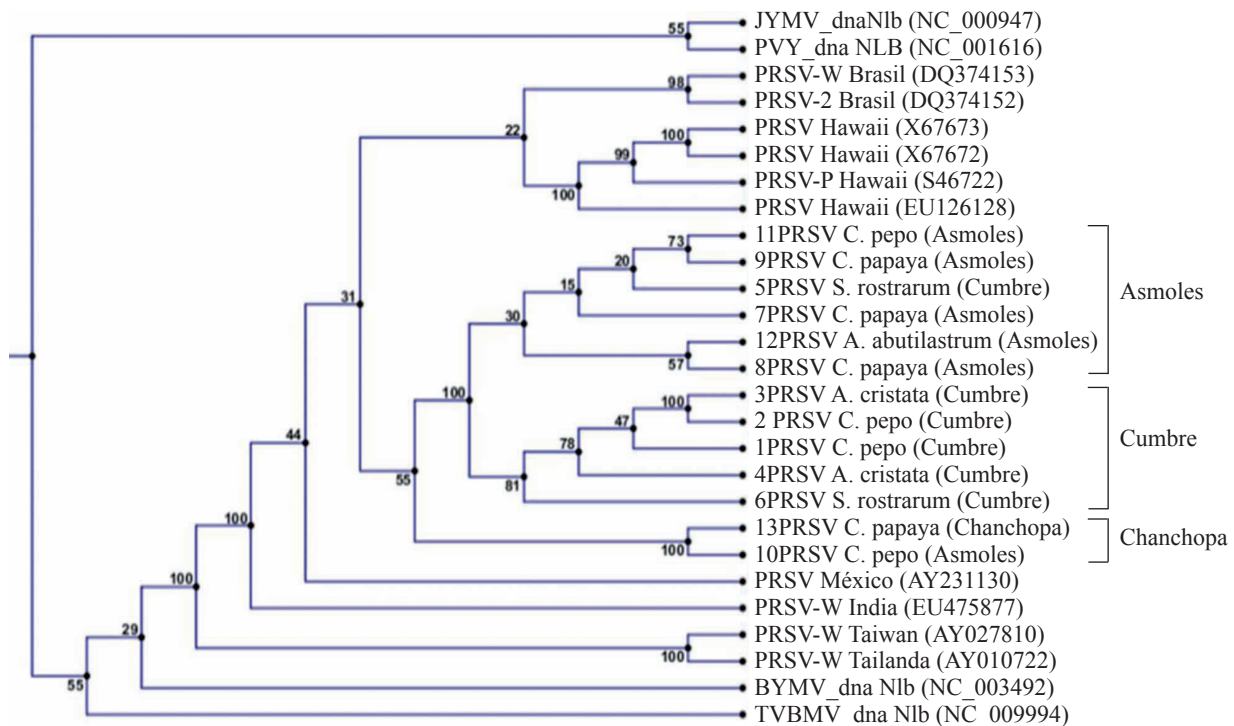


Figura 3. Filogenia generada a partir de la similitud de secuencias de la región N1b del genoma de *Papaya ringspot virus* (PRSV) de aislados de Colima, México (1-13) comparadas con aislamientos de Brasil, Hawái, India, Taiwán, Tailandia y otros Potivirus: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV).

Figure 3. Phylogeny based on the similarity of the sequences of the N1b region of the *Papaya ringspot virus* (PRSV) genome from isolates collected in Colima, Mexico (1-13) and compared with isolates from Brazil, Hawaii, India, Thailand, and other Potivirus: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV).

las plantas de papayo. Otra observación importante fue la diversidad en secuencias que se encontraron para la zona de Colima que diferencia claramente con otros aislados incluso con el reportado para Veracruz (AY231130) con un 92% de homología. Esta diversidad en aislados de PRSV se ha observado para regiones de China, debido a la alta tasa de mutación del virus (Zhao *et al.*, 2016), lo que complica las estrategias de control para este virus. Como era de esperarse, otros Potyvirus como: *Japanese yam mosaic potyvirus* (JYMV), *Potato virus Y* (PVY), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Tobacco vein banding mosaic virus* (TVBMV) fueron los más alejados en el dendrograma con un porcentaje de identidad en la secuencia del 70 al 73%.

El 28.15% plantas de papayo analizadas en este estudio presentaron sintomatología viral, pero resultaron negativas a PRSV mediante RT-PCR. Lo anterior puede deberse a que *C. papaya*, es susceptible a más de ocho virus fitopatógenos entre los que destacan *Papaya apical necrosis virus* (PANV), *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV), *Papaya Mosaic Virus* (PMV), *Papaya leaf distortion mosaic virus* (PLDMV), entre otros (Lastra y Quintero, 1981; Brunt *et al.*, 1996), por lo que muy probablemente el síntoma viral presentado, podría corresponder a la infección por alguno de estos virus.

CONCLUSIONES

La técnica de DAS-ELISA permitió la detección del *Papaya ringspot virus* (PRSV) en *C. papaya* y alguna maleza presente en el cultivo sin embargo se subestimó el número de muestras positivas al comparar con la técnica de RT-PCR. La técnica molecular de RT-PCR permitió identificar la presencia de PRSV en las especies de arvenses asociadas al cultivo de papayo como *A. abutilastrum*, *A. cristata*, *C. pepo* y *S. rostratum*. No se detectó

to the Solanaceae family, are host weed species for PRSV.

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

la presencia de PRSV en *M. charantia*. El presente trabajo reporta por primera vez a *A. abutilastrum* y *A. cristata* pertenecientes a la familia Malvaceae y *S. rostratum* de la familia Solanaceae como especies arvenses hospederas de PRSV.

## LITERATURA CITADA

- Abreu PMV, Antunes TFS, Magaña-Álvarez A, Pérez-Brito D, Tapia-Tussell R, Ventura JA, Fernandes AAR and Fernandes PMB. 2015. A current overview of the *Papaya meleira virus*, an unusual plant virus. *Viruses* 7: 1853-1870. <http://dx.doi.org/10.3390/v7041853>
- Bermúdez-Guzmán MJ, García-Mariscal KP, Orozco-Santos M, Guzmán-González S, Velázquez-Monreal JJ, García-Preciado JC, Cervantes-Preciado JF y Álvarez-Cilva M. 2016. Enfermedades ocasionadas por virus en caña de azúcar en el Occidente de México. Campo Experimental Tecomán, INIFAP. Folleto técnico No. 13. Tecomán, Col., México. 27p. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15748.73605>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L and Zurcher EJ. 1996. Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 16th January 1997. Disponible en línea: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Chin M, Ahmad MH and Tennant P. 2007. *Momordica charantia* is a weed host reservoir for *Papaya ringspot virus* Type P in Jamaica. *Plant Disease*. 91: 1518. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1518A>
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselbelguer U and Ball LA. 2005. Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st Edition. Academic Press Elsevier. Amsterdam, Holanda. 1162p. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7091-6607-9>
- Fryxell, P. A. Malvaceae of Mexico. *Syst. Bot. Monogr.* 25: 1-522. 1988. Disponible en línea: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Flora%2016.pdf>
- Gastélum RB, Magallanes-Tapia MA, Méndez-Lozano J, Huet H, Trigueros-Salmerón JA y Longoria-Espinosa RM. 2007. Detección del *virus mosaico amarillo de la calabaza zucchini* (ZYMV) y su coinfección con otros virus en cucurbitáceas cultivadas y plantas silvestres en el valle del fuerte, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:95-101. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225201.pdf>



- Goyal G, Gill HK and McSorley R. 2012. Common weed hosts of insect-transmitted viruses of Florida vegetable crops. Disponible en línea: <http://edis.ifas.ufl.edu/in931>
- Hernández-Castro E, Villanueva-Jiménez JA, Mosqueda-Vázquez R y Mora-Aguilera JA. 2004. Efecto de la erradicación de plantas enfermas por el PRSV-P en un sistema de manejo integrado del papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 382-388. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222311>
- Hernández-Castro E, Damian-Nava A, Mora-Aguilera A, Villanueva-Jimenez JA, Vargas-Álvarez D and Palemón-Alberto F. 2015. Incidence of the Papaya Ringspot Virus (PRSV-p) and Management in the State of Guerrero, Mexico. Pp:119-127 *In*: S. Dimitrov Todorov and I. Vitanova Ivanova (eds.) *Tropical Fruits*. Chapter 7. Nova Science Publishers, Inc. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3437.5203>
- Hernández de la Cruz M, Gómez-Leyva JF, López-Muraira IG, Dimas-Estrada MS, Andrade-González I y Ireta-Moreno J. 2007. Detección serológica y molecular del virus PVYN y su variante PVYN<sup>NTN</sup> en papa (*Solanum tuberosum* L.) y hospedantes alternos en Tapalpa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25: 167-172. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225211.pdf>
- Hii G, Pennington R, Hartson S, Taylor CD, Lartey R, Williams A, Lewis D and Melcher U. 2002. Isolate-specific synergy in disease symptoms between cauliflower mosaic and turnip vein-clearing viruses. *Archives Virology* 147: 1371-1384. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0812-8>
- Kalleshwaraswamy CM and Kumar NK. 2008. Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. *Phytopathology*. 98: 541-546. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-98-5-0541>
- Lastra R and Quintero E. 1981. Papaya apical necrosis, new diseases associated with a *Rhabdovirus*. *Plant Disease* 65: 439-440. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-65-439>
- Mansilla PJ, Moreira AG, Mello APOA, Rezende JAM, Ventura JA, Yuki VA and Levatti FJ. 2013. Importance of cucurbits in the epidemiology of *Papaya ringspot virus* type P. *Plant Pathology* 62: 571-577. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02677.x>
- Martins DS, Ventura JA, Paula RCAL, Fornazier, MJ, Rezende, JAM, Culik MP, Ferreira PSF, Peronti ALBG, Carvalho RCZ and Sousa-Silva CR. 2016. Aphid vectors of *Papaya ringspot virus* and their weed host in orchards in the major papaya producing and exporting region of Brazil. *Crop Protection* 90: 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.030>
- Navanath MD, Anitha P, Gahukar SJ, Akhare AA. 2017. Biological indexing of *Papaya ring spot virus* (PRSV) in *Carica papaya*. *International Journal of Agriculture* 9: 3728-3730. Disponible en línea: [https://bioinfopublication.org/files/articles/9\\_4\\_7\\_IJAS.pdf](https://bioinfopublication.org/files/articles/9_4_7_IJAS.pdf)
- Noa-Carranza JC, González de León D, Ruiz-Castro BS, Piñero D and Silva-Rosales L. 2006. Distribution of *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus* in papaya plants (*Carica papaya*) in Mexico. *Plant Disease*. 90: 1004-1011. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1004>
- Riley SP, Woodman ME and Stevenson B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and related bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Wiley. U 4.2.168p. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0402s00>
- Salazar LF. 1996. Potato viruses and their control. 1st Edition. International Potato Center (CIP). Lima, Perú. 214p. Disponible en línea: <https://cipotato.org/publications/potato-viruses-and-their-control/>
- SIAP 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en línea: [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index)
- Spadotti DMA, Buriolla JE, Rezende JAM and Souza VC. 2013. The wild type of *Momordica charantia* is not infected by potyviruses that cause disease in papaya and cucurbit crops. *Tropical Plant Pathology* 38: 447-451. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000029>
- Sreenivasulu M and Sai-Gopal DVR. 2010. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR and comparison of its sensitivity with other immunoassays for the detection of *Papaya ringspot virus* isolates from India. *The Plant Pathology Journal*. 26: 25-31. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.1.025>
- Tantiwanich Y, Baker CA, Turechek WW and Adkins S. 2014. Detection of *Papaya ringspot virus* type W infecting the cucurbit weed *Cucumis melo* var. *dudaim* in Florida. *Plant Health Progress* 15: 29-30. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-BR-13-0126>
- Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA and Gonsalves D. 2008. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Molecular Plant Pathology*. 9: 269-280. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00467.x>
- Zhao H, Zong RJ, Zhang YL, Zhu YJ, Zeng HC, Kong H, McCafferty H, Guo AP, and Peng M. 2016. Geographical and Genetic Divergence Among *Papaya ringspot virus* Populations Within Hainan Province, China. *Virology* 106:937-944. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-15-0111-R>
- Zhang XS, Holt J and Colvin J. 2001. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. *Plant Pathology* 50: 732-746. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00613.x>
- Zheng L, Rodoni BC, Gibbs MJ and Gibbs AJ. 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*. 59: 211-220. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201.x>



# Detection of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in *Saccharum* spp. in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco

## Detección del *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) en *Saccharum* spp. en México y origen filogenético de un aislado de Jalisco

**Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán\***, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán, Laboratorio de Biotecnología de Plantas, Km 35 carretera Colima-Manzanillo, CP. 28100, Tecomán-Colima; **Francisco Javier Delgado-Virgen**, Instituto Tecnológico de Colima. Avenida Tecnológico No. 1, CP. 28976, Villa de Álvarez, Colima; **Jeovani Francisco Cervantes-Preciado, José Concepción García-Preciado**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Tecomán. Km 35 carretera Colima-Manzanilla, CP. 28100, Tecomán-Colima; **Vania Sbeyde Farías-Cervantes**, Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Km 10 carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, CP. 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. \*Autor para correspondencia: bermudez.manuel@inifap.gob.mx.

**Recibido:** 11 de Septiembre, 2017.

**Aceptado:** 16 de Octubre, 2017.

Bermúdez-Guzmán MJ, Delgado-Virgen FJ, Cervantes-Preciado JF, García-Preciado JC, Farías-Cervantes VS. 2017. Detection of *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) in *Saccharum* spp. in Mexico and phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 16-34.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1709-2

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 06, 2017.

**Resumen.** El *virus de mosaico de la caña de azúcar* (SCMV) es uno de los principales agentes virales que infectan a caña de azúcar (*Saccharum* spp.). En México la detección del SCMV se ha basado en sintomatología típica de la enfermedad, por lo que la información no es concluyente, además hay poca información sobre su origen filogenético.

**Abstract.** *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) is one of the main viral agents that infect sugarcane (*Saccharum* spp.). SCMV detection in Mexico has been based on typical symptomatology of the disease, which is not conclusive. Additionally, there is limited information about their phylogenetic origin. The objective of this work was to detect the presence and distribution of SCMV in the sugarcane growing areas of the Mexican Pacific using RT-PCR, and to determine the phylogenetic origin of one isolate from Jalisco. The results showed the wide distribution of SCMV in sugarcane areas of the Mexican Pacific. The virus was found in 33 of the 242 samples analyzed, corresponding to 13.63%. The varieties Mex 69-290 and CP 72-2086 presented the most severe mosaic symptoms. Phylogenetic analysis using partial HC-Pro sequences of SCMV isolate from Jalisco (JalMex-126) suggests a close relationship

El objetivo del trabajo fue detectar mediante RT-PCR la presencia y distribución del SCMV en las zonas cañeras de los estados de Colima, Jalisco y Nayarit, México y determinar el origen filogenético de un aislado de Jalisco. Los resultados obtenidos demuestran la amplia distribución del SCMV en la región cañera del Pacífico de México. De las 242 muestras analizadas se detectó al virus en 33 de ellas, lo que corresponde a un 13.63%. Las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086 fueron las que presentaron los síntomas de mosaico más severos. El análisis filogenético con la secuencia parcial HC-Pro del SCMV aislado de Jalisco (JalMex-126) sugiere una estrecha relación con aislados de la India, Australia, China y Argentina, por lo que probablemente compartan un origen genético común y se hayan dispersado a través de germoplasma de caña de azúcar infectado.

**Palabras clave:** caña de azúcar, virus, RNA, filogenia.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por fitopatógenos constituyen un factor importante para la producción de caña de azúcar. En México, aproximadamente el 80% de las enfermedades que afectan este cultivo son de origen fúngico, el 20% restante es causado por bacterias, virus y fitoplasmas (CONADESUCA, 2015). Entre las primeras epidemiologías sobre el cultivo de la caña de azúcar reportadas en el mundo a comienzos del siglo XX están las ocasionadas por virus, causando grandes pérdidas económicas (Grisham, 2000). El *Virus del mosaico de la caña de azúcar* (SCMV), agente causal de la enfermedad del mosaico, es uno de los patógenos virales de mayor importancia económica a nivel mundial (Gonçalves *et al.*, 2012). La enfermedad fue responsable de drásticas epidemias en Argentina,

with isolates from India, Australia, China and Argentina, and thus likely share a common genetic origin and have been dispersed to through infected sugarcane germplasm.

**Key words:** sugarcane, virus, RNA, phylogeny.

## INTRODUCTION

Diseases caused by phytopathogens are an important factor for sugarcane production. In Mexico, approximately 80% of the diseases that affect this crop are fungal in origin, and the remaining 20% is caused by bacteria, viruses and phytoplasmas (CONADESUCA, 2015). Some of the first epidemiologies on the sugarcane crop reported in the world in the beginning of the 20th Century include those caused by viruses, causing large economic losses (Grisham, 2000). The *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), causal agent of the mosaic disease, is one of the most economically important causal agents of the mosaic disease worldwide (Gonçalves *et al.*, 2012). The disease caused drastic outbreaks in Argentina, Brazil, Cuba, Puerto Rico, and the United States (Koike and Gillaspie, 1989; Yang and Mirkov, 1997). This led to the introduction of interspecific hybrids of the genus *Saccharum* (mosaic-tolerant) imported from Java, in order to control the rapid spread of the disease in noble canes (*S. officinarum*) obtained back then in those countries (Koike and Gillaspie, 1989). In susceptible varieties infected with SCMV, yield losses are estimated in 11-50% (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005). In Mexico, the first report (based on symptoms) of this virus affecting sugarcane was carried out in 1929, in El Potrero, Veracruz. In 1947, over 80% of the areas planted with native sugarcane varieties, from the Independencia Mill in the municipal area of Martínez de la Torre, presented the disease

Brasil, Cuba, Puerto Rico y Estados Unidos (Koike y Guillaspie, 1989; Yang y Mirkov, 1997). Lo anterior condujo a la introducción de híbridos interespecíficos del género *Saccharum* (tolerantes al mosaico) importados de Java, con el fin de controlar la rápida propagación de la enfermedad en las cañas nobles (*S. officinarum*) obtenidas en aquel entonces en esos países (Koike y Gillaspie, 1989). En variedades susceptibles infectadas con SCMV las pérdidas en rendimiento se estiman de 11-50% (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2005). En México, el primer reporte (basado en sintomatología) de este virus afectando a caña de azúcar fue realizado en 1929, en El Potrero, Veracruz. En 1947 más del 80% de las áreas plantadas con variedades de caña de azúcar criollas, del Ingenio Independencia en el municipio de Martínez de la Torre, presentaron la enfermedad (CONADESUCA, 2015). En ese mismo país el primer reporte (basado en métodos moleculares) del SCMV afectando plantas de maíz fue realizado en el año 2006 (Espejel *et al.*, 2006), sin embargo, no hay información cuantitativa sobre los daños que ocasiona esta enfermedad en los cultivos de caña de México.

El síntoma general causado por el SCMV en caña de azúcar se caracteriza principalmente por presentar decoloraciones en la lámina foliar, en la cual se observan zonas de color verde normal alternado con áreas verde pálido o amarillentas; estas decoloraciones son resultado de los niveles de variación en la concentración de la clorofila en la hoja (Grisham, 2000; CONADESUCA, 2015). Los síntomas de esta enfermedad también pueden ser causados por otros virus y pueden confundirse con el mosaico estriado (SCSMV) o el mosaico del sorgo (SrMV), los cuales también infectan a caña de azúcar (Viswanathan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Además, las plantas asintomáticas también pueden resultar positivas al SCMV (Xu *et al.*, 2008). En México, son escasos los reportes sobre la detección del SCMV por métodos moleculares, y mayorita-

(CONADESUCA, 2015). In that same country, the first report (based on molecular methods) of SCMV affecting maize plants was carried out in 2006 (Espejel *et al.*, 2006), although there is no quantitative information on the damages this disease causes in sugarcane plantations in Mexico.

The general symptom caused by SCMV is characterized mostly by the paling of the leaf blade, which presents normally green colored areas, alternated with pale or yellow-green areas; these areas are a result of the variations in the levels of chlorophyll in the leaf (Grisham, 2000; CONADESUCA, 2015). The symptoms of this disease may also be caused by other viruses and may be confused with the *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) or the *Sorghum mosaic virus* (SrMV), which also affect sugarcane plants (Viswanathan *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2009). Asymptomatic plants can also be positive for SCMV (Xu *et al.*, 2008). In Mexico, reports on the detection of SCMV by molecular methods are scarce, and have mainly been based on symptoms (CONADESUCA 2015), so there is no certainty that the visual damage of the mosaic truly corresponds to SCMV or any other virus that presents similar symptoms. Several reports have standardized protocols to detect SCMV using RT-PCR (Smith and Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010). Smith and Van de Velde (1994) developed primers S400-551 and S400-910, which amplified a 359 bp fragment, which correspond to a partial region that codifies for the capsid protein (CP) of SCMV. In another study, Yang and Mirkov (1997) developed the primers SCMV-F3/SCMV-R3, which amplify a roughly 900 bp band, which corresponds to a region that codifies for the CP protein of SCMV. Xie *et al.* (2009) designed the set of oligonucleotides SCMV-F1/SCMV-R1 based on sequences deposited in the NCBI database; these primers amplified a 720 bp fragment, which corresponds to a partial region of the HC-Pro protein of SCMV. Recently,

riamente se han basado en síntomas (CONADESU-CA 2015), por lo que no hay certeza de que el daño visual de mosaico corresponda realmente al SCMV o algún otro virus que manifiesta síntomas similares. Existen varios reportes que han estandarizado protocolos para la detección del SCMV mediante RT-PCR (Smith y Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010). Smith y Van de Velde (1994) desarrollaron los iniciadores S400-551 y S400-910, los cuales amplifican un fragmento de 359 pb, correspondiente a una región parcial que codifica para la proteína de la cápside (CP) del SCMV. En otro estudio, Yang y Mirkov (1997) desarrollaron los cebadores SCMV-F3/SCMV-R3, los cuales amplifican una banda de aproximadamente 900 pb, correspondiente a una región que codifica para la proteína CP del SCMV. Xie *et al.* (2009), diseñaron el juego de oligonucleótidos SCMV-F1/SCMV-R1 basados en secuencias depositadas en la base de datos de NCBI; dichos iniciadores amplifican un fragmento de 720 pb, correspondiente a una región parcial de la proteína HC-Pro del SCMV. Recientemente, Filippone *et al.* (2010) optimizaron un protocolo para detectar al SCMV utilizando los oligonucleótidos descritos previamente por Yang y Mirkov (1997) y Smith y Van de Velde (1994), respectivamente.

Por otra parte, resulta importante conocer el origen filogenético del SCMV para conocer probables ingresos de esta enfermedad a México. En el año 2012 se reportó un análisis filogenético de 185 secuencias CP del SCMV provenientes de varios países, sugiriendo diferentes orígenes filogeográficos de dos aislados mexicanos que contemplo ese estudio (Chaves y Ortiz, 2012). Por otra parte, los resultados de Xie *et al.* (2016) del análisis filogenético de 24 aislados de SCMV provenientes de China y diversos países del mundo revelaron que podrían dividirse en dos grupos, los cuales fueron asociados con la especie vegetal hospedera del SCMV. Más recientemente, los resultados de Moradi *et al.* (2017) a partir de secuencias CP del SCMV de

Filippone *et al.* (2010) optimized a protocol to detect SCMV using the oligonucleotides described earlier by Yang by Mirkov (1997) and Smith and Van de Velde (1994), respectively.

On the other hand, it is important to know the origin of SCMV in order to know possible entries of this disease into Mexico. In the year 2012, a phylogenetic analysis was reported, with 185 SCMV CP sequences from several countries, suggesting different phylogeographic origins of two Mexican isolates that this study considered (Chaves and Ortiz, 2012). On the other hand, the results produced by Xie *et al.* (2016) on the phylogenetic analysis of 24 SCMV isolates from China and other countries revealed that they could be divided into two groups, which were related to the SCMV host plant species. More recently, results by Moradi *et al.* (2017) from CP sequences of SCMV from various countries suggest five divergent evolutionary lineages, where the geographic origin and/or SCMV host plants are partially related. Due to this, the aim of this study is to detect, using RT-PCR, the presence and distribution of the SCMV in the sugarcane producing areas of the Mexican Pacific, and to establish the phylogenetic origin of one isolate from the state of Jalisco. The information produced in this work may be used by the Sugarcane Research and Development Center (*Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar*, CIDCA), both in its quarantine station for the exchange of germplasm, and in the genetic breeding program, in which the selection and elimination of clones susceptible to SCMV are routine procedures.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

In the year 2014, foliar samples were collected from diverse varieties of sugarcane planted

varios países sugieren cinco linajes evolutivos divergentes, donde se relacionan parcialmente el origen geográfico y/o plantas hospederas del SCMV. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue detectar mediante RT-PCR la presencia y distribución del SCMV en las zonas cañeras del Pacífico de México y determinar el origen filogenético de un aislado del estado de Jalisco. La información generada en este trabajo podrá ser utilizada por el Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA), tanto en su estación cuarentenaria para el intercambio de germoplasma, como dentro del programa de mejoramiento genético, en el que la selección y eliminación de clones susceptibles al SCMV son procedimientos rutinarios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Durante el año 2014 se colectaron muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit (Figura 1). Las plantas presentaron sintomatología típica de mosaico o fueron asintomáticas. Las muestras se envolvieron en bolsas plásticas, fueron colocadas en hieleras con refrigerantes térmicos y se trasladaron al laboratorio de biotecnología de plantas del Campo Experimental Tecomán del INIFAP ubicado en el km 35 de la carretera Colima-Manzanillo en Colima.

### Extracción y cuantificación del RNA total

Se tomaron aproximadamente 200 mg de varias partes del tejido foliar de una misma planta. Estas hojas se pulverizaron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue depositado en un tubo de 1.5 mL y se homogeneizó con 500 µL del

commercially in the states of Colima, Jalisco and Nayarit (Figure 1). Plants displayed typical mosaic symptoms or they were asymptomatic. The samples taken were wrapped in plastic bags, placed in coolers with thermal refrigerants and were transferred to the Laboratory of Plant Biotechnology from Campo Experimental Tecomán of INIFAP, located on km 35 of the Colima-Manzanillo highway, in Colima.

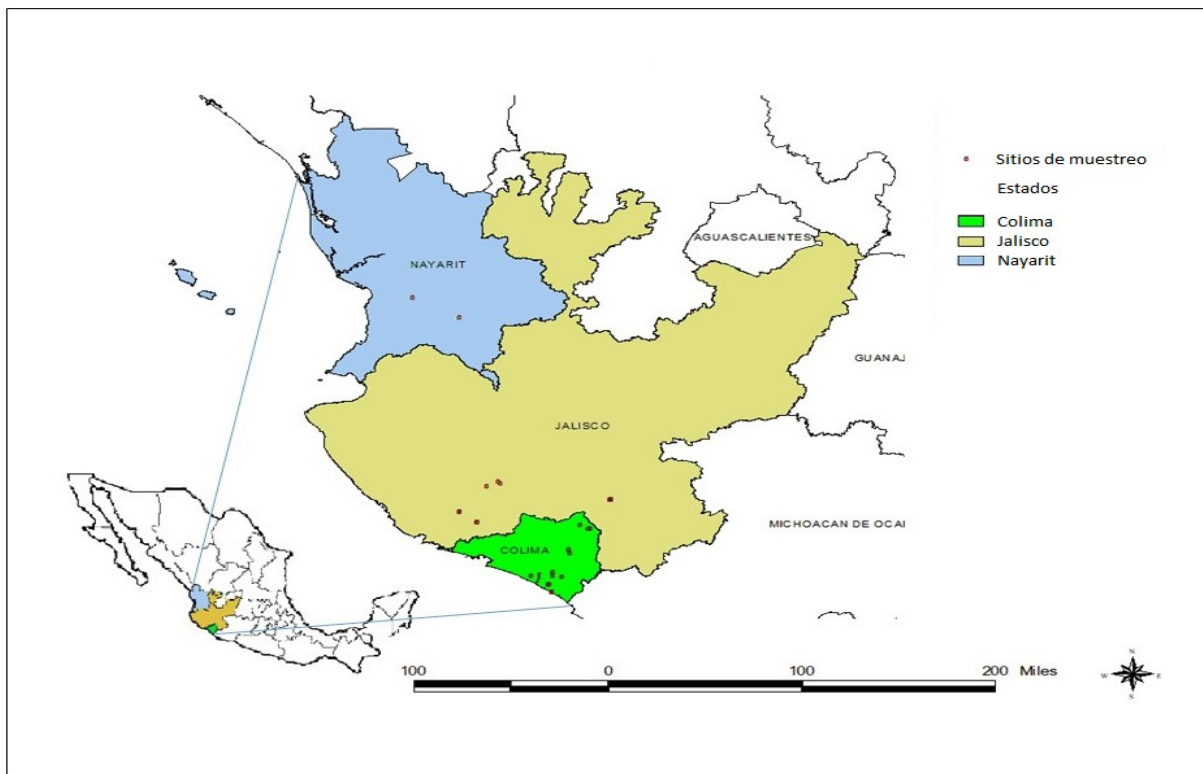
### Extraction and quantification of the total RNA

Approximately 200 mg were taken from several parts of the foliar tissue of one same plant. These leaves were pulverized using liquid nitrogen until a fine powder was formed, which was deposited in a 1.5 mL tube, and homogenized with 500 µL of the Tripure reagent (Roche). Manufacturer recommendations were taken for the extraction of total RNA. Finally, the RNA obtained was resuspended in RNase free water (0.01% DEPC) and stored at -70°C. Quantification was carried out using a NanoDrop (Thermo Scientific) spectrophotometer using 1 µL of the total RNA extracted, and the  $A_{260:280}$  y  $A_{260:230}$  ratio was measured to determine its purity.

### Cloning a fragment of SCMV in pGEM-T Easy

In order to have a positive control for the detection of the virus, the PCR product of 720 bp, which corresponds to a sugarcane foliage sample, obtained in a location of the state of Jalisco, was purified from agarose gel using the “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN) kit, following manufacturer instructions. Later, the fragment was cloned using the “pGEM-T Easy” (Promega) system, and was transformed into *E. coli* JM109 cells (Promega), which were previously made competent using  $\text{CaCl}_2$  according to Riley *et al.*, 2008. A DNA





**Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo donde se colectaron hojas de caña de azúcar.**  
**Figure 1. Geographic location of the sampling sites from which sugarcane leaves were collected.**

reactivo Tripure (Roche). Se siguieron las recomendaciones del fabricante para la extracción del RNA total. Finalmente, el RNA obtenido fue resuspendido en agua libre de RNasa (0.01% DEPC) y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) utilizando  $1\ \mu\text{L}$  del RNA total extraído y se midieron las relaciones de  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  para determinar su pureza.

### **Clonación de un fragmento del SCMV en pGEM-T Easy**

Con el objetivo de contar con un control positivo para la detección del virus, el producto de PCR de 720 pb correspondiente a una muestra de follaje de caña de azúcar, obtenida de una localidad

fragment insert cloned in the vector was verified by purification of plasmid DNA from the recombinant cells and the subsequent digestion reaction with enzymes *EcoR* I and *Not* I.

### **Analysis of sequences**

The plasmid from the DNA fragment cloned in *E. coli* was sequenced in a ABI PRISM 310 Genetic Analyzer in both strands with the method of termination with Applied Biosystems' Big Dye. The editing and assembling of the "forward" and "reverse" sequences was carried out using the program CLC Main Workbench 7. Finally, the similarity of the sequences obtained was compared with those reported for SCMV in the National Center for Biotechnology Information (NCBI)

del estado de Jalisco fue purificada a partir del gel de agarosa con el kit “QIAquick Gel Extraction” (QIAGEN), según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el fragmento se clonó con el sistema de “pGEM-T Easy” (Promega) y se transformó en células de *E. coli* JM109 (Promega), las cuales se hicieron competentes previamente con  $\text{CaCl}_2$  de acuerdo a Riley *et al.*, 2008. La comprobación del inserto clonado en el vector se realizó mediante la extracción de DNA plasmídico (Engebrecht *et al.*, 2001) a las colonias recombinantes y posterior reacción de digestión con las enzimas *EcoR* I y *Not* I.

### Análisis de secuencias

El DNA plasmídico del fragmento clonado en *E. coli* fue secuenciado en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en ambas direcciones por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems. La edición y el ensamblado de las secuencias “forward” y “reverse” se realizó con el programa CLC Main Workbench 7. Finalmente se comparó la similitud de las secuencias obtenidas contra las reportadas para SCMV en la base de datos del “National Center for Biotechnology information” (NCBI) empleando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

### Detección del SCMV por RT-PCR

La reacción de transcripción inversa (RT) del RNA total se realizó utilizando el kit “Reverse Transcription System” (Promega). El RNA fue desnaturado a 70 °C durante 10 min; la mezcla de reacción RT se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo 5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , amortiguador RT 1 X, 1 mM de cada dNTP, 1  $\text{u}/\mu\text{L}$  de inhibidor de ribonucleasa RNasin® recombinante, 15  $\text{u}/\mu\text{g}$  de transcriptasa inversa AMV, 0.5  $\mu\text{g}$  de mezcla de oligonucleótidos por  $\mu\text{g}$  de RNA y 5  $\mu\text{L}$  de RNA total (1.5  $\mu\text{g}$  aproximadamente). La mezcla anterior

database, using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

### Detección de SCMV by RT-PCR

The reverse transcription reaction (RT) of the total RNA was carried out using the Reverse Transcription System (Promega) kit. The RNA was denaturalized at 70°C for 10 min; the RT reaction mixture was carried out in a volume of 20  $\mu\text{L}$  containing 5 mM of  $\text{MgCl}_2$ , buffer RT 1 X, 1 mM of each dNTP, 1  $\text{u}/\mu\text{L}$  of recombinant RNasin® ribonuclease inhibitor, 15  $\text{u}/\mu\text{g}$  of AMV reverse transcriptase AMV, 0.5  $\mu\text{g}$  of oligonucleotide mixture by  $\mu\text{g}$  of RNA and 5  $\mu\text{L}$  of total RNA (1.5  $\mu\text{g}$  approximately). This mixture was incubated at room temperature for 10 min and then at 42°C for 45 min. Immediately, it was incubated at 95°C for 5 min, and finally 0-5°C for 5 min. The resulting cDNA were used as a mold for the amplification by PCR with the oligonucleotides described by Xie *et al.* (2009). The final volume of the reaction mixture was 25  $\mu\text{L}$ , containing 12.5  $\mu\text{L}$  of REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1  $\mu\text{M}$  of each oligonucleotide, 3  $\mu\text{L}$  of cDNA and molecular grade water. The reaction mixture was incubated in a thermocycler (Labnet) with the following program: one cycle of 50°C for 30 min and 94°C for 2 min; 35 cycles of 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 5 min. Electrophoresis was carried out on agarose gel at 1% with TAE buffer 1 X and 12.5  $\mu\text{L}$  of the PCR products were used; the samples were run with a voltage of 120 V. Finally, the gels were stained with BrEt and observed using a transilluminator with UV light (UVP) for the analysis of results.

### Phylogenetic analysis

All bioinformatic analysis were carried out using CLC Workbench software version 7.0.3.

fue incubada a temperatura ambiente por 10 min y luego a 42°C durante 45 min. Inmediatamente después se incubó a 95°C durante 5 min y finalmente 0-5°C por 5 min. Los cDNA resultantes fueron utilizados como molde para la amplificación por PCR con los oligonucleótidos descritos por Xie *et al.* (2009). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de REDTaq® ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH), 1 µM de cada oligonucleótido, 3 µL de cDNA y H<sub>2</sub>O grado molecular. La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (Labnet) con el siguiente programa: un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg y 72°C por 1 min seguido de una extensión final a 72°C por 5 min. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1 X y fueron cargados 12.5 µL de los productos de PCR; las muestras se corrieron con un voltaje de 120 V. Finalmente los geles se tiñeron con BrEt y se visualizaron en un transiluminador con luz UV (UVP) para el análisis de los resultados.

### Análisis filogenético

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron con el software CLC Workbench versión 7.0.3. Se seleccionaron y descargaron secuencias del análisis BLAST en NCBI con los mayores porcentajes de identidad con la secuencia de SCMV denominada JalMex-126 (KT334297) y se emplearon otras más de la misma base de datos (Cuadro 2). Para todas las muestras se realizaron PCR *in silico*, con los primers para SCMV descritos por Xie *et al.* (2009). En todas las secuencias en las que se generaron fragmentos de 720 pb, estos fueron extraídos y almacenados en una base de datos local. Las secuencias que no generaron el fragmento esperado fueron alineadas con las generadas en la base de datos. Se seleccionaron y guardaron las

Sequences of the BLAST analysis were selected and downloaded in NCBI with the highest percentages of identity with the SCMV sequence, which named JalMex-126 (KT334297) and others from the same database were used (Table 2). For all samples, PCR *in silico* were carried out with the primers for SCMV described by Xie *et al.* (2009). In all the sequences in which 720 bp fragments were produced, these were extracted and stored in a local database. The sequences that did not generate the expected fragment were aligned with those generated in the database. The aligned regions of these sequences were selected and stored. The region HC-Pro of PRSV (NC\_001785) was used as an external group. Multiple alignments of sequences were carried out using the MUSCLE algorithm, and the maximum likelihood and Neighbor-joining methods were used for the construction of the phylogenetic tree. General Time Reversible (GTR) was used as a model of substitution of nucleotides. The bootstrap analysis was carried out with 1,000 repetitions, and finally, the phylogenetic tree was edited using the software TreeGraph 2.

## RESULTS

### Symptoms

The symptoms related to the presence of SCMV were found in the foliar samples collected from sugarcane plants of different varieties in the states of Colima, Jalisco, and Nayarit, Mexico. Also, variations were observed in the mosaic patterns (Figure 2 A). Other samples with mosaics were found to have symptoms, such as white stripes in ribs, lesions from pustules, chlorosis, necrosis and corrugated leaves (Figure 2 B).

regiones alineadas de estas secuencias. Se utilizó como grupo externo la región HC-Pro del PRSV (NC\_001785). Se realizaron alineamientos múltiples de secuencias con el algoritmo MUSCLE y se empleó el método de máxima verosimilitud y Neighbor-joining para la construcción del árbol filogenético. Se utilizó “General Time Reversible” (GTR) como modelo de sustitución de nucleótidos. El análisis bootstrap se realizó con 1,000 réplicas y finalmente el árbol filogenético fue editado con el software TreeGraph 2.

## RESULTADOS

### Síntomas

Los síntomas relacionados con la presencia del SCMV se encontraron en las muestras foliares colectadas de caña de azúcar de diferentes variedades en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit, México; así mismo, se observaron variaciones en los patrones de mosaico observados (Figura 2 A). Otras muestras con mosaico también fueron detectadas con algunos síntomas como rayas blancas en nervaduras, lesiones por pústulas, clorosis, necrosis y hoja corrugada (Figura 2 B).

### Clonación de un fragmento del SCMV

El control positivo utilizado para detectar la presencia y distribución del SCMV en tres estados del Pacífico de México se obtuvo de una muestra con síntomas severos de mosaico procedente del estado de Jalisco. Se amplificó y clonó un fragmento de 720 pb; posteriormente, fueron obtenidas siete colonias recombinantes y se realizó el análisis restrictivo con *EcoR* I y *Not* I para comprobar la presencia del fragmento clonado (Figura 3), el cual finalmente fue secuenciado. El análisis BLAST de la

### Cloning a fragment of SCMV

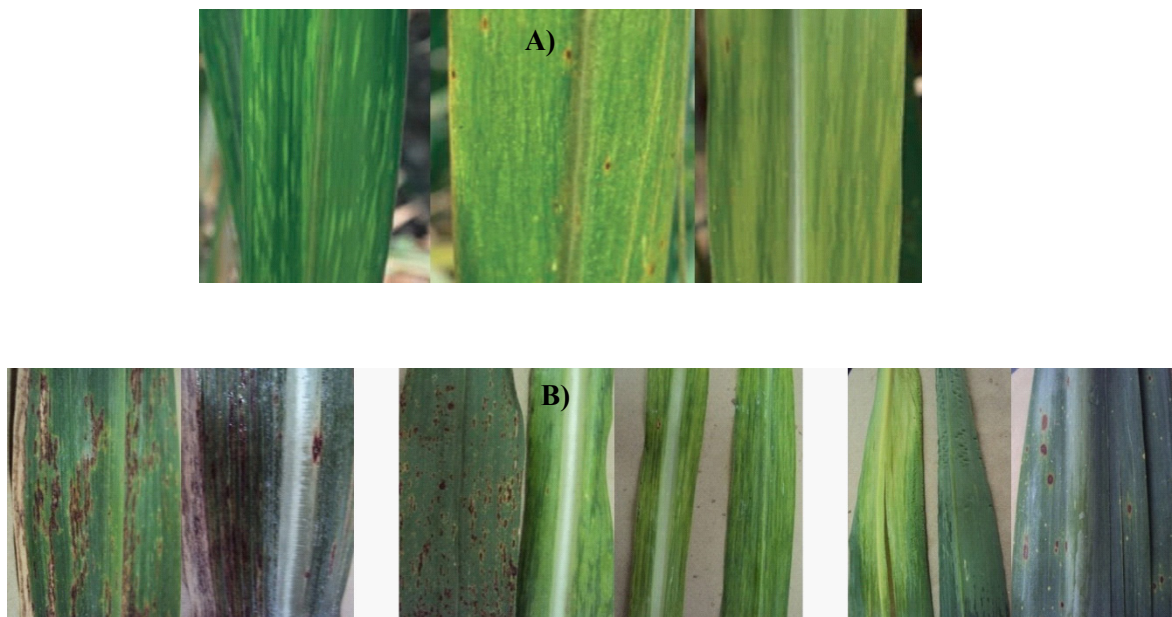
The positive control used to detect the presence and distribution of SCMV in three states of the Mexican Pacific was obtained from a sample with severe mosaic symptoms from the state of Jalisco. A 720 bp fragment was amplified and cloned; later, seven recombinant colonies were obtained and a restrictive analysis was carried out with *EcoR* I and *Not* I to verify the presence of the cloned fragment (Figure 3), which was finally sequenced. The BLAST analysis of the sequence presented an identity of up to 95% with other SCMV accessions, and was placed in the NCBI database, under registration number KT334297. The sequence was established as belonging to a partial region of the HC-Pro gene of SCMV.

### Identification and distribution of SCMV in three states of the Mexican Pacific

All the products of RT-PCR that underwent electrophoresis in agarose gel that showed the amplification of fragments of 720 bp of SCMV with the set of oligonucleotides SCMV-F1/SCMV-R1 described by Xie *et al.* (2009) were considered as positive to the virus (Figure 4). A total of 242 foliar samples of diverse, commercially planted, symptomatic and asymptomatic sugarcane varieties, were analyzed for mosaic, as well as other symptoms described earlier.

Table 1 shows the wide distribution presented by SCMV in the tropical and subtropical regions of the Mexican Pacific covered by the present study. In the state of Colima, it was found in the varieties Mex 69-290 and CP 72-2086, among many others in the experimental stage. Also, in Jalisco it affected the same two varieties, as well as Atemex 96-40. Finally, in Nayarit variety Mex 69-290 was also the most affected. Table 1 shows the 33





**Figura 2.** A) Diversidad de síntomas de mosaico en hojas de caña de azúcar. B) Diversidad de síntomas (patrón de mosaico, lesiones por pústulas, clorosis, necrosis, mancha café y hoja corrugada) en hojas de caña de azúcar positivas al SCMV por RT-PCR.

**Figure 2.** A) Diversity of the symptoms of mosaic in sugarcane leaves. B) Diversity of symptoms (mosaic pattern, lesions from pustules, chlorosis, necrosis, brown stain, and corrugated leaf) in sugarcane leaves that tested positive for SCMV using RT-PCR.

secuencia presentó hasta un 95% de identidad con otras accesiones de SCMV y fue depositada en la base de datos de NCBI con el registro KT334297. Se determinó que la secuencia corresponde a una región parcial del gen HC-Pro del SCMV.

### Identificación y distribución del SCMV en tres estados del Pacífico de México

Todos los productos de RT-PCR sometidos a electroforesis en gel de agarosa que mostraron la amplificación de fragmentos de 720 pb del SCMV con el juego de oligonucleótidos SCMV-F1/SCMV-R1 descritos por Xie *et al.* (2009) fueron considerados como positivos al virus (Figura 4). En total se analizaron 242 muestras foliares de diversas variedades de caña de azúcar sembradas comercialmente, sintomáticas y asintomáticas para

sugarcane plants that tested positive for SCMV and their geographic origin, corresponding to 13.63% of the total of plants analyzed. The varieties with the most severe viral symptoms and that tested positive for SCMV were Mex 69-290, CP 72-2086 and Atemex 96-40. Some samples presented clear mosaic symptoms, although they tested negative for the presence of the virus by RT-PCR.

### Phylogenetic origin

The phylogenetic analysis with the partial sequence HC-Pro of SCMV from Jalisco and other similar sequences from other countries is shown in Figure 5. The formation of two groups is observed, the first of which includes two sequences from Mexico, EU091075 and GU474635, whose percentages of identity with JalMex-126



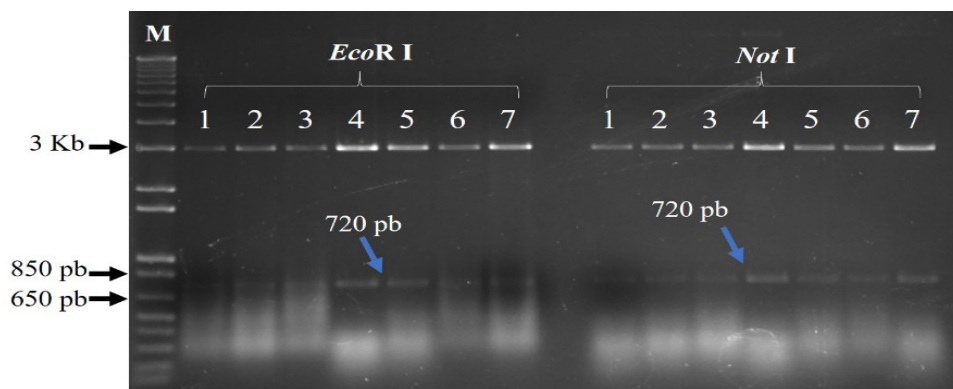


Figura 3. Digestión enzimática con *EcoR I* y *Not I* para liberación del inserto de 720 pb del fragmento parcial HC-Pro de SCMV clonado en el vector pGEM T Easy (Promega). 1-7: DNA plasmídico de colonias de *E. coli* recombinantes. M: Marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Figure 3. Enzyme digestion with *EcoR I* and *Not I* for the release of the insert of 720 bp of the partial fragment HC-Pro of SCMV cloned in the vector pGEM T Easy (Promega). 1-7: plasmid DNA of recombinant *E. coli* colonies. M: Molecular weight marker 1 Kb plus (Invitrogen).

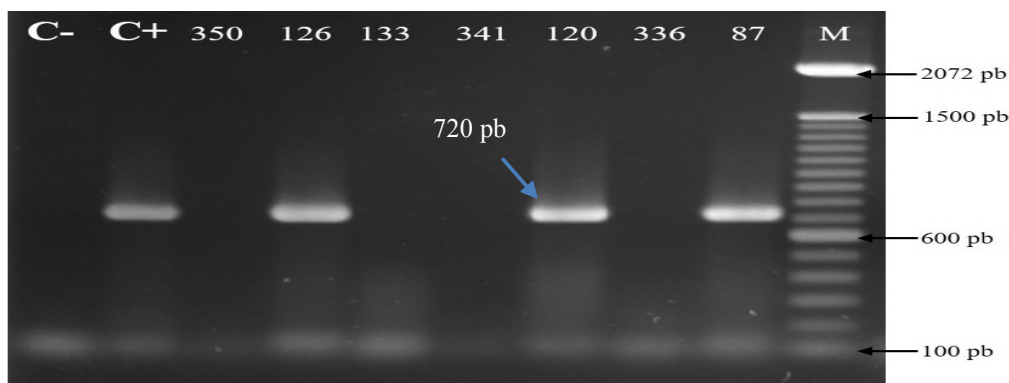


Figura 4. Detección del *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) mediante RT-PCR en muestras de caña de azúcar procedentes de tres estados del Pacífico mexicano. C-: control negativo ( $H_2O$ ). C+: Control positivo (DNA plasmídico). M: Marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Los números corresponden a diferentes muestras analizadas.

Figure 4. Detection of the *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) by RT-PCR in sugarcane samples from three states of the Mexican Pacific. C-: negative control ( $H_2O$ ). C+: Positive control (plasmid DNA). M: Molecular weight marker 100 pb (Invitrogen). Numbers correspond to different samples analyzed.

mosaico; además de la presencia de otros síntomas descritos anteriormente.

En el Cuadro 1 se observa la amplia distribución que presenta el SCMV en las regiones tropicales y subtropicales del Pacífico de México que abarcó el presente estudio. En el estado de Colima se detectó en las variedades Mex 69-290 y CP 72-2086, entre otras más en etapa experimental. De igual manera, en

(isolate from this study) were 80.39 and 79.28%, respectively. This group also included another two sequences from China and Germany. In the second group is JalMex-126, along with two sequences from India, one from Australia, two from China, and one from Argentina, with which it shares identity percentages of between 92.5-95.14%, and therefore the viruses of this group may have a common

**Cuadro 1. Relación de muestras de follaje de caña de azúcar positivas al SCMV mediante RT-PCR en la región cañera del Pacífico de México.****Table 1. List of sugarcane foliage samples that tested positive for SCMV by RT-PCR in the sugarcane-producing region of the Mexican Pacific.**

| No. | Muestra | Estado  | Municipio           | Georeferencia                  | Variedad              |
|-----|---------|---------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1   | 87      | Colima  | Colima              | N 19°11'33.0" W 103°43'15.4"   | CP 72-2086            |
| 2   | 88      | Colima  | Colima              | N 19°09'43.6" W 103°43'14.0"   | CP 72-2086            |
| 3   | 35      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°24'34.14" W 103°38'19.79" | Mex 69-290            |
| 4   | 82      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°22'36.61" W 103°33'37.49" | CP 72-2086            |
| 5   | 90      | Colima  | Cuauhtémoc          | N 19°22'09.12" W 103°34'49.81" | CP 72-2086            |
| 6   | 148     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'36.24" W 103°52'1.49"  | CP 72-2086            |
| 7   | 336     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'40.12" W 103°51'50.62" | CP 72-2086            |
| 8   | 23      | Colima  | Tecomán             | N 18°56'37.4" W 103°46'26.03"  | Mex 69-290            |
| 9   | 33      | Colima  | Tecomán             | N 18°48'33.23" W 103°50'37.89" | Mex 69-290            |
| 10  | 146     | Colima  | Tecomán             | N 18°57'57.26" W 103°50'22.01" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 11  | 2       | Colima  | Tecomán             | N 18°56'06.52" W 104°00'03.54" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 12  | 37      | Colima  | Tecomán             | N 18°48'32.91" W 103°50'33.48" | Mex 69-290            |
| 13  | 133     | Colima  | Tecomán             | N 18°52'37.61" W 103°51'57.66" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 14  | 387     | Colima  | Tecomán             | N 18°57'56.03" W 103°50'22.02" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 15  | 350     | Jalisco | Autlán              | N 19°45'07.23" W 104°19'36.69" | Mex 69-290            |
| 16  | 342     | Jalisco | Cuautitlán          | N 19°26'49.58" W 104°24'10.45" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 17  | 344     | Jalisco | Cuautitlán          | N 19°26'54.74" W 104°23'40.70" | Mex 79-431            |
| 18  | 355     | Jalisco | El Grullo           | N 19°48'49.81" W 104°14'35.95" | Mex 69-290            |
| 19  | 349     | Jalisco | El Grullo           | N 19°47'44.20" W 104°13'38.63" | Atemex 96-40          |
| 20  | 413     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'07.39" W 104°32'11.61" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 21  | 341     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'08.14" W 104°32'11.61" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 22  | 369     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'11.23" W 104°32'10.97" | <i>Saccharum</i> spp. |
| 23  | 340     | Jalisco | La Huerta           | N 19°31'05.15" W 104°32'06.51" | Atemex 96-40          |
| 24  | 114     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'43.00" W 103°24'31.01" | Atemex 96-40          |
| 25  | 120     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.90" W 103°24'29.40" | Atemex 96-40          |
| 26  | 125     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'24.12" W 103°25'03.64" | CP 72-2086            |
| 27  | 110     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'27.25" W 103°25'04.85" | CP 72-2086            |
| 28  | 113     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.9" W 103°24'29.7"   | Atemex 96-40          |
| 29  | 126     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.68" W 103°24'30.04" | Atemex 96-40          |
| 30  | 123     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.31" W 103°24'31.21" | Atemex 96-40          |
| 31  | 138     | Jalisco | Zapotiltic          | N 19°38'42.58" W 103°24'31"    | Atemex 96-40          |
| 32  | 186     | Nayarit | Santa María del Oro | N 21°17'56.3" W 104°32'14.9"   | Mex 69-290            |
| 33  | 170     | Nayarit | Xalisco             | N 21°27'50.1" W 104°53'11.4"   | <i>Saccharum</i> spp. |

Jalisco se presentó afectando a las mismas dos variedades, además de la Atemex 96-40. Finalmente, en Nayarit también la variedad Mex 69-290 fue la más afectada. En el cuadro 1 se muestra la relación de 33 plantas que resultaron positivas al SCMV y su origen geográfico, lo que representa un 13.63% del total analizado. Las variedades con síntomas

genetic origin. For both groups, the geographic origins of the isolates were very diverse. The main difference between these two groups formed lies in the type of virus host. The viral sequences of the first group had maize plants as hosts, except for the isolate from Germany, whose host is unknown. The rest of the HC-Pro sequences of SCMV that made

más severos de virosis y que resultaron positivas al SCMV fueron Mex 69-290, CP 72-2086 y Atemex 96-40. Algunas muestras presentaron síntomas claros de mosaico, sin embargo, resultaron negativas a la presencia del virus mediante RT-PCR.

### Origen filogenético

El análisis filogenético con la secuencia parcial HC-Pro del SCMV de Jalisco y otras secuencias similares de otros países se muestra en la Figura 5. Se observa la formación de dos grupos, el primero incluye dos secuencias de México, EU091075 y GU474635 cuyos porcentajes de identidad con Jal-Mex-126 (aislado de este estudio) fueron de 80.39 y 79.28%, respectivamente; en este grupo también se incluyeron otras dos secuencias procedentes de China y Alemania. En el segundo grupo se encuentra la secuencia JalMex-126, junto con dos secuencias de la India, una de Australia, dos de China y

up the second group come from diverse hybrids and sugarcane species (Table 2).

### DISCUSSION

The variety of symptoms present in the analyzed samples, combined with mosaic patterns, are possibly due to mixed infections with fungi, since some of the symptoms observed are from diseases such as brown spot, common rust, pokkah boeng, the causal agents of which are *Cercospora longipes*, *Puccinia melanocephala* and *Gibberella fujikuroi*, respectively (Raid and Comstock, 2000; Sauntally and Sullivan, 2000; Whittle and Irawan, 2000). However, molecular tests must be carried out to confirm the identity of these causal agents. On the other hand, according to Xie *et al.* (2009), the mosaic disease is caused by a complex of three viruses: the SCMV, the *Sorghum mosaic virus*

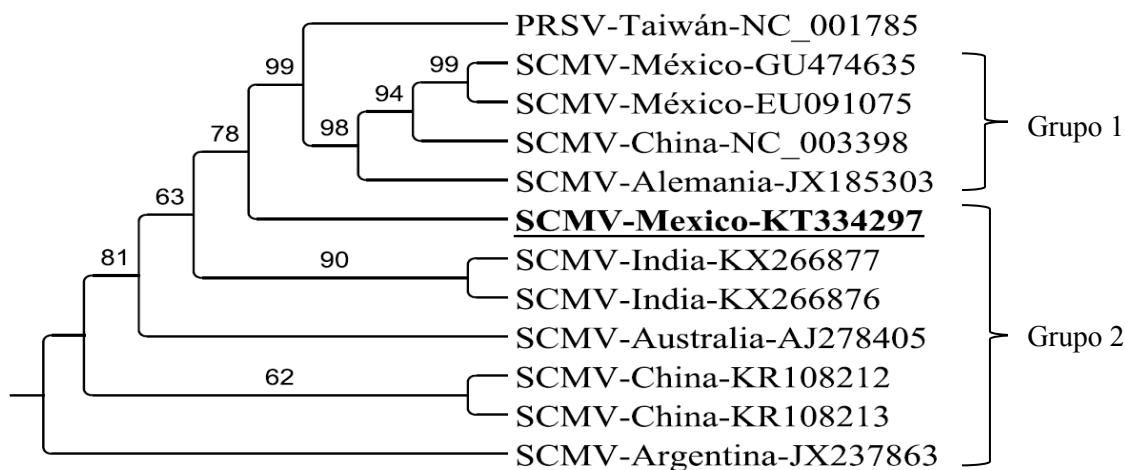


Figura 5. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor-joining y máxima verosimilitud utilizando secuencias parciales del fragmento HC-Pro del SCMV. Las ramas con valores de bootstrap menores a 50% fueron colapsadas. Se utilizó como grupo externo al *Papaya ringspot virus* (PRSV). En negritas y subrayado se resalta el aislado de este estudio.

Figure 5. Phylogenetic tree based on the Neighbor-joining and maximum likelihood methods using partial sequences of the fragment HC-Pro of SCMV. Branches with bootstrap values below 50% were collapsed. The *Papaya ringspot virus* (PRSV) was used as an external group. The isolate of this study is highlighted in bold letters and underlined.

una de Argentina, con las que comparte porcentajes de identidad de entre 92.5-95.14%, por lo que los virus de este grupo podrían tener un origen genético común. Para ambos grupos, los orígenes geográficos de los aislados fueron muy diversos; la principal diferencia entre estos dos grupos que se formaron radica en el tipo de hospedero del virus. Las secuencias virales del primer grupo tuvieron como hospederos a plantas de maíz, exceptuando al aislado de Alemania cuyo hospedero se desconoce. El resto de secuencias de HC-Pro del SCMV que formaron el segundo grupo son provenientes de diversos híbridos y especies de caña de azúcar (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

La diversidad de síntomas presentes en las muestras analizadas combinados con patrones de mosaico, posiblemente se deban a infecciones mixtas con hongos, ya que algunos de los síntomas observados corresponden a enfermedades como mancha café, roya café y pokkah boeng, cuyos agentes causales son *Cercospora longipes*, *Puccinia*

(SrMV) and the *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV), the last two of which have not been reported as affecting sugarcane in Mexico. The fact that samples with mosaic characteristics turned out negative for the RT-PCR test for SCMV in this study may be due to its symptoms being related with the presence of some of the viruses mentioned earlier (Grisham, 1994; Xie *et al.*, 2009), or those samples with severe mosaics and positive to SCMV may contain mixed viral infections. Recently, Balarabe *et al.* (2014) mentioned that the *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) and the *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) cause mosaic disease in sugarcane in Nigeria. To this day, the presence of the SrMV has been confirmed in the United States, China, and Vietnam (Yang and Mirkov, 1997; Grisham and Pan, 2007; Ha *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016), whereas SCSMV is limited to the sugarcane producing areas of the Asian continent (Hall *et al.*, 1998; Hema *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2006). However, due to the proximity of Mexico to the United States, it is likely that SrMV is infecting sugarcane plants in our country.

The detection of SCMV by RT-PCR in this study confirms its wide distribution in the sugarcane

**Cuadro 2. Secuencias parciales del fragmento HC-Pro del SCMV obtenidas de la base de datos de NCBI y utilizadas en este estudio para el análisis filogenético.**

**Table 2. Partial sequences of the fragment HC-Pro of SCMV obtained from the NCBI database and used in this study for the phylogenetic analysis.**

| No. | Nombre del aislado | Origen    | Hospedero                                 | Año  | No. Acceso |
|-----|--------------------|-----------|-------------------------------------------|------|------------|
| 1   | JalMex-126         | México    | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Atemex 96-40) | 2015 | KT334297   |
| 2   | Brisbane           | Australia | <i>Saccharum</i> spp.                     | 2005 | AJ278405   |
| 3   | FZ-C1              | China     | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Badila)       | 2014 | KR108212   |
| 4   | CBTCT-Seng         | India     | <i>Saccharum sinense</i>                  | 2014 | KX266877   |
| 5   | ARG-915            | Argentina | <i>Saccharum</i> spp.                     | 2007 | JX237863   |
| 6   | FZ-C2              | China     | <i>Saccharum</i> spp. (Var. Badila)       | 2014 | KR108213   |
| 7   | CBMungo            | India     | <i>Saccharum barberi</i>                  | 2014 | KX266876   |
| 8   | JAL-1              | México    | <i>Zea mays</i>                           | 2010 | GU474635   |
| 9   | SCMV-VER1          | México    | <i>Zea mays</i>                           | 2011 | EU091075   |
| 10  | Seehausen          | Alemania  | -                                         | 2012 | JX185303   |
| 11  | SCMVgp1            | China     | <i>Zea mays</i>                           | 2015 | NC_003398  |

*melanocephala* y *Gibberella fujikuroi*, respectivamente (Raid y Comstock, 2000; Saumtally y Sullivan, 2000; Whittle e Irawan, 2000); sin embargo, se deben realizar las pruebas moleculares para confirmar la identidad de estos agentes causales. Por otra parte, según Xie *et al.* (2009) la enfermedad del mosaico es ocasionada por un complejo de tres virus: SCMV, *Sorghum mosaic virus* (SrMV) y *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV), de los cuales los últimos dos no se han reportado afectando a caña de azúcar en México. Probablemente las muestras con características de mosaico que resultaron negativas a la prueba de RT-PCR para detectar SCMV en el presente estudio se deba a que sus síntomas estén asociados con la presencia de alguno de los virus antes mencionados (Grisham, 1994; Xie *et al.*, 2009), o incluso aquellas muestras con mosaicos severos y positivas al SCMV contengan infecciones virales mixtas. Recientemente Balarabe *et al.* (2014) mencionan que también el *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) y el *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) son responsables de la enfermedad del mosaico en caña de azúcar en Nigeria. Hasta el momento se ha reportado la presencia del SrMV en Estados Unidos, China y Vietnam (Yang y Mirkov, 1997; Grisham y Pan, 2007; Ha *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016), mientras que el SCSMV está limitado para las zonas cañeras del continente asiático (Hall *et al.*, 1998; Hema *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la cercanía de Estados Unidos con México sería muy probable que el SrMV se encuentre infectando a las plantas de caña de azúcar en nuestro país.

La detección del SCMV por RT-PCR en este estudio confirma su amplia distribución en las zonas cañeras de la región del Pacífico de México. El virus incluso está presente en el continente europeo, donde no se cultiva caña de azúcar, debido a la cantidad de especies vegetales que pueden servir como reservorios del mismo (Dallwitz, 1980; Dallwitz *et*

growing areas of the Mexican Pacific region. The virus is even present in the European continent, due to the amount of plant species that can act as reservoirs for it (Dallwitz, 1980; Dallwitz *et al.*, 1993; Brunt *et al.*, 1996). In Mexico, varieties Mex 69-290 and CP-72-2086, not only cover 50% of the area planted with sugarcane, but have also been in use for over 30 years, which has led to the genetic deterioration of the materials, leading, with time, to susceptibility to several diseases, including viral diseases. Also, its vegetative reproduction characteristics (seed-stake), as well as the presence of vector aphids *Melanaphis sacchari* and *Rhopalosiphum maidis* (Figueredo *et al.*, 2004) have promoted the dispersion of the virus.

Several reports have identified the presence of SCMV in various countries (Smith and Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Sawazaki *et al.*, 2013). This study was based on the work described by Xie *et al.* (2009) for the standardization of the method of detection for RT-PCR. However, despite the molecular diagnosis techniques being more sensitive than serological methods, the latter are less expensive and easier to use when a higher number of samples must be processed (Gonçalves *et al.*, 2007; Balarabe *et al.*, 2014). In Mexico, the SCMV is viewed as the only causal agent of the mosaic disease, although there are no solid reports or with scientific validity to sustain these facts, since information on the presence of the virus in the country go back to 1930-1950, and have also been based on the typical symptoms of the disease (CONADESUCA, 2015), which is not conclusive. Studies related to the SCMV in Mexico have focused on maize (Espejel *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011; Chaves and Ortiz, 2012). Chaves *et al.* (2011) obtained one isolate of SCMV in maize in the state of Veracruz and they used the sugarcane varieties CP 72-2086 and MY 44-12 as reference genotypes to inoculate



*al.*, 1993; Brunt *et al.*, 1996). En México, las variedades Mex 69-290 y CP-72-2086, además de representar más del 50% del área cultivada con caña de azúcar, tienen más de 30 años de uso, lo que ha conllevado al deterioro genético de los materiales que con el tiempo han presentado susceptibilidad a diversas enfermedades, incluidas las virales. Además, sus características de multiplicación vegetativa (semilla-estaca), así como la presencia de los áfidos vectores *Melanaphis sacchari* y *Rophalosiphum maidis* (Figueredo *et al.*, 2004) han favorecido la dispersión del virus.

Hay varios reportes que han identificado la presencia del SCMV en varios países (Smith y Van de Velde, 1994; Xie *et al.*, 2009; Filippone *et al.*, 2010; Sawazaki *et al.*, 2013). El presente estudio se basó en el trabajo descrito por Xie *et al.* (2009) para la estandarización del método de detección mediante RT-PCR; sin embargo, a pesar de que las técnicas de diagnóstico molecular tienen mayor sensibilidad que los métodos serológicos, estos últimos son más económicos y factibles de utilizar cuando se deben procesar un elevado número de muestras (Gonçalves *et al.*, 2007; Balarabe *et al.*, 2014). En México, se atribuye al SCMV como único agente causal de la enfermedad del mosaico; sin embargo, no existen reportes sólidos o con validez científica para sostener estos hechos debido a que la información que se tiene sobre la presencia del virus en el país datan desde los años 1930-1950, además de que se han basado en la sintomatología típica de la enfermedad (CONADESUCA, 2015), lo cual no es concluyente. En México, los estudios relacionados con el SCMV se han centrado en el cultivo del maíz (Espejel *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2011; Chaves y Ortiz, 2012). Chaves *et al.* (2011) obtuvieron un aislado del SCMV de maíz en el estado de Veracruz y utilizaron las variedades de caña de azúcar CP 72-2086 y MY 44-12 como genotipos de referencia para inocular el virus en la lámina foliar tanto

the virus in the leaf of both maize and sugarcane to determine the movement of SCMV-Ver1. Due to this, the present paper represents the first study focused on sugarcane to determine the presence and distribution of SCMV in the sugarcane producing area of the Mexican Pacific. Finally, it is worth pointing out that in Mexico, there is a need for more studies that quantify the damage caused by the sugarcane mosaic disease, since most farmers or the agroindustry are unaware of the economic impact it could have on the crop.

Regarding the phylogenetic origin of the isolation JalMex-126, results indicate that it could have a common genetic origin with isolations from India, Australia, China and Argentina, which suggests deficiencies in the phytosanitary control during the exchange of germplasm, which is very common due to the type of seed-stake reproduction in sugarcane. However, due to the number of HC-Pro sequences of SCMV, it is very reduced in the NCBI data base in comparison with the CP sequences, it was not possible to relate the origin of the Mexican isolation with important sugarcane producing countries such as Brazil, United States, Colombia, and others. In this study we obtained the formation of two groups based on partial HC-Pro sequences of SCMV, and this same tendency was previously reported by Chaves and Ortiz (2012) and Xie *et al.* (2016), using CP sequences of SCMV. Similarly, these authors coincide in that the formation of these groups is related to the hosts of SCMV: sugarcane and maize, mainly.

According to Chaves and Ortiz (2012), Mexican isolate JAL-1, with access number GU474635 has a higher phylogenetically proximity to SCMV isolates from Brazil and the United States, while CP sequences reported in China and Germany are phylogenetically nearer to the Mexican isolation SCMV-VER1, with access number EU091075. In this study, the Mexican isolates mentioned

de maíz como caña para determinar el movimiento del SCMV-Ver1. Por lo anterior, el presente trabajo representa el primer estudio centrado en caña de azúcar para detectar la presencia y distribución del SCMV en la zona cañera del Pacífico mexicano. Finalmente, cabe destacar que, en México, hacen falta estudios que cuantifiquen el daño ocasionado por la enfermedad del mosaico en caña de azúcar ya que la mayor parte de los productores y la agroindustria desconocen el impacto económico que podrían tener en el cultivo.

Con respecto al origen filogenético del aislado JalMex-126, los resultados indican que podría tener un origen genético común con aislados de India, Australia, China y Argentina, lo que sugiere deficiencias en el control fitosanitario durante el intercambio de germoplasma, lo cual es muy común por el tipo de reproducción de semilla-estaca en caña de azúcar. Sin embargo, debido a que el número de secuencias HC-Pro del SCMV es muy reducido en la base de datos de NCBI a comparación del número de secuencias CP, no fue posible relacionar el origen del aislado mexicano con países cañeros importantes como Brasil, Estados Unidos, Colombia, entre otros. En este estudio se obtuvo la formación de dos grupos basados en secuencias parciales HC-Pro de SCMV, esta misma tendencia fue reportada previamente por Chaves y Ortiz (2012) y Xie *et al.* (2016), utilizando secuencias CP de SCMV. De forma similar, estos autores coinciden que la formación de estos grupos está asociada con los hospederos que tiene el SCMV: caña de azúcar y maíz, principalmente.

Según Chaves y Ortiz (2012), el aislado mexicano JAL-1 con número de acceso GU474635 es filogenéticamente más cercano a aislados de SCMV de Brasil y Estados Unidos, mientras que secuencias de la CP del SCMV reportadas en China y Alemania son filogenéticamente más cercanas al aislado mexicano SCMV-VER1 con número de acceso

above were closely related and they grouped with sequences from China and Germany, composing group 1. On the other hand, Moradi *et al.* (2017), also contemplated in their analysis the same two Mexican sequences of SCMV and placed them in two different groups. Due to the above, there may be a need to include more HC-Pro sequences of SCMV into the phylogenetic analysis to observe a similar tendency to those reported by these authors.

## CONCLUSIONS

The RT-PCR tests carried out on symptomatic and asymptomatic vegetative sugarcane material helped identify the presence of SCMV in the states of Colima, Jalisco, and Nayarit. This virus is widely distributed in the sugarcane areas of western Mexico, probably due to the presence of vector aphids and the propagation of potentially infected stake seed. The phylogenetic analysis using partial HC-Pro sequences from the SCMV isolate JalMex-126 helped identify two groups, the first of which had maize plants as host, and the second, with host plants of different species and sugarcane hybrids. Isolate JalMex-126 of this study may probably share common genetic origins with isolates from India, Australia, China, and Argentina.

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

EU091075. En este estudio, los aislados mexicanos antes mencionados estuvieron estrechamente relacionados y se agruparon con secuencias de China y Alemania, conformando el grupo uno. Por otra parte, Moradi *et al.* (2017), también contemplaron en su análisis las mismas dos secuencias mexicanas de SCMV y las colocaron en dos grupos diferentes.

Por lo anterior, es probable que haga falta incluir más secuencias HC-Pro del SCMV al análisis filogenético para observar una tendencia similar a la reportada por estos autores.

CONCLUSIONES

Las pruebas de RT-PCR realizadas a material vegetativo sintomático y asintomático de caña de azúcar permitieron identificar la presencia del SCMV en los estados de Colima, Jalisco y Nayarit. Este virus se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras del Occidente de México, probablemente por la presencia de áfidos vectores y la propagación por semilla estaca potencialmente infectada. El análisis filogenético utilizando secuencias parciales HC-Pro del aislado de SCMV JalMex-126 permitieron identificar dos grupos, el primero que tuvo como hospederos a plantas de maíz y el segundo con plantas hospederas de diferentes especies e híbridos de caña de azúcar. El aislado JalMex-126 de este estudio es probable que comparta un origen genético común con aislados de India, Australia, China y Argentina.

LITERATURA CITADA

- Balarabe DD, Adama Y, Azmat KUU, Aisha ZM. 2014. Identification of virus isolates inducing mosaic of sugarcane in Makarfi local government area of Kaduna state, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 13:1351-1357. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13467>
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (eds). 1996. *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 16th January 1997. Disponible en línea: <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/videl/> (Consulta, julio de 2017).
- Chaves BG, Espejel F, Alcalá BRI, Hernández VJ, Silva RS. 2011. Short distance movement of genomic negative strands in a host and nonhost for *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). *Virology Journal* 8:15. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-15>
- Chaves BG, Ortiz RLY. 2012. Evidencia de orígenes filogenéticos diferentes de dos aislamientos mexicanos del virus del mosaico de la caña de azúcar (SCMV). *Acta Agronómica* 61:79-87. Disponible en línea: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/32464
- CONADESUCA, Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. 2015. *Fitopatologías*. <http://www.conadesuca.gob.mx> (Consulta, junio de 2016).
- Dallwitz MJ 1980. A general system for coding taxonomic descriptions. *Taxon* 29:41-46. <http://delta-intkey.com/www/dallwitz-1980.htm>
- Dallwitz MJ, Paine TA, Zurcher EJ. 1993. User's Guide to the DELTA System: a general system for processing taxonomic descriptions. <http://delta-intkey.com/www/uguide.htm>
- Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. 2001. Minipreps of Plasmid DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. 15:II:1.6.1-1.6.10. DOI: 10.1002/0471142727.mb0106s15
- Espejel F, Jeffers D, Noa CJC, Ruiz CS, Silva RL. 2006. Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of *Sugarcane mosaic virus* and its infectivity in maize and sugarcane plants. *Archives of Virology* 151:409-412. DOI: 10.1007/s00705-005-0645-3
- Figueredo L, Hernández L, Linares B. 2004. Relación epidemiológica entre áfidos (Homoptera: Aphididae) y enfermedades virales en el cultivo caña de azúcar en los valles de los ríos Turbio y Yaracuy, Venezuela. *Caña de azúcar* 22:5-19.
- Filippone MP, Perera MF, Salgado M, García MG, Vellicce GR and Castagnaro P. 2010. Diagnóstico molecular de enfermedades sistémicas de la caña de azúcar en la Argentina: ajuste metodológico y aplicaciones. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 87:1-11. Disponible en línea: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1851-30182010000200001
- Gonçalves MC, Pinto LR, Souza SC and Landell MGA. 2012. Virus diseases of sugarcane. A constant challenge to sugarcane breeding in Brazil. *Functional Plant Science and Biotechnology* 6:108-116. Disponible en línea: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2012/FPSB_6\(SI2\)/FPSB_6\(SI2\)108-116o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOonline/images/2012/FPSB_6(SI2)/FPSB_6(SI2)108-116o.pdf)
- Gonçalves MC, Santos AS, Maia IG, Chagas CM and Harakava R. 2007. Characterization of an isolate of *Sugarcane mosaic virus* breaking down resistance of commercial sugarcane varieties. *Fitopatologia Brasileira* 32:32-39. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000100004>
- Grisham MP and Pan YB. 2007. A genetic shift in the virus strains that cause mosaic in Louisiana sugarcane. *Plant Disease* 91: 453-458. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-4-0453>
- Grisham MP. 1994. Strains of *Sorghum mosaic virus* causing sugarcane mosaic in Louisiana. *Plant Disease* 78:729-732. Disponible en línea: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n07_729.pdf
- Grisham MP. 2000. Mosaic. Pp 249-254. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Ha C, Revill P, Harding RM, Vu M and Dale JL. 2008. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. *Archives of Virology* 153:45-60. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-1067-1>

- Hall JS, Adams B, Parsons TJ, French R, Lane LC and Jensen SG. 1998. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic relationships of a new potyvirus: *Sugarcane streak mosaic virus* and a reevaluation of the classification of the Potyviridae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:323-332. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0535>
- Hema M, Joseph J, Gopinath K, Sreenivasulu P and Savithri HS. 1999. Molecular characterization and intervirul relationships of a flexuous filamentous virus causing mosaic disease of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in India. *Archives of Virology* 144:479-490. Disponible en línea: <http://studylib.net/doc/13774806/molecular-characterization-and-interviral-relationships>
- Koike H, Guillaspie AG. 1989. Mosaic. Pp 287-288. In: C Ricaud, BT Egan, AG Gillaspie Jr, CG Hughes (eds). *Disease of sugarcane. Major Disease*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 387p.
- Moradi Z, Nazifi E and Mehrvar M. 2017. Occurrence and evolutionary analysis of coat protein gene sequences of Iranian isolates of *Sugarcane mosaic virus*. *The Plant Pathology Journal* 33:296-306. DOI:10.5423/PPJ.OA.10.2016.0219
- Raid RN, Comstock JC. 2000. Common rust. Pp 85-89. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Rao GP, Chatenet M, Girard JG and Rott P. 2006. Distribution of sugarcane mosaic and *Sugarcane streak mosaic virus* in India. *Sugar Technology* 8:79-81. <https://doi.org/10.1007/BF02943747>
- Riley SP, Woodman ME and Stevenson B. 2008. Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 00:4.2:4.2.1-4.2.25. DOI: 10.1002/9780470089941.et0402s00
- Saumtally AS and Sullivan S. 2000. Brown spot. Pp 77-80. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Sawazaki HE, Nogueira SLA, Gonçalves CRNCB, Arruda VRF and Colombo CA. 2013. Molecular diagnosis optimization of virus, bacteria and fungi in sugarcane. *International Research Journal of Plant Science* 4:76-83. Disponible en línea: <http://www.interesjournals.org/IRJPS>
- Singh M, Singh A, Upadhyaya PP and Rao GP. 2005. Transmission studies on an Indian isolate of sugarcane mosaic potyvirus. *Sugar Technology* 7:32-38. <https://doi.org/10.1007/BF02942526>
- Singh V, Sinha OK and Kumar R. 2003. Progressive decline in yield and quality of sugarcane due to sugarcane mosaic virus. *Indian Phytopathology* 56:500-502.
- Smith GR and Van de Velde R. 1994. Detection of *Sugarcane mosaic virus* and *Fiji disease virus* in diseased sugarcane using the polymerase chain reaction. *Plant Disease* 78:557-561. Disponible en línea: http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Articles/PlantDisease78n06_557.pdf
- Viswanathan R, Balamuralikrishnan M and Karuppaiah R. 2008. Characterization and genetic diversity of *Sugarcane streak mosaic virus* causing mosaic in sugarcane. *Virus Genes* 36(3):553-564. DOI:10.1007/s11262-008-0228
- Whittle PJJ and Irawan. 2000. Pokkah boeng. Pp 136-140. In: P Rott, RA Bailey, JC Comstock, BJ Croft, AS Saumtally (eds). *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD Publications Service. Montpellier, France. 339p.
- Xie J, Wang M, Xu D, Li R and Zhou G. 2009. Simultaneous detection and identification of four sugarcane viruses by one-step RT-PCR. *Journal of virological methods* 162:64-68. Disponible en línea: <https://docslide.net/documents/simultaneous-detection-and-identification-of-four-sugarcane-viruses-by-one-step.html>
- Xie X, Chen W, Fu Q, Zhang P, An T, Cui A, An D. 2016. Molecular Variability and Distribution of *Sugarcane Mosaic Virus* in Shanxi, China. *PLoS ONE* 11: e0151549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151549>
- Xu DL, Park JW, Mirkov TE and Zhou GH. 2008. Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in southern China. *Archives of Virology* 153:1031-1039. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0072-3>
- Yang ZN and Mirkov TE. 1997. Sequence and relationships of sugarcane mosaic and *Sorghum mosaic virus* strains and development of RT-PCR-based RFLPs for strain discrimination. *Phytopathology* 87(9):932-939. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18945064>
- Zhang YL, Pennerman KK, Wang H and Yin G. 2016. Characterization of a *Sorghum mosaic virus* (SrMV) isolate in China. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23:237-242. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.02.013>

Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines

Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía

Alma Sánchez-Bautista, Carlos De León-García de Alba, Sergio Aranda-Ocampo*, Emma Zavaleta-Mejía, Cristian Nava-Díaz, Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carretera México- Texcoco. Montecillo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México; **Paul H. Goodwin,** Department of Plant Pathology, School of Environmental Sciences, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, Ontario, N1G 2W1, Canada; **Santos G. Leyva-Mir,** Laboratorio de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, CP. 56230, Texcoco, Estado de México. *Autor para correspondencia: saranda@colpos.mx.

Recibido: 10 de Octubre, 2017.

Aceptado: 07 de Diciembre, 2017.

Sánchez-Bautista A, De León-García de Alba C, Aranda-Ocampo S, Zavaleta-Mejía E, Nava-Díaz C, Goodwin PH, Leyva-Mir SG. 2017. Root endophyte bacteria in drought-tolerant and drought-susceptible maize lines. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 35-55.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-3

Primera publicación DOI: 1 de Enero, 2018.

First DOI publication: January 1, 2018.

Resumen. El maíz (*Zea mays*) ocupa el segundo lugar como alimento en el mundo y la sequía limita su productividad. Las plantas albergan bacterias endófitas que influyen en la sanidad y tolerancia a la sequía. El objetivo de esta investigación fue estimar la densidad y diversidad de las bacterias endófitas cultivables de la raíz en siete líneas homocigóticas de maíces tolerantes y siete susceptibles a sequía en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo. La densidad y diversidad de las

Abstract. Maize (*Zea mays*) ranks second as food in the world and drought limits its productivity. Plants harbor endophytic bacteria that influence health and drought tolerance. The goal of this research was to estimate the density and diversity of cultivable endophyte bacteria from the root system of seven homozygous maize drought-tolerant and seven drought-susceptible lines in three locations of Mexico during three crop cycles. The density and diversity of bacterial populations was assessed by direct counting on plates and identified by PCR. The results identified three groups of endophytic bacteria: 1) highly frequent (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), 2) frequent (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*) y 3) low frequency (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*). The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences ($p \leq 0.05$) in density ($_{\text{Log}_{10}} \text{CFU g}^{-1} \text{ root}$) of population by location, crop cycle, days after sowing and

poblaciones bacterianas se evaluó mediante conteo directo en placas y se identificaron por PCR. Los resultados identificaron tres grupos de bacterias endófitas: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*) y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*). El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la densidad ($_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ de raíz) de población por localidad, ciclo de cultivo, días después de siembra y líneas de maíz. La densidad de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas hibiscola* en la localidad de El Batán y *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti* en Tlaltizapán, fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía.

Palabras clave: *Zea mays*; bacterias endofíticas; diversidad bacteriana; 16S rADN.

El maíz (*Zea mays*) es actualmente el segundo cultivo alimenticio más importante en términos de fuentes de energía y un contenido de proteína de aproximadamente 9.2% en la nutrición humana (FAO, 2016). México ocupa el séptimo lugar en producción del cereal con aproximadamente 25 millones de toneladas al año (FIRA, 2016). La productividad de esta gramínea se limita por factores bióticos por varias plagas y enfermedades y abióticos como sequía, deficiencia de nutrientes, salinidad y altas temperaturas (Grover *et al.*, 2007). La sequía es el término meteorológico para la escasez de agua y es uno de los factores ambientales de estrés más importantes que afectan la germinación, vigor de la planta y productividad de los cultivos agrícolas (Kamara *et al.*, 2003; Wilkinson y Davies, 2010) y una posible alternativa para hacer frente a este

maize lines. The density of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas hibiscola* at El Batán and *Bacillus megaterium*, *Sinorhizobium meliloti* in Tlaltizapán, were significantly higher in drought-tolerant maize lines compared to drought-susceptible lines.

Key words: *Zea mays*; endophytic bacteria; bacterial diversity; 16S rADN.

Maize (*Zea mays*) is currently the second most important food staple in terms of energy sources, and provides a protein content of approximately 9.2% to human nutrition (FAO, 2016). Mexico is in the seventh place in maize production, with approximately 25 million tons a year (FIRA, 2016). Maize productivity is limited by several biotic stresses (pests and diseases) and abiotic stresses (drought, nutrient deficiency, salinity and high temperatures) (Grover *et al.*, 2007). Drought is the meteorological term for water scarcity, and is one of the major environmental stress factors that affect germination, plant vigor and productivity of agricultural crops (Kamara *et al.*, 2003; Wilkinson and Davies, 2010). A possible alternative for tackling this problem is to develop knowledge about plant microorganisms that play an important role in the expression of abiotic stress resistance (Gond *et al.*, 2015).

Endophytic microorganisms are bacteria, fungi or viruses that live all or part of their lives in plants' internal tissues without damaging their hosts. They establish a symbiotic interaction that modulates the health of plants, as well as their ability to adapt to different environmental stress factors (Hardoim *et al.*, 2015). Endophytic bacteria are a subgroup of the rhizosphere and rhizoplane bacterial community that colonizes the internal root tissue of the host plant; this gives them ecological advantages over other populations that colonize

problema es la generación de conocimiento sobre los microorganismos de las plantas que desempeñan una función importante en la expresión de resistencia al estrés por factores abióticos (Gond *et al.*, 2015).

Los microorganismos endófitos son bacterias, hongos o virus que habitan, parte o todo su ciclo de vida, en el tejido interno de las plantas sin causar daño a su hospedante y que establecen una interacción simbiótica que modulan la sanidad de la planta y su habilidad para adaptarse a diferentes factores de estrés del ambiente (Hardoim *et al.*, 2015). Las bacterias endófitas representan un subgrupo dentro de la comunidad de bacterias de la rizosfera y rizoplasma que colonizan el tejido interno de las raíces de la planta hospedante y que le confiere ventajas ecológicas sobre otras poblaciones que colonizan en forma epífita. Diversas especies de bacterias endófitas Gram positivas y Gram negativas se han aislado de diferentes tipos de tejido en numerosas especies de plantas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006).

Existen evidencias del efecto positivo que inducen los microorganismos endófitos mediado por la expresión de mecanismos como el antagonismo, resistencia sistémica inducida (RSI) y adquirida (RSA), promotores del crecimiento de la planta, y la inducción de una respuesta de adaptación al estrés ambiental (Liu *et al.*, 2013). La relación entre la planta hospedante y la comunidad bacteriana endofítica refleja la coevolución en el proceso de colonización influenciado por el genotipo, etapa de crecimiento, estado fisiológico y tejido de la planta, así como por las características del suelo, prácticas agronómicas y condiciones ambientales como la temperatura, agua y el suministro de nutrientes (Higgins *et al.*, 2007).

En Maíz, la inoculación de estos microorganismos se relaciona con un incremento en la germinación, altura de la planta, biomasa radical y aérea que mejora el rendimiento (Morales *et al.*, 2011).

epiphytically. Diverse species of Gram-positive and Gram-negative endophytic bacteria have been isolated from different types of tissue from many plant species (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006).

There is evidence of the positive effect of endophytic microorganisms through the expression of mechanisms such as antagonism, induced systemic resistance (RSI) and acquired systemic resistance (RSA), plant growth promoters and induced adaptation response to environmental stresses (Liu *et al.*, 2013). The relationship between the host plant and the endophytic bacterial community reflects a co-evolution in the colonization process influenced by the genotype, growth stage, physiological condition and plant tissue, as well as by soil characteristics, agronomic practices and environmental conditions such as temperature, water and nutrient supply (Higgins *et al.*, 2007).

When maize is inoculated with these microorganisms, this increases germination, plant height, root and aboveground mass and improves yield (Morales *et al.*, 2011). It has also been shown that inoculating maize with these bacteria efficiently promotes drought stress tolerance (Fan *et al.*, 2015) as a result of the increase in root length and biomass, which in turn improves water and nutrient absorption (Naseem and Bano, 2014; Yasmin *et al.*, 2013). Endophytic bacteria can induce tolerance to abiotic stresses such as salinity and drought, while some populations confer tolerance to specific stress factors and are responsible for the survival of plants under these particular environmental conditions (Gond *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2011). Thus, the microorganisms that establish positive interactions with plant roots play a key role in cropping systems and have promising biotechnological potential to be used in sustainable agriculture.

In Mexico there are no studies on endophytic bacterial communities in roots of drought

Así mismo, se ha demostrado la eficiencia con la inoculación de estas bacterias en maíz promoviendo tolerancia al stress por sequía (Fan *et al.*, 2015), mediado por el incremento de la longitud y biomasa de la raíz mejorando la absorción de agua y nutrientes (Naseem y Bano, 2014; Yasmin *et al.*, 2013). Las bacterias endófitas pueden inducir tolerancia contra enfermedades abióticas como salinidad y sequía, mientras que algunas poblaciones confieren tolerancia a factores de estrés específico y son responsables de la supervivencia de las plantas bajo esas condiciones particulares del ambiente (Gond *et al.*, 2015; Montañez *et al.*, 2011). Así, los microorganismos que establecen una interacción positiva con las raíces de las plantas desempeñan un papel clave en sistemas agrícolas con un promisorio potencial biotecnológico para su uso en una agricultura sostenible.

En México no existen investigaciones sobre las comunidades bacterianas endófitas en raíces de líneas de maíz tolerantes y susceptibles a sequía. Tales bacterias endófitas, potencialmente podrían utilizarse para el desarrollo de futuras estrategias biotecnológicas como inductores de tolerancia a sequía y a otros factores bióticos y abióticos limitantes en la productividad del cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue estimar la densidad y diversidad de las poblaciones bacterianas cultivables endófitas en la raíz en líneas de maíz homocigóticas (S6) tolerantes y susceptibles a sequía previamente identificadas con este carácter en condiciones de campo y cultivadas en tres localidades de México durante tres ciclos del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo. Se sembraron siete líneas homocigóticas de maíz tolerantes (CLQRQ108, CML384, CML445, CML544, DTMA90, DTMA224, DTMA256) y siete susceptibles a

tolerant or drought susceptible maize lines. Such endophytic bacteria could be used to develop future biotechnological strategies such as inducers of drought tolerance and other abiotic and biotic factors that limit crop productivity. Therefore, the objective of this study was to estimate the density and diversity of endophytic bacterial populations in roots of homozygous (S6) drought tolerant and drought susceptible maize lines previously identified as such under field conditions and sown at three Mexican locations during three crop cycles.

MATERIALS AND METHODS

Sampling site. Seven drought-tolerant homozygous maize lines (CLQRQ108, CML384, CML445, CML544, DTMA90, DTMA224, DTMA256) and seven drought-susceptible homozygous maize lines (CML181, DTMA34, DTMA41, DTMA43, DTMA109, DTMA144, DTMA182) were sown, which were selected because they were inbred due to their uniform response to drought. Each line was sown with three replications at the experiment stations of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) in Tlaltizapán, Morelos (18.68 N; 99.11 O), El Batán, Texcoco, Mexico (19.53 N; 98.85 W), and Agua Fría, Puebla (20.5 N; 97.6 W) during the 2012 summer crop cycle (V-2012), 2012 winter cycle (I-2012) and 2013 autumn cycle (V-2013). Samples of the internal tissue formed in the apical root area of three plants per line were taken for each location and crop cycle 25, 52 and 75 days after sowing (dds) to be analyzed at CIMMYT's Maize Pathology Laboratory at El Batán, State of Mexico. The size of the sample was determined by the method proposed by Cochran (1982).

Isolation of endophytic root bacteria. Bacterial isolates from the internal tissue of maize roots that

sequía (CML181, DTMA34, DTMA41, DTMA43, DTMA109, DTMA144, DTMA182), las cuales se seleccionaron por ser líneas endocriadas debido a su uniformidad en la respuesta a sequía. Cada línea se sembró con tres repeticiones en el Campo Experimental del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en las localidades de Tlaltizapán, Morelos (18.68 N; 99.11 O), El Batán, Texcoco, México (19.53 N; 98.85 O), y Agua Fria, Puebla (20.5 N; 97.6 O) durante los ciclos de cultivo verano 2012 (V-2012), invierno 2012 (I-2012) y verano 2013 (V-2013). Se realizaron muestreos del tejido interno formado en la zona apical de la raíz en tres plantas de cada línea por localidad y ciclo de siembra a los 25, 52 y 75 días después de la siembra (dds) para su análisis en el Laboratorio de Patología de Maíz del CIMMYT, El Batán, Edo. México. El tamaño de muestra se determinó por el método propuesto por Cochran (1982).

Aislamiento de bacterias endófitas de raíces.

Se definieron como cepas endófitas aquellos aislamientos bacterianos obtenidos del tejido interno de las raíces del maíz superficialmente esterilizadas. Las raíces de maíz sin síntomas se lavaron con agua destilada estéril y se cortaron en trozos de 2 cm. Se esterilizaron superficialmente 10 g de raíces en frascos de vidrio estériles con lavados en serie con etanol 70% durante 5 min; hipoclorito de sodio 0.53% durante 10 min y tres lavados con agua destilada estéril. Del último lavado con agua destilada estéril, se sembraron 100 µL de cada frasco en placas Petri con medio de cultivo NB (1L): Agar Bacteriológico 15 g (BIOXON® México), Peptona 5 g (BD DIFCO™ EE. UU), Extracto de levadura 3 g (DIBICO® México, NaCl JT BAKER® México) y se incubaron a 28±1 °C durante 2-5 días. La ausencia de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo confirmó la eficiente esterilización superficial de las raíces. Estas raíces se molieron en morteros

had been superficially sterilized were defined as endophytic strains. Symptomless maize roots were washed with sterile distilled water and cut in 2-cm pieces. 10 g of roots were sterilized superficially for 5 min in sterile glass jars and washed with 70% ethanol for 5 min, 0.53% sodium hypochlorite for 10 min and then rinsed three times with sterile distilled water. After the last washing with sterile distilled water, 100 µL from each jar were sown in Petri dishes containing NB culture medium (1L): 15 g bacteriological agar (BIOXON® Mexico), 5 g peptone (BD DIFCO™ USA), 3 g yeast extract (DIBICO® Mexico, NaCl JT BAKER® Mexico) and incubated at 28±1°C from 2 to 5 days. The absence of bacterial growth in the culture medium confirmed that the root surface had been efficiently sterilized. The roots were ground in cold mortars using 20 mL of a sterile buffer solution (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.6). The resulting suspensions were diluted in series (1:9) from 10⁰ to 10⁻³; then 100 µL of each dilution and three replications were sown in NB medium and incubated at 28 °C for 24 h under continuous light. The different bacterial morphotypes were counted and classified according to their color, shape, texture and type of growth. The bacterial growth was considered representative of cultivable endophytic bacteria in maize roots. Bacterial strains were preserved by freezing in NB medium and 20% glycerol for subsequent studies.

Population density of endophytic bacteria. The population density of bacteria per root tissue was estimated by directly counting the colonies on the plate. The number of bacterial colonies isolated from the 14 maize lines was counted using a colony counter (Quebec®, Darkfield Colony Counter). The bacterial population of root tissue samples was expressed in terms of colony forming units (UFC g⁻¹ of root tissue). The resulting data were converted to $_{\text{Log10}} \text{UFC g}^{-1}$ of root and an analysis of variance

fríos con 20 mL de una solución amortiguadora (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.6) estéril. Las suspensiones obtenidas se diluyeron en serie (1:9) desde 10^0 hasta 10^{-3} y se sembraron 100 μL de cada dilución con tres repeticiones en medio NB incubados a 28 °C durante 24 h con luz continua. Se cuantificaron y clasificaron los diferentes morfotipos bacterianos con base al color, forma, textura y tipo de crecimiento. El crecimiento bacteriano se consideró representativo de bacterias cultivables endófitas en la raíz de maíz. Las cepas bacterianas se preservaron por congelación en medio NB y glicerol 20% para estudios posteriores.

Densidad poblacional de bacterias endófitas. La densidad poblacional de bacterias por tejido de raíz se estimó por conteo directo de colonias en placa. El número de colonias bacterianas aisladas de las 14 líneas de maíz se cuantificó con un contador de colonias (Quebec[®], Darkfield Colony Counter). La población bacteriana de las muestras de tejido de raíz se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1} de raíz). Los datos obtenidos se transformaron a Log_{10} UFC g^{-1} de raíz y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo un diseño de análisis factorial de donde se obtuvo la separación de medias por DMS ($\alpha=0,05$) con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, EE.UU) en función del ciclo de cultivo, localidad, días después de la siembra (dds) y líneas de maíz tolerantes/susceptibles a sequía estudiadas.

Amplificación del gen 16S rADN e identificación de bacterias endófitas. La extracción de ADN de las bacterias se realizó por el protocolo descrito por Mahuku (2004), con las siguientes modificaciones: las células bacterianas se obtuvieron a partir del crecimiento en medio NB a 28 °C durante 48 h. Después de suspender el precipitado en 100 μL

(ANOVA) was performed using a factorial analysis design to separate the media by DMS ($\alpha=0,05$) using the SAS statistical program (Statistical Analysis System version 9.1.3 SAS Institute, Cary, NC, USA) according to the crop cycle, location, days after sowing (dds) and the studied drought-tolerant or drought-susceptible maize lines.

Amplification of the 16S rDNA gene and identification of endophytic bacteria. Bacterial DNA was extracted using the protocol described by Mahuku (2004) with the following modifications: bacterial cells were obtained by growing them in NB medium at 28 °C for 48 h. After suspending the precipitate in 100 μL of 1X TE, 2 μL of RNAsa were added (1 mg mL^{-1}) and then incubated in a water bath at 37 °C for 1 h. The DNA quality was verified by electrophoresis in agarose gel. Bacteria were identified by partially amplifying the 16S rADN gene using universal primers 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') under the PCR conditions described by Galkiewicz and Kellogg (2008). DNA amplification and sequencing were carried out using Macrogen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company), and the sequences obtained were aligned with sequences kept at the GenBank of (NCBI) using the BLASTn program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTS AND DISCUSSION

Taxonomic identification of endophytic bacteria. Through partial sequencing of the 16S rADN gene, 22 endophytic bacteria species were identified in roots of both groups of maize lines. The greatest abundance of bacteria was associated with the *Proteobacteria* phyla followed by *Firmicutes* and

de 1X TE, se agregaron 2 μL de RNAsa (1 mg mL^{-1}), y se incubó en baño María a 37 °C durante 1 h. La calidad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Las bacterias se identificaron mediante la amplificación parcial del gen 16S rADN con los iniciadores universales 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') con las condiciones de PCR descritas por Galkiewicz y Kellogg (2008). La amplificación y secuenciación se hizo en Macrogen (DNA Sequency Service. Korean Biotechnology Company); las secuencias obtenidas se alinearon con secuencias depositadas en el GenBank del Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos (NCBI) utilizando el programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación taxonómica de bacterias endófitas. La secuenciación parcial del gen 16S rADN permitió identificar 22 especies de bacterias endófitas en la raíz en ambos grupos de líneas de maíz. La mayor abundancia de bacterias se asoció a los phyla *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*. Dentro de *Firmicutes*, el 100% de las cepas se identificaron como *Bacillus sp.* y dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, 33% como *Pseudomonas sp.*

La diversidad y riqueza de bacterias naturalmente asociadas a las raíces de maíz es amplia y la estimación de esta depende del método de análisis. En este estudio se utilizó un enfoque de cultivo dependiente y los resultados coinciden con investigaciones previas que reportaron el phylum *Proteobacteria* como el más dominante entre las poblaciones bacterianas endófitas aisladas en raíces, tallos y hojas de maíz (Rosenblueth y Martínez-

Bacteroidetes. Within *Firmicutes*, 100% of strains were identified as *Bacillus sp.*, and within the class *Gammaproteobacteria*, 33% were identified as *Pseudomonas sp.*

The diversity and richness of bacteria naturally associated with maize roots is wide, and their estimation depends on the analytic method used. In this study, a dependent culture approach was used, and the results coincide with previous studies that found that the *Proteobacteria* phylum was the most predominant of the endophytic bacterial populations isolated from maize roots, stems and leaves (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006). Other studies of the diversity of endophytic communities in maize roots using dependent and independent culture methods also found that the bacteria most frequently associated with this crop are *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira *et al.*, 2011) and *Burkholderia spp.* (Ikeda *et al.*, 2013). By analyzing these populations using gas chromatography and fatty acid profiles, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens* were identified as the most predominant species in maize stalks (Rai *et al.*, 2007), but when using pyrosequencing, the *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* phyla were identified as being the most abundant in the maize rhizosphere (Li *et al.*, 2014).

Maize research has shown that these populations could be used as bacterial inoculants for controlling drought stress, and suggests that drought tolerance is induced by the production of phytohormones such as abscisic, gibberellic and indole-3-acetic acids, cytokinins, enzymes such as ACC deaminase, production of bacterial exopolysaccharides and systemic tolerance induction (Dimkpa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). In other crops, they have been identified as tolerance inductors in wheat (*Triticum sativum*) and legumes (*Vigna radiata*) when they were inoculated

Romero, 2006). Así mismo, otros estudios sobre la diversidad de las comunidades endófitas de la raíz en maíz utilizando métodos de cultivo dependiente e independiente también coinciden en que las bacterias más frecuentemente asociadas a este cultivo son *Firmicutes* (*Bacillus*), *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*) (Pereira *et al.*, 2011) y *Burkholderia* spp. (Ikeda *et al.*, 2013). El análisis de estas poblaciones por cromatografía de gases y perfiles de ácidos grasos identificaron a *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. fluorescens* como las especies relativamente más predominantes en el tallo de maíz (Rai *et al.*, 2007), mientras que mediante pyrosecuenciación se identificó como los más abundantes en la rizosfera de maíz a los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* (Li *et al.*, 2014).

Experimentaciones en maíz han mostrado el potencial uso de estas poblaciones como inoculantes bacterianos para el control de estrés por sequía, sugiriendo que la inducción de tolerancia a sequía se debe a la producción de fitohormonas como el ácido abscísico, giberélico, indol-3-acético, citocininas, enzimas como la ACC deaminasa, producción de exopolisacáridos bacterianos y la inducción de tolerancia sistémica (Dimkpa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Timmusk *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2009). En otros cultivos se han señalado como inductores de tolerancia en trigo (*Triticum sativum*) y leguminosas (*Vigna radiata*) al ser inoculados en semilla y promoviendo el incremento en los niveles de regulación de genes relacionados con la tolerancia a sequía y la actividad de diversas enzimas (Kasim *et al.*, 2013; Saravanakumar *et al.*, 2011).

Por la frecuencia de los aislamientos, en el presente estudio se destacan tres grupos de bacterias endófitas en la raíz de maíces tolerantes y susceptibles a sequía: 1) altamente frecuentes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas geniculata*), aislados durante los tres ciclos de cultivo

in seed, for they promoted an increase in the levels of regulation of genes related to drought tolerance and the activity of diverse enzymes (Kasim *et al.*, 2013; Saravanakumar *et al.*, 2011).

Based on the frequency of the isolates, three groups of endophytic bacteria in the roots of drought tolerant and drought susceptible maize stand out in this study: 1) highly frequent (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas geniculata*), isolated during the three crop cycles at the three locations, 2) frequent (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* and *Sinorhizobium meliloti*), isolated during the three crop cycles at two locations, and 3) low frequency (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophila* and *Burkholderia gladioli*), isolated only at two locations and not in all crop cycles (Table 1).

The taxonomic and functional structure of bacterial communities in soil is influenced by biotic and abiotic factors such as soil physical and chemical characteristics, weather conditions, plant genotype and interaction with other soil prokaryotes and eukaryotes, a fact that suggests that those interactions are complex. In this study, the structure and large number of isolated bacteria may be associated with the interaction of several factors, including plant genotype, the genetic characteristics of bacterium, soil, temperature, crop cycle and maize plant phenology (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009) that influence the colonization and dynamics of the endophytic bacterial community (Bodenhausen *et al.*, 2013). A specific plant-endophyte relationship was revealed by performing bacterial chemotaxis on host plant exudates as carbon sources that act as signaling molecules (Albareda *et al.*, 2006); it also showed that differences in exudate composition and patterns depend on the crop variety, development stage, exposure of the plant to stress and type of soil, which influence colonization by bacterial

en las tres localidades, 2) frecuentes (*Bacillus firmus*, *Pseudomonas hibiscola* y *Sinorhizobium meliloti*), aislados durante los tres ciclos de cultivo en dos localidades y 3) baja frecuencia (*Acinetobacter soli*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia gladioli*), aisladas solo en dos localidades y no en todos los ciclos del cultivo (Cuadro 1).

La estructura taxonómica y funcional de las comunidades bacterianas en el suelo está influenciada por factores bióticos y abióticos como las características físicoquímicas del suelo, condiciones climáticas,

communities (Haichar *et al.*, 2008). Studies on maize indicated that root exudates are 65% sugar, 33% organic acids and 2% amino acids, and that changes in the quantity and quality of exudation patterns at different root growth and physiological stages influenced the biomass and the structure of bacterial communities by increasing nutrient activity and deposition by those microbial communities and favored plant growth (Baudoin *et al.*, 2003). Some maize studies that used a dependent culture approach have shown dynamic changes

Cuadro 1. Especies de bacterias endófitas identificadas en la raíz de 14 líneas de maíz en tres localidades y durante tres ciclos del cultivo.

Table 1. Endophyte bacteria species identified in roots of 14 maize lines in three locations during three crop cycles.

| ID | Endófito | Línea | Identidad de Nucleótidos | Clase | Localidad/ciclo de cultivo | | |
|-------|--|-------|--------------------------|------------------|----------------------------|---------|---------|
| | | T/S | | | TL | AF | EB |
| AF101 | <i>Acinetobacter soli</i> ^Z | T, S | 96% (KU551890) | γ Proteobacteria | | 1 | 1 |
| AF105 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | T, S | 97% (KX518841) | α Proteobacteria | | 1 | |
| TL007 | <i>Bacillus asahii</i> | T, S | 95% (KU551893) | Firmicutes | 1, 2, 3 | | 1 |
| TL008 | <i>Bacillus firmus</i> ^Y | T, S | 98% (KU551896) | Firmicutes | 1, 2, 3 | | 1, 2, 3 |
| AF103 | <i>Bacillus megaterium</i> ^X | T, S | 96% (KC414697) | Firmicutes | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 |
| AF102 | <i>Bacillus subtilis</i> ^X | T, S | 97% (KU551891) | Firmicutes | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 |
| AF111 | <i>Burkholderia cenocepacia</i> | T, S | 96% (GU433447) | β Proteobacteria | | 1, 2, 3 | |
| AF129 | <i>Burkholderia gladioli</i> ^Z | S | 97% (EU1611873) | β Proteobacteria | 1, 2 | 2 | |
| AF109 | <i>Chryseobacterium indologenes</i> | T, S | 98% (KU551895) | Flavobacteria | | 1, 2, 3 | 2 |
| TL032 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | T, S | 97% (AM184247) | γ Proteobacteria | 1 | 1, 2, 3 | |
| BT011 | <i>Enterobacter</i> spp. | T, S | 97% (KX518848) | γ Proteobacteria | | | 1 |
| TL012 | <i>Flavobacterium johnsoniae</i> | T, S | 96% (KU551897) | Flavobacteria | 1 | | |
| AF116 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | T, S | 97% (KU551901) | γ Proteobacteria | | 2 | |
| AF128 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | T, S | 96% (KX518847) | γ Proteobacteria | | 1 | |
| TL015 | <i>Pseudomonas hibiscola</i> ^Y | T, S | 97% (KX518846) | γ Proteobacteria | 1, 2, 3 | | 1, 2, 3 |
| AF112 | <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | T, S | 96% (KX518844) | γ Proteobacteria | | 1, 2, 3 | |
| AF115 | <i>Pseudomonas geniculata</i> ^X | T, S | 96% (KU551900) | γ Proteobacteria | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 |
| TL011 | <i>Pseudomonas lini</i> | T, S | 99% (KX518842) | γ Proteobacteria | 1 | | |
| AF107 | <i>Salmonella bongori</i> | T, S | 96% (KU551899) | γ Proteobacteria | 1 | | |
| AF106 | <i>Serratia marcescens</i> | T, S | 96% (KX518843) | γ Proteobacteria | 1, 2, 3 | 1 | |
| TL010 | <i>Sinorhizobium meliloti</i> ^Y | T, S | 98% (KU551892) | α Proteobacteria | 1, 2, 3 | | 1, 2, 3 |
| TL009 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^Z | T, S | 98% (KU551894) | γ Proteobacteria | | 1, 2, 3 | 1 |

T= Línea de maíz tolerante a sequía, S= Línea de maíz susceptible a sequía / T= drought-tolerant maize line, S= drought-susceptible maize line.

TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fría, Pue., EB= El Batán, Méx. / TL= Tlaltizapán, Mor., AF= Agua Fría, Pue., EB= El Batán, Méx.

1=Verano 2012; 2=Invierno 2012; 3=Verano 2013 / 1=Autumn 2012; 2=Winter 2012; 3=Summer 2013.

^X Endófitos altamente frecuentes / ^X Highly frequent endophytes.

^Y Endófitos frecuentes / ^Y Frequent endophytes.

^Z Endófitos de baja frecuencia / ^Z Low-frequent endophytes.

genotipo de la planta y la interacción con otros procariontes y eucariontes en el suelo, lo cual indica que son interacciones complejas. En este estudio, la estructura y abundancia de las bacterias aisladas puede asociarse con la interacción de varios factores, incluyendo el genotipo de la planta, las características genéticas de la bacteria, el suelo, la temperatura, ciclo de cultivo y fenología de la planta de maíz (Li *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2009) que influyen en la colonización y dinámica de las comunidades bacterianas endófitas (Bodenhausen *et al.*, 2013). Se ha mostrado la relación específica entre planta-endófito mediante una quimiotaxia bacteriana hacia exudados de la planta hospedante como fuentes de carbono que actúan como moléculas de señalización (Albareda *et al.*, 2006) y que las diferencias en la composición y patrones de exudación son dependientes del cultivar, etapa de desarrollo, exposición a estrés de la planta y tipo de suelo, los cuales influyen en la colonización por comunidades bacterianas (Haichar *et al.*, 2008). Estudios en maíz indicaron que los exudados de la raíz están compuestos de 65% de azúcares, 33% de ácidos orgánicos y 2% de aminoácidos y que los cambios en cantidad y calidad en estos patrones de exudación en las diferentes etapas del crecimiento y fisiología de la raíz, influyó en la biomasa y estructura de las comunidades bacterianas incrementando la actividad y deposición de nutrientes por estas comunidades microbianas beneficiando el crecimiento de la planta (Baudoin *et al.*, 2003). Algunas investigaciones en maíz mediante un enfoque de cultivo dependiente han demostrado cambios dinámicos en la comunidad bacteriana de la rizosfera en diferentes etapas de crecimiento del cultivo (Cavaglieri *et al.*, 2009; Nacamulli *et al.*, 1997).

En este estudio se identificaron bacterias específicas como *Burkholderia gladioli*, la cual se aisló con baja frecuencia únicamente en las líneas susceptibles en dos localidades y ciclos de cultivo (Cuadro 1).

in the bacterial community of the rhizosphere at different crop growth stages (Cavaglieri *et al.*, 2009; Nacamulli *et al.*, 1997).

In this study, specific bacteria were identified such as *Burkholderia gladioli*, which was isolated at a low frequency only in susceptible maize lines at two locations and crop cycles (Table 1).

Burkholderia gladioli was previously identified in roots of a wild maize ancestor (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) and in modern maize genotypes as an endophyte showing antifungal properties (Shehata *et al.*, 2016). Also, *Burkholderia* sp. inoculation in maize had positive effects on drought tolerance (Fan *et al.*, 2015; Naveed *et al.*, 2014).

Density of endophytic populations in maize lines.

The density of endophytic bacteria in the 14 maize lines ranged from 1, 6_{Log10} UFC g⁻¹ of root. The ANOVA showed highly significant differences (**= p≤0,01) in the density of the endophytic population of *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* and *S. meliloti* in terms of location, crop cycle, days after transplanting (dds) and group (drought tolerance/susceptibility) of maize lines (Table 2).

By location, the highest population densities recorded at El Batán were those of *B. subtilis* and *P. hibiscicola*, while in Tlaltizapán they were *B. megaterium* and *S. meliloti*. By crop cycle and sampling date, *B. megaterium* and *P. hibiscicola* were significantly different (p≤0,05) during the V-2012 cycle at 52 dds. In this study, a total of 22 endophytic bacteria were identified in roots of drought tolerant and drought susceptible maize lines. However, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* and *S. meliloti* population densities were significantly higher in drought tolerant maize lines than in susceptible lines (Table 2).

The density of bacterial populations is a key element, considered to be the greatest metabolism regulation mechanism in the interaction with the biotic and abiotic environment, through which

B. gladioli se ha identificado previamente en raíces del ancestro silvestre (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) y en genotipos modernos de maíz como un endófito con propiedades antifúngicas (Shehata *et al.*, 2016); así mismo, la inoculación de *Burkholderia* sp. en maíz mostró efectos positivos en la tolerancia a sequía (Fan *et al.*, 2015; Naveed *et al.*, 2014).

Densidad de poblaciones endófitas en líneas de maíz. La densidad de bacterias endófitas en las 14 líneas de maíz tuvo rangos entre 1, 6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz. El ANOVA mostró diferencias altamente significativas (**= p≤0,01) en la densidad de población endófitas de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscola* y *S. meliloti* en función de la localidad, ciclo de cultivo, días después del trasplante (dds) y grupo (tolerancia/susceptibilidad a sequía) de línea de maíz (Cuadro 2).

Por localidad, en El Batán, las mayores densidades de poblaciones se registraron con *B. subtilis* y *P. hibiscola*, mientras que en Tlaltizapán fueron con *B. megaterium* y *S. meliloti*. Por ciclo de cultivo y fecha de muestreo, *B. megaterium* y *P. hibiscola* fueron significativamente diferentes (p≤0,05)

it coordinates the expression of specialized genes, depending on cellular density. It has been demonstrated that this behavior, known as quorum sensing (QS) in bacteria associated with plants, regulates the expression of genes in the rhizosphere to synthesize secondary metabolites, antifungal compounds, antibiotics and extracellular enzymes involved in biocontrol (Somers *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001).

In this study, the total population density of *B. subtilis* in the maize lines sown at El Batán was 3, 4_{Log10} UFC g⁻¹ of root, and there was no significant difference by cycle or days after sowing, but it was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 1).

As an endophyte, *B. subtilis* is a microorganism of great interest in biotechnological applications as biocontrol agent for biotic and abiotic stresses because of its efficient colonization of plant roots which triggers different biocontrol and adaptation mechanisms in different environments (Marulanda *et al.*, 2006). Additionally, this demonstrates its high capacity to produce volatile organic compounds (VOCs) that act as signaling molecules to trigger a defense response through specific

Cuadro 2. Análisis de varianza y comparación de medias de la densidad de población (Log₁₀ UFC g⁻¹ de raíz) en las raíces de 14 líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía.

Table 2. Variance analysis and comparison of means of population density (Log₁₀ UFC g⁻¹ of root) in roots of 14 drought-tolerant maize lines and drought-susceptible maize lines.

| | <i>B. subtilis</i> | <i>B. megaterium</i> | <i>P. hibiscola</i> | <i>S. meliloti</i> |
|-------------|--------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| Localidad | ** | ** | ** | ** |
| Ciclo | NS | ** | ** | NS |
| Días | NS | ** | NS | ** |
| Tolerancia | ** | ** | ** | ** |
| Tolerante | 2.2684 a | 3.7374 a | 2.9388 a | 4.8880 a |
| Susceptible | 1.7410 b | 3.3976 b | 2.4501 b | 4.6389 b |

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (DMS, 0.05) / Means with the same letter are not statistically different (DMS, 0.05).

NS= No existen diferencias significativas / NS= There are no significant differences.

**= Diferencias altamente significativas / **= Highly significant differences.

durante el ciclo V-2012 a los 52 dds. En el presente estudio se identificaron un total de 22 bacterias endófitas en raíces de líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. Sin embargo, la densidad de población de *B. subtilis*, *B. megaterium*, *P. hibiscicola* y *S. meliloti* fueron significativamente mayores en las líneas de maíz tolerantes que en las susceptibles a sequía (Cuadro 2).

La densidad de poblaciones en bacterias es un elemento clave y se considera como el mayor mecanismo de regulación del metabolismo en la interacción con el medioambiente biótico y abiótico, a través del cual coordina la expresión de genes especializados dependiente de una densidad celular. Este comportamiento conocido como Quorum sensing (QS), en bacterias asociadas a plantas se ha demostrado que regula la expresión de genes en la rizosfera para la síntesis de metabolitos secundarios, compuestos antifúngicos, antibióticos y enzimas extracelulares que están involucrados en el biocontrol. (Somers *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001).

En este estudio, la densidad total de población de *B. subtilis* en las líneas de maíz en la localidad de El Batán fue de $3,4_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ de raíz, no hubo diferencia significativa por ciclo y días después de la siembra, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 1).

Como endófito, *B. subtilis* es un microorganismo de gran interés en aplicaciones biotecnológicas como agente de biocontrol de enfermedades bióticas y abióticas, mediada por la eficiente colonización de las raíces de las plantas que desencadenan diferentes mecanismos de biocontrol y adaptación a diferentes ambientes (Marulanda *et al.*, 2006); además, demostrando su alta capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles (VOCs) que actúan como moléculas de señalización para disparar una respuesta de defensa mediante la resistencia

induced systemic resistance (ISR) (Farag *et al.*, 2013). These VOCs activate hormone production paths, including auxins, gibberellins, cytokinins and salicylic acid that foster host plant growth under stress conditions, mainly by increasing root biomass, which in turn improves water absorption (Zhang *et al.*, 2007). Another study showed that maize seed inoculated with selected *B. subtilis* strains provided important benefits as a growth promoter and increased nutrient absorption capacity (Canbolat *et al.*, 2006). In Tlaltizapán, the population density of *B. megaterium* in maize lines was from $3,5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root during the three cycles and significantly higher ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root) in the V-2012 cycle at 52 dds, and in drought tolerant maize lines (Table 2, Figure 2).

Recent studies have shown that *B. megaterium* modifies the maize plant response to several abiotic stresses, and the importance of the population density of some *Bacillus* species in the drought tolerance and water transportation response in *Retama sphaerocarpa*, because it promotes root growth and water absorption capacity, as well as the levels of proline and indoleacetic acid (Marulanda *et al.*, 2006). In particular, those studies point out that the presence of *B. megaterium* in the host plant increases biomass and water content in the root (Marulanda *et al.*, 2009), a fact that suggests that these endophytic populations could be used in maize plants sown in arid and semi-arid areas. The biological function of other endophytic *Bacillus* species in maize are related to the plant's efficient defense response against pathogens associated with the production of antifungal lipopeptides that induces the expression of defense genes (Gond *et al.*, 2015).

At El Batán, the population density of *P. hibiscicola* in maize lines was from $3,5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root during the three crop cycles and significantly higher ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g⁻¹ of root) in the V-2012 cycle.

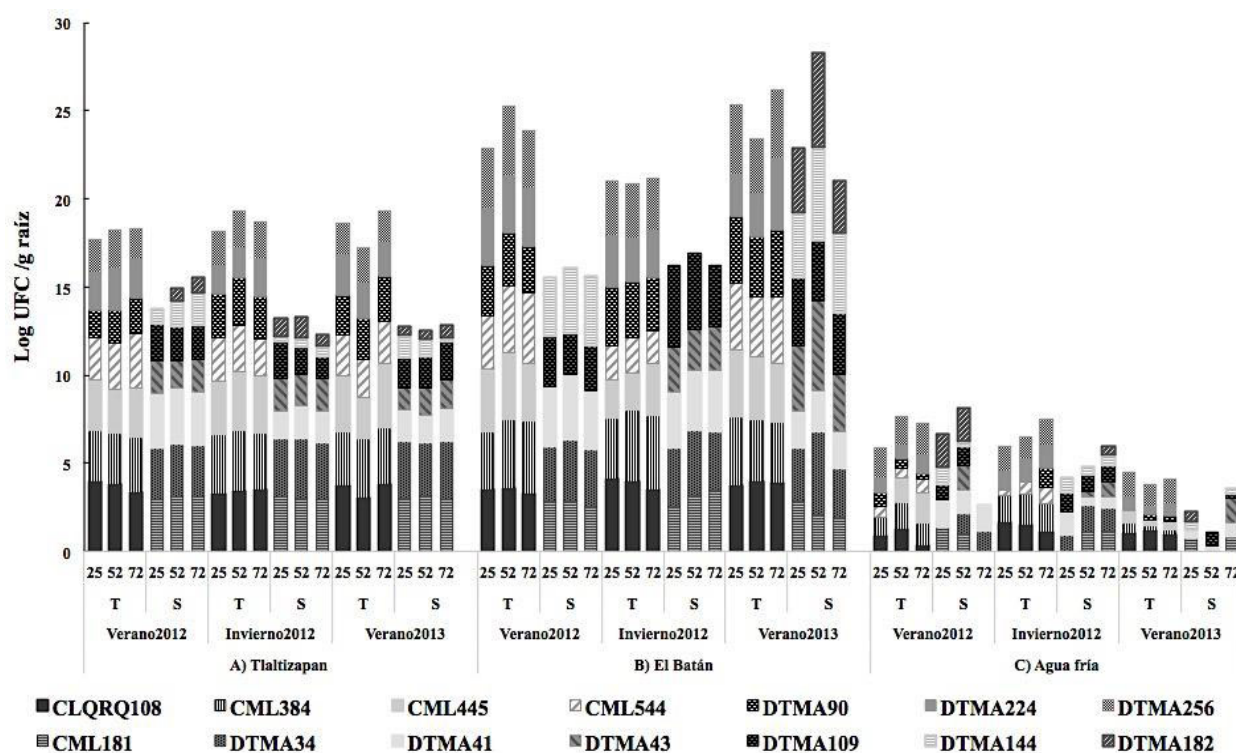


Figura 1. Población de *B. subtilis* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 1. *B. subtilis* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of México.

sistémica inducida (ISR) específica (Frag *et al.*, 2013). Estos VOCs activan las vías de producción de hormonas incluyendo auxinas, giberelinas, citocininas y ácido salicílico, que promueven el desarrollo de la planta hospedante en condiciones de estrés, principalmente por el incremento de biomasa radicular resultando en una mejor absorción de agua (Zhang *et al.*, 2007). Otro estudio demostró que la inoculación en semilla de maíz con cepas seleccionadas de *B. subtilis* aportó importantes beneficios como promotor de crecimiento y mayor capacidad de absorción de nutrientes (Canbolat *et al.*, 2006).

En Tlaltizapán, la densidad de población de *B. megaterium* en las líneas de maíz estuvo entre 3,

It was not isolated in Agua Fría. There were no significant differences among the days after sowing (dds), but the density was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 3).

P. hibiscicola has not been cited as a maize endophyte. However, according to the phylogenetic affiliation of the *P. hibiscicola* type ATCC 19867 strain based on a comparative analysis of 16S rADN gene sequences and chemical taxonomy profiles, it was reclassified as *Stenotrophomonas* sp. (Anzai *et al.*, 2000). *S. maltophilia* has been cited as a maize endophyte (McInroy and Kloepper, 1995) and reported to act as a biological control agent against soil-borne pathogens such as *Pythium* spp., *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia solani*. It has also

$5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor ($5_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} de raíz) en el ciclo V-2012 a los 52 dds, fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 2).

Investigaciones recientes demostraron que *B. megaterium* modifica la respuesta de la planta del maíz ante varios estreses abióticos, incluyendo la importancia de la densidad poblacional de algunas especies de *Bacillus* en la respuesta de tolerancia a sequía y transporte de agua en *Retama sphaerocarpa*, al estimular el crecimiento de la raíz y la capacidad de absorción de agua y los niveles de prolina y ácido indol acético (Marulanda *et al.*, 2006). Particularmente, destacan que la presencia de *B.*

been reported to produce indoleacetic acid, which regulates the development of sprouts and side roots in plants (Mehnaz *et al.*, 2010).

The population density of *S. meliloti* in drought-tolerant maize lines in Tlaltizapán was from 4, 6 Log_{10} UFC g^{-1} of root during the three cycles, and significantly higher ($6_{\text{Log}_{10}}$ UFC g^{-1} of root) at 52 dds. It was not isolated in Agua Fria. There were no significant differences per crop cycle, but it was significantly higher in drought-tolerant maize lines (Table 2, Figure 4).

S. meliloti is known to be a nitrogen-fixing nodular bacterium in plants of the *Medicago* genus, and involved in the drought tolerance and salinity response (Roumiansteva and Muntyan, 2015). In

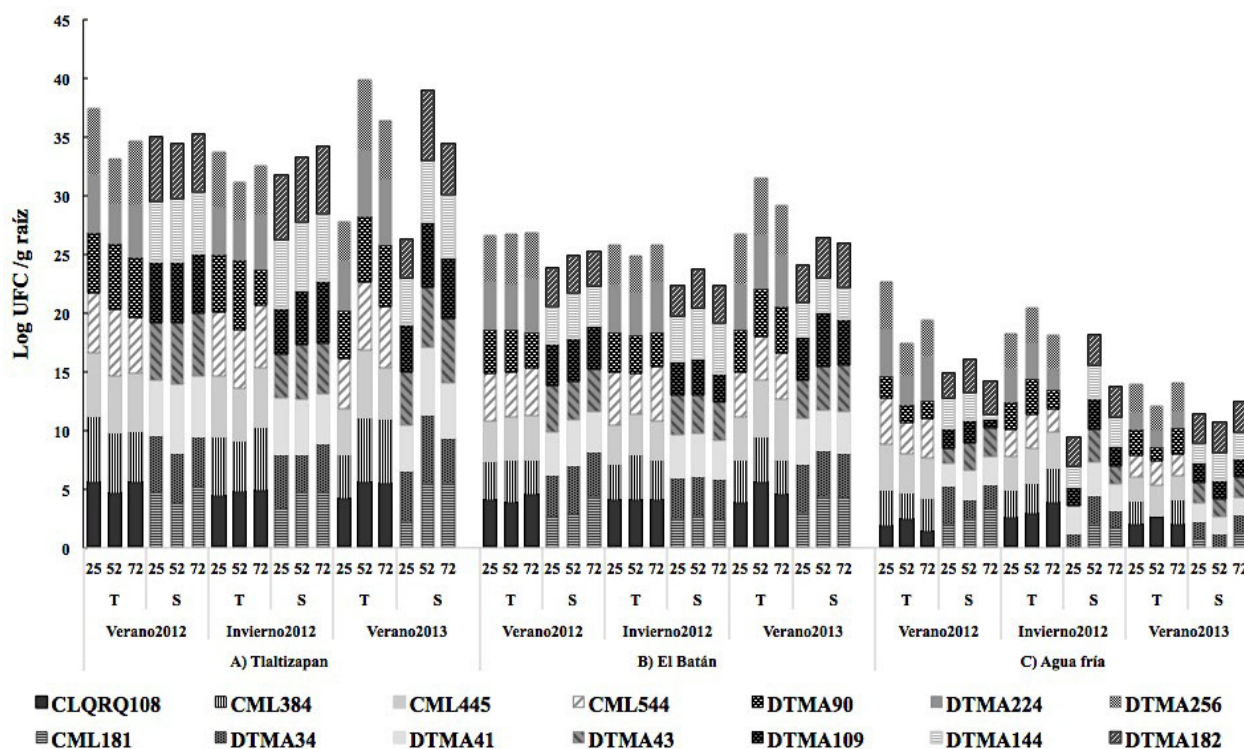


Figura 2. Población de *B. megaterium* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 2. *B. megaterium* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

megaterium en su planta hospedante aumenta la biomasa y contenido de agua de la raíz (Marulanda *et al.*, 2009), que sugiere un uso potencial de estas poblaciones endófitas en plantas de maíz cultivadas en zonas áridas y semiáridas. La función biológica de otras especies de *Bacillus* endofíticos en maíz se relaciona con una eficiente respuesta de defensa de la planta contra patógenos relacionada con la producción de lipopéptidos antifúngicos que induce la expresión de genes de defensa (Gond *et al.*, 2015).

En El Batán, la densidad de población de *P. hibiscola* en líneas de maíz estuvo entre 3, 5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor (5_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz) en el ciclo V-2012. No se aisló en la localidad de Agua Fría. No hubo diferencias significativas entre los días después de la siembra (dds), fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 3).

P. hibiscola no se ha citado como endófito en maíz; sin embargo, la afiliación filogenética de la cepa tipo ATCC 19867 de *P. hibiscola*, basados en el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rADN y perfiles quimio-taxonómicos, lo reclasifican como *Stenotrophomonas* sp. (Anzai *et al.*, 2000). *S. maltophilia* se ha citado como endófito en maíz (McInroy y Kloepper, 1995) y se reporta su función como agente de control biológico contra patógenos con origen en el suelo como *Pythium* spp., *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia solani* además de la capacidad para producir ácido indol acético que en plantas regula el desarrollo de brotes y raíces laterales (Mehnaz *et al.*, 2010).

La densidad de población de *S. meliloti* en líneas tolerantes a sequía en Tlaltizapán estuvo entre 4, 6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz en los tres ciclos y fue significativamente mayor (6_{Log10} UFC g⁻¹ de raíz) a los 52 dds. No se aisló en la localidad de Agua Fría. No hubo diferencias significativas por ciclo de cultivo, pero fue significativamente mayor en las líneas de maíz tolerantes a sequía (Cuadro 2, Figura 4).

Mexico, the presence of a great genetic diversity of native *S. meliloti* populations in alfalfa (*Medicago* spp.) was reported, and so far, new species have been identified in woody legumes of the *Leucaena* (Wang *et al.*, 2002) and *Acacia* genera (Toledo *et al.*, 2003). The *Sinorhizobium* genus was found in the maize rhizosphere (Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006), and *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* as an endophyte in maize roots in Mexico (Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001). However, there is no information about *S. meliloti* as an endophyte in maize roots, so the present study provides reference information about the natural endophytic colonization of *S. meliloti* in maize in Mexico. Alfalfa and maize intercropping is common in the studied locations, so this may explain the endophytic colonization of *S. meliloti* in maize roots. Studies conducted on rice (*Oryza sativa*) suggest that *S. meliloti* may produce a lumichrome signaling molecule in the rhizosphere of those plants and promote growth by inducing better root respiration, stomatal conductance, leaf transpiration and photosynthetic efficiency (Chi *et al.*, 2010). When it was applied at nanomolecular concentrations, it promoted legume and cereal growth and increased root biomass in the legume *Lotus japonicus* and in tomato (*Solanum lycopersicum*) (Gouws *et al.*, 2012).

The frequency of certain bacteria genera isolated from maize roots in this study may be related to the phylogeny of the maize lines. For example, among bacteria showing higher frequency and density in drought-tolerant maize lines, two *Bacillus* species stand out. *Bacillus* is considered an important endophytic bacterium that has been isolated from both Teozintle (a maize ancestor) and modern maize genotypes; it has been shown that the composition of the endophytic bacteria colony in maize seed varies and that it has been preserved through the evolution, ethnography and ecology of the maize plant as a host (Johnston-Monje and Raizada, 2011).

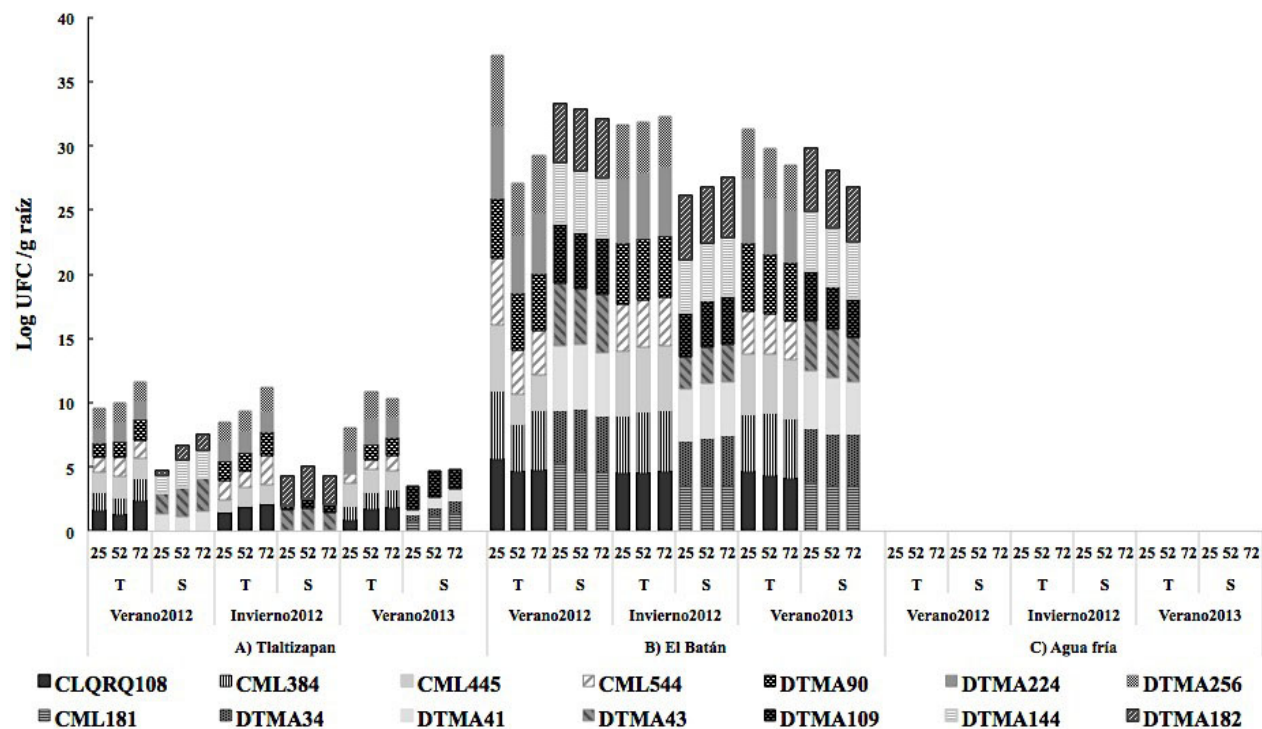


Figura 3. Población de *P. hibiscola* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 3. *P. hibiscola* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible maize lines at 25, 52 y 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

S. meliloti se conoce como una bacteria noduladora fijadora de nitrógeno en plantas del género *Medicago*, con implicaciones en la respuesta de tolerancia a sequía y salinidad (Roumiansteva y Muntyan, 2015). En México se determinó la existencia de una gran diversidad genética de poblaciones nativas de *S. meliloti* en alfalfa (*Medicago* spp.) y actualmente se han identificado nuevas especies en leguminosas leñosas en el género *Leucaena* (Wang *et al.*, 2002) y *Acacia* (Toledo *et al.*, 2003). El género *Sinorhizobium* se encontró en la rizosfera de maíz (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006) y a *Rhizobium etli* bv. *phaseoli* como endófito en raíces de maíz en México (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001); sin embargo, no existe información sobre *S. meliloti* como endófito en la raíz

In this research, we determined that some factors such as drought tolerance/susceptibility of the maize lines used, as well as the location, crop cycle and time (days after transplanting) significantly affected the density of cultivable endophytic bacteria in the roots of the maize genetic materials. Rhizobacteria as promoters of growth (PGPR), nutrition and plant disease management have been extensively studied, but their function in managing abiotic stresses such as drought has generated great interest in recent years (Dimpka *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2010; Kavamura *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). The use of endophytic microorganisms may be a viable alternative against biotic and abiotic stresses. Strains isolated in this study are a microbial resource that is intimately

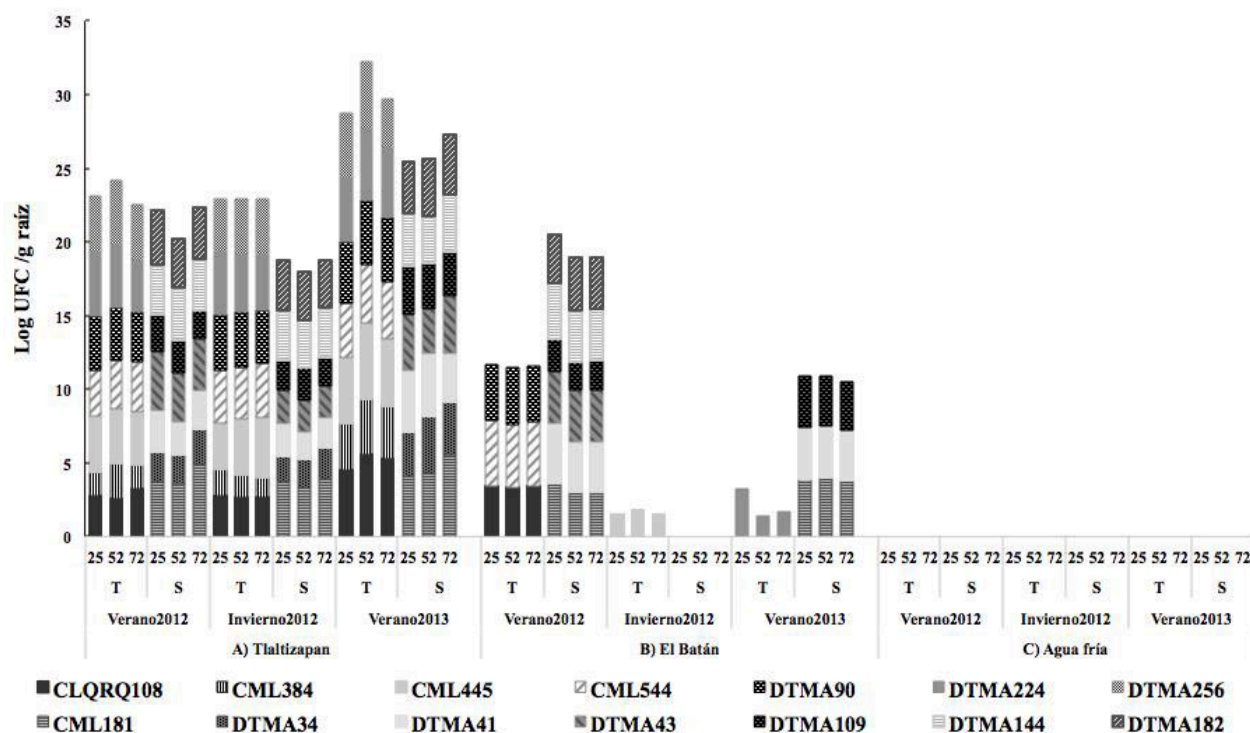


Figura 4. Población de *S. meliloti* en 7 líneas de maíz tolerantes y 7 susceptibles a sequía a los 25, 52 y 75 dds en los ciclos de cultivo Verano 2012, Invierno 2012 y Verano 2013, en tres localidades de México.

Figure 4. *S. meliloti* population in 7 drought-tolerant maize lines and 7 drought-susceptible at 25, 52 and 75 dds during the 2012 summer crop cycle, 2012 winter crop cycle and 2013 summer crop cycle in three locations of Mexico.

de maíz, por lo que el presente estudio aporta información de referencia de la colonización natural endófito de *S. meliloti* en esta gramínea en México. En las localidades estudiadas es común el cultivo intercalado de alfalfa con maíz, que podría explicar la colonización endófito de raíces de maíz por *S. meliloti*. Estudios en arroz (*Oryza sativa*) sugieren que *S. meliloti* podría producir la molécula señal lumicromo en la rizosfera de estas plantas promoviendo el crecimiento por inducción de una mejor respiración de las raíces, conductancia estomática, transpiración de la hoja y eficiencia fotosintética (Chi *et al.*, 2010). Su aplicación en concentraciones nanomoleculares promovió el crecimiento en leguminosas y gramíneas e incrementó la biomasa de las raíces de la leguminosa *Lotus japonicus*

associated with maize and has the potential to be used as a biotechnological tool in agriculture; these strains deserve to be evaluated in the future as microbial inoculants and inducers of drought stress tolerance, as well as to other biotic and abiotic factors in regions of Mexico where maize is produced under limiting conditions.

CONCLUSIONS

Cultivable root endophytic bacteria that were most frequently present in the 14 maize lines tested belong to the *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla. The highest population density of endophytic bacteria was found in drought-tolerant maize

y jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Gouws *et al.*, 2012).

La frecuencia de ciertos géneros de bacterias aisladas de la raíz en este estudio podría tener relación con la filogenia de estas líneas de maíz. Por ejemplo, entre las bacterias con mayor frecuencia y densidad en líneas tolerantes de maíz destacan dos especies de *Bacillus*; *Bacillus* se considera una bacteria endófito importante que se ha aislado tanto de Teozintle (ancestro del maíz) como de genotipos de maíces modernos y se demostró que la composición de la comunidad bacteriana endófito en semilla de maíz, es variable y conservada a través de la evolución, etnografía y ecología de la planta de maíz como hospedante (Johnston-Monje y Raizada, 2011).

En esta investigación se determinó que algunos de los factores: tolerancia/susceptibilidad a sequía de las líneas de maíz estudiadas, localidad, ciclo de cultivo, tiempo (días después del trasplante) afectaron significativamente la densidad de bacterias cultivables endófitas en la raíz de estos materiales genéticos de maíz. Las rizobacterias como promotores del crecimiento (PGPR), nutrición y manejo de enfermedades en plantas ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, su función en el manejo de enfermedades abióticas como el estrés a sequía es de gran interés en los últimos años (Dimpka *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2010; Kavamura *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). El uso de microorganismos endófitos puede ser una alternativa viable contra estreses bióticos y abióticos; las cepas aisladas en este estudio constituyen un recurso microbiano que está íntimamente asociados al maíz con potencial de uso biotecnológico en la agricultura que merecen ser evaluados en el futuro como inoculantes microbianos e inductores de tolerancia al estrés hídrico y otros factores bióticos y abióticos en regiones con condiciones limitantes para la producción de este cultivo en México.

lines. Bacteria of the *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Sinorhizobium* genera showed the highest frequency and population density in drought-tolerant maize lines at the three study locations and crop cycles. *Sinorhizobium meliloti* is able to endophytically colonize maize roots.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Colegio de Postgraduados and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for funding this research and for the scholarship granted, as well as the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) for providing the seed for conducting this research.

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

#### CONCLUSIONES

Las bacterias cultivables endófitas de la raíz que tuvieron mayor presencia en las 14 líneas de maíz probadas pertenecen a los phyla *Proteobacteria* y *Firmicutes*. La mayor densidad de población de bacterias endófitas se estimó en líneas de maíz tolerantes a sequía. Las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* fueron las que presentaron mayor frecuencia y densidad de población en las líneas de maíz tolerantes a sequía en las tres localidades y ciclos de cultivo estudiados. *Sinorhizobium meliloti* es capaz de colonizar endofíticamente la raíz de maíz.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por los recursos económicos y beca otorgados. Al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), por la semilla proporcionada para el desarrollo de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F and Rodríguez D. 2006 Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiology Letters* 259:67-73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00244.x>
- Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H and Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1563-1589. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1563
- Baudoin E, Benizri E and Guckert A., 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1183-1192. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2)
- Bodenhausen N, Horton MW and Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 8:e56329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Canbolat M, Bilen S, Çakmakçı R, Sahin F and Aydi A. 2006. Effect of plant growth promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* 42:350-357. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-005-0034-9>
- Cavaglieri L, Orlando J and Etcheverry M. 2009. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbiological Research* 164:391-399. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.03.006>
- Chi F, Yang P, Han F, Jing Y and Shen S. 2010. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Proteomics* 10:1861-1874. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200900694/full>
- Cochran, W. G. Técnicas de muestreo. México: Compañía Editorial Continental, 1982. 513 p.
- Dimpka C, Weinand T and Asch F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant Cell and Environment* 32:1682-1694. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x
- Fan X, Hu H, Huang G, Huang F, Li Y and Palta J. 2015. Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390:337-349. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2410-z>
- Farag MA, Zhang H and Ryu CM. 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. *Journal of Chemical Ecology* 39:1007-1018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-013-0317-9>
- FAO. 2016. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s10.html> (Consulta, marzo 2016)
- FIRA, Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. 2016. Disponible en línea: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama\\_Agroalimentario\\_Ma\\_z\\_2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/61952/Panorama_Agroalimentario_Ma_z_2015.pdf) (Consulta, febrero 2016)
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using *Bacteria*-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology* 74:7828-7831. Disponible en línea: <http://aem.asm.org/content/74/24/7828.short>
- Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF and Kharwar RF. 2015. Effect of bacterial endophyte on expression of defense in Indian popcorn against *Fusarium moniliforme*. *Symbiosis* 66:133-140. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0348-9>
- Gouws LM, Botes E and Wiese AJ, Trenkamp S, Torres-Jerez I, Tang J, Hills NP, Usadel B, Lloyd RJ, Fernie RA, Kossmann J and van der Merwe M. 2012. The plant growth promoting substance, lumichrome, mimics starch, and ethylene-associated symbiotic responses in lotus and tomato roots. *Front Plant Science* 120:1-20. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2012.00120>
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A and Venkateswarlu B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1231-1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gutiérrez-Zamora ML and Martínez-Romero E. 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology* 91:117-126. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00332-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00332-7)
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T and Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2:1221-1230. Disponible en línea: [http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/mbi010/ISME%20Journal%2012,%201221-1230\\_1.pdf](http://www.abdn.ac.uk/staffpages/uploads/mbi010/ISME%20Journal%2012,%201221-1230_1.pdf)
- Hardoim PR, Van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M and Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:293-320. Disponible en línea: <http://mmbr.asm.org/content/79/3/293.short>
- Higgins KL, Arnold AE, Miadlikowska J, Sarvate SD and Lutzoni F. 2007. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42:543-555. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.07.012>
- Ikeda CA, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M and Galli-Terasawa LV. 2013. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology* 65:154-160. DOI: 10.1007/s00248-012-0104-0
- Johnston-Monje D and Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS ONE* 6: e20396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>
- Kasim WA, Osman ME, Omar MN, Abd El-Daim IA, Bejai S and Meijer J. 2013. Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 32:122-130. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9283-7>
- Kamara YA, Menkir A, Badu-Apraku B and Ibikunle O. 2003. The influence of drought stress on growth, yield and yield components of selected maize genotypes. *Journal of*

- Agricultural Science 141:43-50. <https://doi.org/10.1017/S0021859603003423>
- Kavamura VN, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD and Melo IS. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* 168:183-191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Kim YC, Glick BR., Bashan Y and Ryu CM. 2012. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca R. (eds) *Plant responses to drought stress*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_15)
- Li X, Rui J, Mao Y, Yannarell A and Mackie R. 2014. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 392-401. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.017>
- Liu Y, Zuo S, Zou YY, Wang JH and Song W. 2013. Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology* 63:71-79. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-012-0446-3>
- Mahuku GS. 2004. A simple extraction method suitable for PCR based analysis of plant, fungal and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:71-81. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F02773351?LI=true>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2006. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbial Ecology* 52:670-678. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-006-9078-0>
- Marulanda A, Barea JM and Azcón R. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:115-124. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-009-9079-6>
- McInroy JA and Kloepper JW. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173:337-342. Disponible en línea: <https://link.springer.com/article/10.1007%2F027700011472?LI=true>
- Mehnaz S, Kowalik T, Reynolds B and Lazarovits G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1848-1856. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.003>
- Montañez A, Blanco RA, Barlocco C, Beracochea M and Sicardi M. 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. *Applied Soil Ecology* 58:21-28. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.009>
- Morales Y, Juárez D, Aragón C, Mascarua M, Bustillos M, Fuentes L, Martínez R and Muñoz J. 2011. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología* 43:287-293. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v43n4/v43n4a09.pdf>
- Nacamulli C, Bevivino A, Dalmastrì C, Tabacchioni S and Chiarini L. 1997. Perturbation of maize rhizosphere microflora following seed bacterization with *Burkholderia cepacia* MCI 7. *FEMS Microbiology Ecology*. 23:183-193. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00401.x>
- Naseem H and Bano A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance in maize. *Journal of Plant Interactions*. 9:689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Naveed M, Mitter B, Reichenauer TG, Wiczorek K and Sessitsch A. 2014. Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD 17. *Environmental and Experimental Botany* 97:30-39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Oliveira ALM, Stoels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI and Hartmann A. 2009. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* 45:106-113. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>
- Pereira P, Ibáñez F, Rosenblueth M, Etcheverry M and Martínez-Romero E. 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. *International Scholarly Research Network* 2011:1-10. DOI:10.5402/2011/938546
- Rai R, Prasanta K, Dash BM, Prasanna AS. 2007. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 23:853-858. DOI:10.1007/s11274-006-9309-z
- Rosenblueth M and Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interaction with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837. Disponible en línea: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI-19-0827>
- Roumiansteva ML and Muntyan VS. 2015. Root nodule bacteria *Sinorhizobium meliloti*: Tolerance to salinity and bacterial genetic determinants. *Microbiology* 84:303-318. DOI: 10.1134/S0026261715030170
- Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, Subbian P and Samiyappan R. 2011. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiology Plant* 33:203-209. Disponible en línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11738-010-0539-1.pdf>
- Shehata HR, Lyons EM, Jordan KS and Raizada MN. 2016. Bacterial endophytes from wild and ancient maize are able to suppress the fungal pathogen *Sclerotinia homoeocarpa*. *Journal of Applied Microbiology* 120:756-769. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jam.13050/epdf>
- Somers E, Vanderleyden J and Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*: 30:205-240. DOI: 10.1080/10408410490468786
- Timmusk S, Islam A, Abd El D, Lucian C, Tanilas T and Kananste A, Behers L, Nevo E, Seisenbaeva G, Stenström E and



- Niinemets Ü. 2014. Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One* 9:1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
- Toledo I, Lloret L and Martínez-Romero E. 2003. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 26:54-64. Disponible en línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202004701599>
- Wang E, Tan ZY, Willems A, Fernández-López M, Reinhold-Hurek B and Martínez-Romero E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a Leucaena leucocephala-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1687-1693. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-5-1687>
- Wilkinson S and Davies WJ. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell & Environment* 33:510-525. Disponible en línea: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x/full>
- Whitehead AN, Barnard LMA, Slater H, Natalie JL, Simpson G and Salmond PC. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00583.x>
- Yang J, Kloepper JW and Ryu C. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science* 14:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yasmin H, Bano A and Samiullah A. 2013. Screening of PGPR isolates from semi-arid region and their implication to alleviate drought stress. *Pakistan Journal Botany* 45: 51-58. Disponible en línea: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84873424619&origin=inward&txGid=f67ad4b109d3d368731a8b22a1f14cfa>
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, Farag MA, Ryu CM, Allen R, Melo IS and Pare PW. 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839-851. Disponible línea: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00425-007-0530-2.pdf>

# Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents

## Preservadores maderables y exudados microbianos con actividad antagonista contra agentes biológicos deletéreos

**Vanessa Ruby García-Ortiz, Gabriela Benítez-Rocha**, \*Conservación y Manejo de Recursos Forestales, Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo., General Francisco J. Mugica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México; **Mauro Martínez-Pacheco**, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo., General Francisco J. Mugica S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México; **Crisanto Velázquez-Becerra** \*. \*Autor para correspondencia: [cvelazquez@umich.mx](mailto:cvelazquez@umich.mx).

**Recibido:** 20 de Abril, 2017.

**Aceptado:** 30 de Septiembre, 2017.

García-Ortiz VR, Benítez-Rocha G, Martínez-Pacheco M, Velázquez-Becerra C. 2017. Wood preservatives and microbial exudates with antagonistic activity against biological agents. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 56-78.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1704-2

Primera publicación DOI: 10 de Noviembre, 2017.

First DOI publication: November 10, 2017.

**Resumen.** La madera de baja durabilidad es susceptible de deterioro por xilófagos y su protección es una meta tecnológica no alcanzada que genera pérdidas económicas y materiales. Alternativas para evitar el uso de preservadores convencionales tóxicos y contaminantes se pueden establecer mediante el conocimiento del microecosistema bacteriano en la madera. La protección de este material es posible obtenerla con bacterias y sus exudados.

**Abstract.** Wood of low durability is susceptible of deterioration by xylophages and its protection is a technological goal not reached that generates economic and material losses. Alternatives to avoid the use of toxic preservative conventional and contaminating can be established by knowledge of the bacterial microecosystem in the wood. The protection of this material is possible to obtain it with bacteria and its exudates. The purpose of this research is to highlight that the biodeterioration of low durability wood is avoidable by means of microbiological strategies relevant for the control of xylophages' fungi. The observation is that bacteria of the genera *Arthrobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* and their exudates are potentially protective agents that exhibit different mechanisms of action such as antagonism, parasitism and the production of exudates containing molecules with effect: antimicrobial, chelator (siderophores) that inhibit enzymes or functions and volatile

El propósito de esta investigación es destacar que el biodeterioro de la madera de baja durabilidad es evitable mediante estrategias microbiológicas relevantes para el control de los hongos xilófagos. La observación es que bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas* y sus exudados potencialmente son agentes de protección que exhiben mecanismos de acción diferentes como, el antagonismo, el parasitismo y la producción de exudados que contienen moléculas con efecto: antimicrobiano (antibióticos), quelante (sideróforos) que inhiben enzimas o funciones y compuestos volátiles (dimetilhexadecilamina). El conocimiento de este ecosistema microbiano facilitará la construcción de una alternativa al uso de los preservadores convencionales de madera y constituye un área de oportunidad. Se evidencia la ausencia del conocimiento de bacterias antagonicas de los xilófagos, el manejo de la producción y composición de sus exudados y su aplicación, con lo que se manifiesta un campo inexplorado en la biotecnología de la preservación de la madera.

**Palabras clave:** xilófagos, lignocelulósico, madera, preservación, durabilidad.

## INTRODUCCIÓN

Por la composición orgánica de la madera es susceptible al deterioro biológico. En general, está constituida por celulosa 40-61%, hemicelulosa 15-30% y lignina 17-35%, particularidad que la hace una excelente fuente de carbono para sostener el ciclo de vida de algunos organismos. La madera en uso está expuesta a organismos tales como, bacterias, algas, hongos e insectos, que al nutrirse de sus macromoléculas provocan su degradación y con ello disminuyen sus atributos físico-mecánicos y prestaciones (Ibáñez, 2012). En la diversidad

compounds (dimethylhexadecylamine). Knowledge of this microbial ecosystem will facilitate the construction of an alternative to the use of conventional wood preservatives and constitutes an area of opportunity. It is evident the absence of knowledge of antagonistic bacteria of the xylophages, the management of the production and composition of their exudates and their application, thus manifesting an unexplored field in the biotechnology of the preservation of wood.

**Key words:** xylophages' fungi, lignin, wood, preservation, durability.

## INTRODUCTION

Due to its organic composition, wood is vulnerable to biological degradation. In general, it is composed of cellulose in 40-61%, hemicellulose 15-30%, and lignin 17-35%, making it an excellent source of carbon to sustain the life cycles of some organisms. Wood in use is exposed to organisms such as bacteria, algae, fungi, and insects, which feed off their macromolecules, causing their degradation, and therefore, their physical and mechanical attributes, as well as their performance (Ibáñez, 2012). In the bacterial diversity there is a great number of genera with species capable of deteriorating wood by degrading lignin and modifying their structure, such as *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Aeromonas*, and *Nocardia* (Singh *et al.*, 2016). Also, aerobic species of the genera of *Pseudomonas* or *Achromobacter* also degrade structural polymers, which weaken the primary and secondary cell wall, with the alteration of the crystalline structure of these polymers and exposes them to promote the development of other deteriorator organisms (Zanni, 2004). Xylophagous algae are represented mainly by

bacteriana se encuentra un gran número de géneros cuyas especies son capaces de deteriorar la madera al degradar la lignina y modificar su estructura, tales como; *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Aeromonas* y *Nocardia* (Singh *et al.*, 2016). También, especies aeróbicas de los géneros de *Pseudomonas* y *Achromobacter* igualmente degradan polímeros estructurales, que debilitan la pared celular primaria y secundaria, con la alteración de la estructura cristalina de estos polímeros y los expone para favorecer el desarrollo de otros organismos deterioradores (Zanni, 2004). Las algas xilófagas, están representadas principalmente por especies de los géneros *Clorophyta*, *Chrysophyta* y *Cianophyta* que al deteriorar la madera le provocan un cambio de color, un incremento en la absorción de radiación solar y agua. Sin embargo, el deterioro que realizan las bacterias y algas es menor que el daño producido por hongos e insectos xilófagos, estos últimos representan los principales agentes causantes del biodeterioro (Flower y Gonzalez-Meler, 2015).

En la industria de la construcción y productos basados en madera, los hongos xilófagos son responsables de grandes pérdidas económicas (Arbelo y Garbuyo, 2012). Organismos “cromógenos” se encuentran en este grupo que, al penetrar el tejido leñoso mediante las hifas, alcanzan las cavidades celulares, una acción que tiene como resultado un cambio de color (Moglia *et al.*, 2015). Mientras que las especies fúngicas causantes de “pudrición” se agrupan en diferentes categorías, como las nombradas marrón o cúbica, blanca y suave o blanda. Los hongos se nutren de componentes de pared celular obtenidos mediante enzimas que degradan los polímeros estructurales y con ello alteran las propiedades físico-mecánicas de la madera. La despolimerización de macromoléculas de pared celular la realizan mediante diversas enzimas hidrolíticas que la sintetiza aceleradamente, *e.g.* la degradación de celulosa cristalina se obtiene con endo-1,4-

species of the genres *Clorophyta*, *Chrysophyta*, and *Cianophyta*, which, when deteriorating wood, cause it to change color, as well as an increase in the absorption of solar radiation and water. However, the deterioration caused by bacteria and algae is less than the damage produced by fungi and xylophagous insects, the latter of which are the main causal agents of biodeterioration (Flower and Gonzalez-Meler, 2015).

In the construction and wood-based products industries, xylophagous fungi are accountable for great economic losses (Arbelo and Garbuyo, 2012). “Chromogenic” organisms are found in this group which, when penetrating the woody tissue via the hyphae, reach the cell cavities, an action that has the result of a change in color (Moglia *et al.*, 2015). Meanwhile, the fungal species that cause “rotting” are grouped into different categories, such as the so-called white-rot, brown-rot and soft-rot. Fungi feed off the components of cell walls obtained by enzymes that degrade the structural polymers, thus alter the physical and mechanical properties of the wood. The depolymerization of cell wall macromolecules is carried out with several hydrolytic enzymes that synthesize it rapidly, *e.g.* the degradation of crystalline is obtained with endo-1,4- $\beta$ -glucanases, exo-1,4- $\beta$ -glucanases, 1,4- $\beta$ -glucosidases and other accessory enzymes (Schmidt, 2007).

Meanwhile, for a complex polymer without three-dimensional ordering such as lignin, composed of the concatenation of phenylpropanoic acids and alcohols, for its degradation and mineralization, the fungus uses an enzyme complex with activities of oxidases and peroxidases. The fungal metabolic pathway to the degradation of this polymer begins with the action of lignin peroxidase, which break carbon-carbon bonds or ether bonds within the complex molecule to produce monomers. Another interesting enzymatic complex is the one produced



$\beta$ -glucanasas, exo-1,4- $\beta$ -glucanasas, 1,4- $\beta$ -glucosidasas y otras enzimas accesorias (Schmidt, 2007).

Mientras que, para un polímero complejo sin ordenamiento tridimensional como la lignina, conformada por la concatenación de ácidos y alcoholes fenilpropílicos, para su degradación y mineralización el hongo utiliza un complejo enzimático con actividades de oxidasas y peroxidasas. La vía metabólica fúngica para la degradación de este polímero inicia con la acción de la lignina peroxidasa, la cual lisa enlaces carbono-carbono o enlaces éter dentro de la compleja molécula para generar monómeros. Otro complejo enzimático interesante es el que producen algunos basidiomicetos xilófagos que ocasionan la pudrición blanca. Este complejo incluye a la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, molécula versátil que emplean peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones y la lacasa que utiliza al oxígeno molecular. Esta última enzima es una oxidasa constituida por un co-factor con cuatro átomos de cobre, cuyo aceptor de electrones es el oxígeno molecular. También, la lacasa degrada sustratos no fenólicos más difícilmente oxidables en presencia de co-oxidantes; 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ácido violúrico (Subramanian *et al.*, 2014).

Entre los xilófagos más importantes y considerados perniciosos se tienen a los basidiomicetos, causantes de la pudrición marrón o cúbica (*e.g.* *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii*, *Lentinus lepideus*), capaces de degradar rápidamente la celulosa, hemicelulosa y modificar estructuralmente la lignina. En la pudrición blanca, los basidiomicetos y algunos ascomicetos se nutren preferentemente de lignina, aunque pueden descomponer celulosa. Por la degradación de la lignina y la gran cantidad de celulosa intacta que no utilizan estos hongos, la madera adquiere un color "blanquecino". Entre las especies fúngicas representativas se encuentra a *Trametes versicolor*,

by some xylophagous basidiomycota that cause white rot. This complex includes lignin peroxidase, manganese peroxidase, a versatile molecule that uses hydrogen peroxide as an electron acceptor, and laccase, which uses molecular oxygen. The latter enzyme is an oxidase made up of a co-factor with four copper atoms, the acceptor of electrons is molecular oxygen. Also, laccase degrades non-phenolic substrates, more difficult to oxidize in the presence of co-oxidants; 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT), 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) or violic acid (Subramanian *et al.*, 2014).

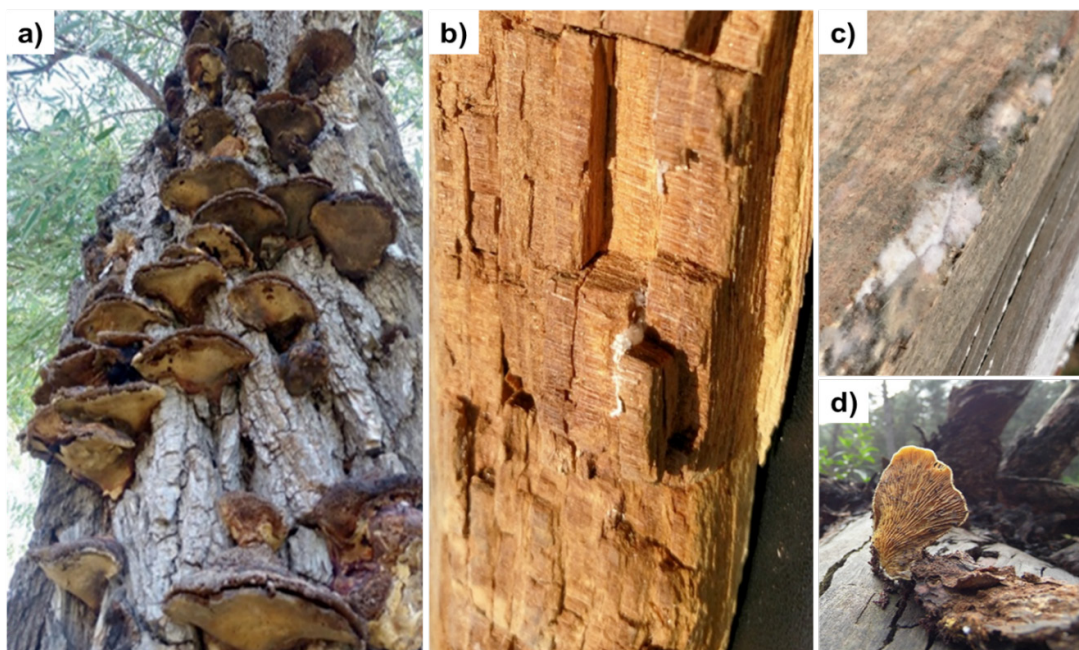
Some of the most important and harmful xylophagous organisms include basidiomycetes, which cause brown or cubid rot (*e.g.* *Serpula lacrymans*, *Coniophora puteana*, *Antrodia vaillantii*, *Lentinus lepideus*), capable of rapidly degrading cellulose, hemicellulose, and of structurally modifying lignin. In white rot, the basidiomycetes and some ascomycetes feed mostly of lignin, although they can decompose cellulose. Due to lignin degradation and the large amount of intact cellulose not used by these fungi, wood acquires a pale whit color. Some of the representative fungal species include *Trametes versicolor*, *T. hirsuta* and *Schizophyllum commune*. Meanwhile, ascomycetes that cause soft rot (*Chaetomium globosum*, *Monodictys putredinis*, *Hypocrea muroiana*, *Cryphonectria parasitica* and *Fusarium oxysporum*), the hyphae of which develop in the lumen and the inside of the secondary cell wall, mainly degrade cellulose, altering lignin structurally, causing a characteristic softening of the lignocellulosic material (Figure 1) (Patel *et al.*, 2013).

On the other hand, insects are a relevant and diverse group in the animal kingdom, with over one million species described and an amount of up to 30 million species yet to be discovered (Stork *et al.*,

*T. hirsuta* y *Schizophyllum commune*. Mientras que, los ascomicetos causantes de la pudrición suave o blanda (*Chaetomium globosum*, *Monodictys putredinis*, *Hypocrea muroiana*, *Cryphonectria parasitica* y *Fusarium oxysporum*), cuyas hifas se desarrollan en el lumen e interior de la pared vegetal secundaria, degradan principalmente celulosa alterando estructuralmente la lignina, con lo cual provocan un ablandamiento característico del material lignocelulósico (Figura 1) (Patel *et al.*, 2013).

Por otro lado, los insectos constituyen un relevante y diverso grupo dentro del reino animal, con aproximadamente más de un millón de especies descritas y una cantidad de hasta 30 millones de especies aún por conocer (Stork *et al.*, 2015). Asimismo, ellos exhiben una amplia versatilidad para nutrirse y sobrevivir. En relación con el hábito alimentario, los insectos utilizan, *e.g.* tejido vegetal

(2015). Likewise, they present a broad versatility to feed and survive. In terms of feeding habits, insects use, *e.g.* fresh plant tissue, organic animal matter in decomposition or dead plant matter. Such is the case of wood, and xylophagous insects carry this with the perforation and formation of galleries in search for cellulose and starch. This produces physical and mechanical damage and chromatic alterations in stored wood, process, service, and standing trees (Table 1) (Zanni, 2008). The insects that stand out in this group are *coleoptera* (beetles or woodworms) and *lepidoptera* (butterflies and moths), as well as *isoptera* (termites) and *hymenoptera* (wasps and ants). *Isoptera* and *coleoptera* are pointed out as producers of considerable damage to wooden structures and houses (NMX-C-222-1983; Blackwell and d'Errico 2000). Also, in large portions of North and Central America, bark



**Figura 1.** Daño provocado por hongos xilófagos en árbol en pie *Ganoderma applanatum* (a), en la construcción *Antródia vaillantii* (b), madera aserrada *Ceratocystis* sp. (c) y madera derribada *Pleurotus ostreatus* (d).

**Figure 1.** Damage caused by xylophagous fungi in a standing *Ganoderma applanatum* tree (a), in the construction *Antródia vaillantii* (b), sawn wood *Ceratocystis* sp. (c) and felled wood *Pleurotus ostreatus* (d).

fresco, materia orgánica en descomposición de origen animal o materia muerta vegetal. Tal es el caso de la madera y los insectos xilófagos, lo hacen mediante la perforación y formación de galerías en la búsqueda de celulosa y almidón. Con ello producen daño físico, mecánico y alteraciones cromáticas en madera almacenada, proceso, servicio y árboles en pie (Cuadro 1) (Zanni, 2008). En este grupo de insectos, destacan los *coleópteros* (escarabajos o carcomas) y *lepidópteros* (mariposas y polillas), al igual que *isópteros* (termitas) e *himenópteros* (avispas y hormigas). Los *isópteros* y *coleópteros* son señalados por producir daños considerables a estructuras y bienes inmuebles de madera (NMX-C-222-1983; Blackwell y d'Errico 2000). También, en gran parte del Norte y Centro América insectos descortezadores del género *Dendroctonus* (*D. frontalis*, *D. mexicanus*) son la principal plaga en bosques de pino, anualmente miles de árboles se pierden por el perjuicio provocado (FAO, 2007).

La protección de la madera de baja durabilidad con preservadores químicos, aunque práctica y económica es eco-tóxica, requiere su reemplazo

insects of the genus *Dendroctonus* (*D. frontalis*, *D. mexicanus*) are the main pest in pine forests; they cause the loss of thousands of trees (FAO, 2007).

The protection of low-durability wood with chemical preservatives, however practical and cheap, is eco-toxic and requires immediate replacement with eco-friendly preservatives. Therefore, the purpose of this work is to establish the bases of protection for wood using microbiological strategies.

### Classification of wood according to its resistance to xylophagous organisms

Wood can be categorized according to its use and durability (NMX-C-239-1985) and is subject to different levels of risk and to deterioration by xylophagous organisms. The different resistance present in this material is due to different structural and chemical factors contained in the woody tissue, typical variables of the species, age and development conditions at the time of cutting down. According to A.S.T.M D-2017-81, the classification of wood

**Cuadro 1. Principales insectos xilófagos y las características de los daños que ocasiona en la madera.**  
**Table 1. Main xylophagous insects and the characteristics of the damages they cause on wood.**

| Orden       | Familia      | Especie                                             | Madera afectada                                                                                                           | Ciclo biológico | Autor                        |
|-------------|--------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Isoptera    | Termitidos   | <i>Reticulitermes lucifugus</i> Rossi               | Todas (celulosa), los insectos forman galerías separadas por finos tabiques.                                              | Variable        | Ulyshen, 2015                |
| Lepidoptera | Cossidos     | <i>Cossus cossus</i> L.                             | Latifoliadas con humedad, producen grandes orificios separados por tabiques gruesos, generando galerías ovales y limpias. | 3 años          |                              |
| Hymenoptera | Sirícidos    | <i>Sirex gigas</i> L.<br><i>Paururus Juencus</i> L. | Trozas de resinas húmedas.<br>Coníferas, forman galerías circulares llenas de aserrín.                                    | 3 años          |                              |
| Coleoptera  | Bostríchidos | <i>Apate capucina</i> L.                            | Latifoliadas verdes, forman galerías limpias en forma de Y; Galerías larvarias llenas de aserrín.                         | 1 año           | Berrocal, 2007;              |
|             | Líctidos     | <i>Lictus linearis</i> Goez                         | Latifoliadas tropicales, se producen galerías de diámetro intermedio.                                                     | 1 año           | Agboton <i>et al.</i> , 2017 |
|             |              | <i>Lictus brunneus</i> Steph.                       | En maderas tropicales se sabe que forman galerías circulares llenas de aserrín.                                           | 1 año           |                              |

inmediato con preservadores eco-amigables. Por lo que el propósito de este trabajo es establecer las bases de la protección de la madera mediante estrategias microbiológicas.

### Clasificación de la madera de acuerdo con su resistencia a xilófagos

La madera puede ser categorizada según el uso y durabilidad (NMX-C-239-1985) y está sujeta a distintos niveles de riesgo y al deterioro por xilófagos. La diferente resistencia presente en este material se debe a diversos factores estructurales y químicos contenidos en el tejido leñoso, variables propias de la especie, edad y condiciones de desarrollo al momento de la tala. De acuerdo con A.S.T.M D-2017-81, la clasificación de la madera por su durabilidad natural se observa en el Cuadro 2A. Esta característica se pondera en años, dicho de otra forma, cuanto tiempo es capaz de mantener sus propiedades mecánicas después del contacto con factores am-

by its natural durability is shown in Table 2A. This feature is pondered in years, or in other words, how long it is capable of maintaining its mechanical properties after making contact with environmental factors. Later, the Board of the Cartagena Agreement (1988) categorized this material into five classes, according to the deterioration produced by xylophagous organisms (Table 2B). However, Bobadilla *et al.*, (2005) catalogue its resistance according to the "Findlay Criterion", by weight loss after the attack by fungi (Table 2C) (Findlay, 1951). The latter criterion highlights the importance of wood deterioration cause by xylophagous fungi, as well as the relevance of their control in which it is possible to use microbiological methods with this goal.

### Main chemical preservatives used on wood

The chemical wood preservation industry started in the 19th Century and has had great

**Cuadro 2. Criterios y clasificación de la madera con base a su resistencia y durabilidad natural.**  
**Table 2. Criteria and classification of wood based on its natural resistance and durability.**

| A) Clasificación de la resistencia de la madera por su durabilidad natural (A.S.T.M D-2017-81)                   |                               |                                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Promedio de pérdida de peso (%)                                                                                  | Promedio de peso residual (%) | Clasificación y resistencia          |
| 0-10                                                                                                             | 90-100                        | Altamente resistente                 |
| 11-24                                                                                                            | 76-89                         | Resistente                           |
| 25-44                                                                                                            | 56-75                         | Moderadamente resistente             |
| 45 o más                                                                                                         | 55 o menos                    | Ligeramente resistente/no resistente |
| B) Clasificación de la durabilidad natural de las maderas en el caso de deterioro producido por hongos xilófagos |                               |                                      |
| Años                                                                                                             |                               | Durabilidad                          |
| Más de 20                                                                                                        |                               | Muy durable                          |
| 15- 20                                                                                                           |                               | Durable                              |
| 15-10                                                                                                            |                               | Moderadamente durable                |
| 10-5                                                                                                             |                               | Poco durable                         |
| Menos de 5                                                                                                       |                               | No durables                          |
| C) Clasificación por resistencia de las maderas de acuerdo con la pérdida de peso                                |                               |                                      |
| Pérdida de peso (%)                                                                                              |                               | Categoría de resistencia             |
| Inferior a 5                                                                                                     |                               | Muy resistente                       |
| 5-10                                                                                                             |                               | Resistente                           |
| 10-20                                                                                                            |                               | Moderadamente resistente             |
| 20-30                                                                                                            |                               | No resistente                        |
| Superior a 30                                                                                                    |                               | Sin resistencia                      |



bientales. Posteriormente, la Junta del Acuerdo de Cartagena (1988) categoriza este material en cinco clases, acorde al deterioro producido por xilófagos (Cuadro 2B). Sin embargo, Bobadilla *et al.*, (2005) catalogan su resistencia conforme al “Criterio de Findlay”, por pérdida de peso después del ataque por hongos (Cuadro 2C) (Findlay, 1951). Este último criterio destaca la importancia del deterioro de la madera causado por hongos xilófagos, así como la relevancia de su control en donde es posible utilizar métodos microbiológicos con tal fin.

### Principales preservadores químicos utilizados en madera

La industria de la preservación química de la madera se desarrolló hasta el comienzo del siglo XIX debido a que ha sido de gran importancia tecnológica, social, histórica y económica, ya que el hombre ha intentado protegerla del deterioro físico y biológico con diversos agentes preservadores. Las mezclas de sales minerales con moléculas orgánicas han sido extremadamente eficaces, donde su clasificación depende de su naturaleza y función (ver el Cuadro 3). Estas sales controlan hongos e insectos en madera en servicio y que está en contacto con el suelo. Su uso se oficializó por la agencia estadounidense protectora de madera (AWPA por sus siglas en inglés) mediante la norma P5-83, tiempo después en México se oficializó (AWPA P5-83). Compuestos como las sales de Cobre-cromo-arsenicales (CCA) son preservadores extremadamente efectivos. Materiales lignocelulósicos tratados con CCA expuestos a condiciones ambientales extremas pueden mantener una vida útil por décadas. Una comprobación realizada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA). Donde se demostró que estacas de madera preservada con CCA, resistieron al ataque de diversos organismos xilófagos por más

technological, social, historical and economic importance, since humans have tried to protect wood from physical and biological deterioration with different preserving agents. The mixtures of mineral salts with organic molecules have been extremely efficient; their classification depends on their nature and function (see Table 3). These salts control fungi and insects in wood in service and that is in touch with the ground. Its use was officialized by the American Wood Protection Association (AWPA) by norm P5-83, and some time later, it became official in Mexico (AWPA P5-83). Compounds such as Copper-chromium-arsenical (CCA) salts are extremely effective preservatives. Lignocellulosic materials treated with CCA exposed to extreme environment conditions can have a lifespan of decades. A verification carried out by the United States Department of Agriculture (USDA) showed that wooden stakes preserved with CCA resisted the attack of diverse xylophagous organisms for over 60 years; the USDA foresees a lifespan of these materials five to ten times longer than without any preservations.

The indiscriminate release of these pesticides in uses of wood has contributed to the alarming deterioration of the ecosystem in order to increase the average lifespan of wood products at a minimum cost. This social and cultural practice is now an emerging and multi-factor environmental problem with a complex solution. However, in the 20th Century, some control measurements were set in motion for the release of pesticides in developed countries which were then copied and adapted in developing countries. One of them was the Food Quality Protection Act emitted by the U.S. government in 1966, and which included a proposal to drastically restrict the use of conventional pesticides. At the same time, the definition of pesticide proposed by the World Health Organization (WHO) was modified, and

**Cuadro 3. Principales sustancias utilizadas en la industria de la preservación de madera.**  
**Table 3. Main substances used in the wood preservation industry.**

| Criterio                       | Tipo                                        | Sustancia                                                                                                                                                                             | Autor                                                        |                      |
|--------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------|
| De acuerdo con el tipo de daño | Pudrición                                   | 1-Cromo, Cobre y Arsénico (CCA)/CrO <sub>3</sub> 65.5, CuO 18.1, Ar <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 16.4                                                                                  | AWPA P5-83                                                   |                      |
|                                |                                             | 2-Cobre, Azoles orgánicos (CA)                                                                                                                                                        |                                                              |                      |
|                                |                                             | 3-Cobres, Azoles orgánicos y Boro (CAB)                                                                                                                                               |                                                              |                      |
|                                |                                             | 4-Cobre y Amonios Cuaternarios (ACQ)                                                                                                                                                  |                                                              |                      |
|                                |                                             | 5- Boro                                                                                                                                                                               |                                                              |                      |
|                                | Mancha azul                                 | 6-Quinolinolato de cobre/C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                              | Lebow <i>et al.</i> , 2015                                   |                      |
|                                |                                             | 7-Tribromofenato de sodio/C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>3</sub> NaO                                                                                                           |                                                              |                      |
|                                | Retardantes de fuego                        | 8-Carbendazimas/ C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                                                                                                          | NMX-C-222-1983                                               |                      |
|                                |                                             | 9-Tetraborato de sodio/Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O 10-Ácido bórico/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 11-Sulfatos y fosfatos amónicos              |                                                              |                      |
|                                | Protectores contra luz ultravioleta y calor | 12-Pinturas con pigmentos metálicos                                                                                                                                                   | Veronovski <i>et al.</i> , 2013; Auffan <i>et al.</i> , 2014 |                      |
|                                |                                             |                                                                                                                                                                                       |                                                              |                      |
|                                | De acuerdo con su naturaleza química        | Oleosos                                                                                                                                                                               | 13-Creosota                                                  | Singh y Singh, 2014; |
| Oleosolubles                   |                                             | 14-Pentaclorofenol (PCF)/C <sub>6</sub> HCl <sub>5</sub> O                                                                                                                            | Freeman <i>et al.</i> , 2003                                 |                      |
|                                |                                             | 15-Naftenatos                                                                                                                                                                         |                                                              |                      |
|                                |                                             | 16-Pentaclorofenato de sodio/C <sub>6</sub> Cl <sub>5</sub> NaO                                                                                                                       |                                                              |                      |
| Hidrosolubles                  |                                             | 17-Oxido tributil estañoso/C <sub>24</sub> H <sub>54</sub> OSn <sub>2</sub>                                                                                                           |                                                              |                      |
|                                |                                             | 18-Quinolinolato de cobre/ C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> CuN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                                                                            |                                                              |                      |
|                                |                                             | 19-Sales múltiples                                                                                                                                                                    |                                                              |                      |
|                                |                                             | 20-Arsénico-cobre-amoniacaes (ACA)/As <sub>2</sub> 50,20 %, Cu 49,80 %                                                                                                                |                                                              |                      |
|                                |                                             | 21-Cobre-cromo-arsenicales (CCA)/As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -5H <sub>2</sub> O 56 %, SO <sub>4</sub> Cu-2H <sub>2</sub> O 33 %, C <sub>2</sub> O <sub>7</sub> K <sub>2</sub> 11 % |                                                              |                      |
|                                |                                             | 22-Cobre-cromo-boro (CCB)/CuO, Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                                                                        |                                                              |                      |
|                                |                                             | 23-Compuestos de boro                                                                                                                                                                 |                                                              |                      |
|                                |                                             | 24-Cromo-Zinc-Cloro (CZC)/CrO <sub>3</sub> 20 %, Cl <sub>2</sub> Zn 80 %                                                                                                              |                                                              |                      |
| Otras sales                    |                                             | 25-Flúor-Cromo-Arsénico-Fenol                                                                                                                                                         |                                                              |                      |

de 60 años, la USDA predice una vida útil para estos materiales de cinco a diez veces mayor que sin preservar.

La liberación ambiental indiscriminada de estos plaguicidas de uso en la madera ha coadyuvado al alarmante deterioro del ecosistema. Con la finalidad de aumentar la vida media de productos maderables a un mínimo costo económico. Una práctica sociocultural que ahora es un problema ambiental emergente y multifactorial cuya solución es compleja. Sin embargo, en el siglo XX algunas medidas de control para la liberación de plaguicidas se pusieron en marcha en países desarrollados, que

included biopesticides, such as dissuasive agents with a confounding effect, inhibitor of oviposition, anti-feeding and repellent, as well as biological control agents (Konradsen *et al.*, 2003). With these measures adopted and adjusted for Mexican Legislation, a new academic, biotechnological and commercial opportunity opens up for the design of preservatives of microbiological origin for their use on low-durability wood. The control of the biodeterioration of lignocellulosic materials with preservatives based on the lifestyle and microbial strategies of ecological invasion is a non-toxic alternative.

tiempo después fueron copiadas y adaptadas en los países subdesarrollados. Una de ellas fue Food Quality Protection Act emitida por el gobierno estadounidense en 1996. En ella, se propuso restringir drásticamente el uso de insecticidas convencionales. Paralelamente, la definición de plaguicida propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se modificó e incluyó a los bioplaguicidas tales como los agentes disuasivos con efecto confusor, inhibidor de la oviposición, anti-alimentario y repelente, así como a los agentes de control biológico (Konradsen *et al.*, 2003). Con estas medidas adoptadas y adecuadas en la legislación mexicana, una nueva oportunidad académica, biotecnológica y comercial se propicia para el diseño de preservadores de origen microbiano para su aplicación en madera de baja durabilidad. El control del biodeterioro de materiales lignocelulósicos mediante preservadores basados en el estilo de vida y estrategias microbianas de invasión ecológica es una alternativa no tóxica.

### **Compuestos de origen natural con potencial preservador de madera**

Hoy en día, métodos de protección con componentes naturales son la alternativa tecnológica para sustituir a los convencionales y nocivos preservadores de la madera de baja durabilidad. La aplicación de esta tecnología eco amigable es lenta y escasamente popular, debido a la practicidad y efectividad a bajo costo económico de los preservadores convencionales.

Dentro de los métodos alternativos en la preservación se exhiben debilidades tecnológicas que se tienen que superar y que son el reto que enfrentar, resolver con rapidez, debido al alarmante deterioro ambiental y al cambio de actitud gubernamental. Entre ellas se incluyen a, las diferencias obtenidas en condiciones controladas (laboratorio) y el

### **Natural compounds with wood preserving potential**

Nowadays, protection methods with natural components are the technological alternative to replace the conventional and harmful preservatives for low-durability wood. The use of this eco-friendly technology is slow and scarcely popular, due to the practicality and effectiveness at a low cost of conventional preservatives.

Among the alternative preservation methods, there are technological flaws that must be overcome, and that are the challenge to be faced, solved rapidly due to the alarming environmental deterioration and the change in attitude of the government. Some of these methods include the differences obtained under controlled conditions (laboratory) and the yield in the field, hardships in efficiency related to exposure, environmental conditions, and legislation conflicts worldwide (Singh and Singh, 2012). However, different natural compounds have justified their efficiency as wood preservatives. Historically, plant extracts were the molecular basis for the chemical synthesis of pyrethroids and nicotinoids. Another successful example of insecticides are derived from the *Azadirachta indica* (neem) or *Enterolobium cyclocarpum* (guanacaste) trees, such as their essential oils or compounds contained in the heartwood, such as azadirachtin (Martinez *et al.*, 2012; Raya-González *et al.*, 2013). Likewise, microbial agents of biological control of known use and efficiency, and that compose a paradigm in the control of pests, such as *Bacillus thuringiensis*, encourages to know the style and the life cycle of bacteria and other microorganism so as to use them in the preservation of wood. Likewise, new or novel synthetic molecules and natural products with biological activity such as pest controllers are surfacing, as a partial solution for the control of deleterious organisms that damage

rendimiento en campo, las dificultades en eficacia relacionada con la exposición, condiciones ambientales y conflictos en legislación a nivel mundial (Singh y Singh, 2012). Sin embargo, compuestos naturales diferentes, han justificado su eficacia como perseverantes de la madera. Históricamente, los extractos de plantas fueron la base molecular para la síntesis química de los piretroides y nicotinoides. Otro ejemplo exitoso de insecticidas son los derivados de los árboles *Azadiracta indica* (neem) o de *Enterolobium cyclocarpum* (parota), tales como sus aceites esenciales o componentes contenidos en el duramen como la azadiractina (Martínez *et al.*, 2012; Raya-González *et al.*, 2013). Asimismo, agentes microbianos de control biológico de conocido uso, eficacia y que conforman un paradigma en el control de plagas, tal como *Bacillus thuringiensis*, motiva a conocer el estilo y ciclo de vida de bacterias y otros microorganismos con la finalidad de usarlos en la preservación de la madera. De igual forma, nuevas o novedosas moléculas sintéticas y productos naturales con actividad biológica como controladores de plagas están surgiendo como una solución parcial para el control de organismos deletéreos que dañan la madera (Damian *et al.*, 2010; González-Laredo *et al.*, 2015; Ramírez-López *et al.*, 2016).

La planta sintetiza metabolitos secundarios en la corteza, fruto, hoja, madera, semilla o raíz. Su presencia se evidenciará de acuerdo con su entorno, a sus ciclos circadianos y de vida, donde su función vegetal es variada, entre las que destaca la defensa vegetal y en este arsenal químico vegetal se han descrito compuestos bioactivos inhibidores del crecimiento de patógenos. Al respecto, extractos en hoja de *Cinnamomun zeylanicum* Ness. contiene componentes que son eficaces para combatir algunos hongos y termitas xilófagas (Cheng *et al.*, 2006; Tascioglu *et al.*, 2013). Recientemente Singh y Singh (2012) reportaron que sustancias de hojas

wood (Damian *et al.*, 2010; González-Laredo *et al.*, 2015; Ramírez-López *et al.*, 2016).

The plant synthesizes secondary metabolites in the bark, fruit, leaf, wood, seed, or root. Its presence will become evident according to its surroundings, its circadian rhythm and life cycles, where its plant function is varied, including plant defense, and in this chemical arsenal of the plant, several bioactive compounds, inhibitors of the growth of pathogens, have been described. In this regard, extracts in *Cinnamomun zeylanicum* Ness. leaves contain components that are efficient to fight some xylophagous fungi and termites (Cheng *et al.*, 2006; Tascioglu *et al.*, 2013). Singh and Singh (2012) recently reported that leaf substances in *Elaeocarpus dentatus* display antifungal activities (brown rot), like *Citrus x limon*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum zeylanicum* Ness. *Syzygium aromaticum* essential oils, are efficient to control growth in xylophagous fungi that produce mold; the most typical are species of the genres *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* and *Aspergillus* (Yang and Clausen, 2007; Matan and Matan, 2008) (Table 4). Other studies reported by Kartal *et al.*, (2009) show a comparison of formulations based on cinnamaldehyde, cinnamic acid, cassia oils, and wood tar, which inhibited growth in *Tyromyces palustris* and *Trametes versicolor*, as well as providing resistance against the underground termite *Coptotermes formosanus*. Authors such as Stirling *et al.*, (2007) pointed out that *Cedrela odorata* L. compounds present a biocidal action, due to tujaplicin,  $\beta$ -tujaplicinol, and plictic acid, toxic in *Coniophora puteana*, *Postia placenta* and *Trametes versicolor*, with metal chelating characteristics. Plictic acid and ácido plicático and  $\beta$ -tujaplicinol simultaneously showed an interesting antioxidant activity. Tascioglu *et al.* (2012) reported that both bark (*Acacia mollissima*) and heartwood (*Schinopsis*



en *Elaeocarpus dentatus* presentan actividad antifúngica (podredumbre parda), de igual forma, aceites esenciales de *Citrus x limon*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomun zeylanicum* Ness. y *Syzygium aromaticum*, son eficaces para el control de crecimiento en hongos xilófagos productores de moho, los más típicos son especies del género *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus* (Yang y Clausen, 2007; Matan y Matan, 2008) (Cuadro 4). En otros estudios reportados por Kartal *et al.*, (2009), muestran una comparación de formulaciones a base de cinamaldehído, ácido cinámico, aceites de cassia y alquitrán de madera, los cuales inhibieron el crecimiento en *Tyromyces palustris* y *Trametes versicolor*, además de proporcionar resistencia contra la termita subterránea *Coptotermes formosanus*. Autores como Stirling *et al.*, (2007) señalaron que compuestos de *Cedrela odorata* L. presentan acción biocida, debida a tujaplicina,  $\beta$ -tujaplicinol y ácido plicático, tóxicos en *Coniophora puteana*, *Postia placenta* y *Trametes versicolor*, con características quelantes de metales, simultáneamente el ácido plicático y  $\beta$ -tujaplicinol, mostraron una interesante actividad antioxidante. Tascioglu *et al.* (2012) reportaron que extractos de corteza (*Acacia mollissima*) y duramen (*Schinopsis lorentzii*), mostraron actividad antifúngica debido al gran contenido de taninos condensados, de igual forma, los flavonoides exhibieron una actividad inhibitoria del crecimiento de los hongos *Coniophora puteana*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* y *T. versicolor* (Carrillo-Parra *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2013). Se evidencia que las plantas presentan un variado perfil de metabolitos secundarios, que reprimen el crecimiento de una vasta variedad de microorganismos. Sin embargo, el interés se enfoca en la búsqueda de nuevos componentes vegetales para el control de patógenos y se discrimina su importancia en el control de microorganismos deterioradores. Por tanto, la relevancia de

*lorentzii*) samples displayed antifungal activity due to the large content of condensed tannins. Likewise, flavonoids presented an activity of growth inhibition of the fungi *Coniophora puteana*, *Irpex lacteus*, *Pleurotus ostreatus* and *T. versicolor* (Carrillo-Parra *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2013). The plants present a varied profile of secondary metabolites, that suppress the growth of a wide variety of microorganisms. However, our interest is placed in the search for new plant components for the control of pathogens and their importance in the control of deteriorant microorganisms is discriminated. Therefore, the relevance of plant components in the protection of low-durability wood is a priority and calls for immediate attention.

#### **Bacterial activity antagonistic to xylophagous fungi**

Apart from components identified as having wood preservation capabilities from plants, such as essential oils, waxes, saps and extractives, there is a proposal to use microorganisms or their exudates as agents with antagonistic activity in the protection of wood against biological deterioration.

Out of the group of fungi that produce exudates, the species of the genus *Trichoderma* stand out, which suppress the growth of plant pathogens by microparasitism processes and/or the production of antifungal toxins (Widmer, 2014). Also, a wide group of bacteria are able to antagonize the development of some fungi using various action mechanisms. This group includes plant growth-promoting rhizobacteria (PGPRs), which, by producing siderophores (Saha *et al.*, 2016), antibiotics (Tariq *et al.*, 2017) or by competition for colonization spaces in roots and the production of organic compounds (COVs), generate an excellent and a distinctive antimicrobial effect (Table 5).

**Cuadro 4. Principales hongos causantes pudrición blanca y parda en madera (Guillén *et al.*, 2005; Schwarze, 2007; Singh y Singh, 2014).  
Table 4. Main fungi responsible for white rot and brown rot in wood (Guillén *et al.*, 2005; Schwarze, 2007; Singh y Singh, 2014).**

| Especie fúngica                  | Tipo de pudrición        | Madera afectada                                                    | Características del hongo                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Infección                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Xylaria hypoxylon</i>         | Blanca (esponjosa)       | Latifoliadas, recientemente apeada o apilada.                      | Carpóforo anamorfo bifurcado y filamentosos, de himenio inserto en la superficie externa del ascoma (negro), ausente de pie, sabor u olor.                                                                                                                                                                                   | Se desarrolla sobre materia vegetal en descomposición, debido a la degradación de lignina produce podredumbre blanca.                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>Eutypa flavovirens</i>        | Blanca (fibroso veteado) | Latifoliadas tanto en pie como recién apeadas.                     | Tiene pseudostromas, peritecios con paredes oscuras, ascas cilíndricas, diatripáceos en forma alargada con ascosporas.                                                                                                                                                                                                       | Ascomicetos que desarrollan fructificaciones sobre la madera, se ablanda, vetea, con cavidades; pierde peso: hifas de 0.5 a 5 µ, de q las menores, azuladas. Parte superior de los cuerpos fructíferos con pelos característicos.                                                                                                                                                |
| <i>Stereum hirsutum</i> Willd    | Blanca                   | Latifoliadas tanto en pie como recientemente apeadas.              | Los cuerpos de fructificación son costrosos, en visera, ondulados, grises en la parte superior y amarillentos en la parte inferior.                                                                                                                                                                                          | Saprofita de madera muerta o viva, produciendo podredumbre blanca, basidiomicete responsable de la pudrición blanca de la madera, presenta fuerte actividad ligninolítica lacasa y manganeso peroxidasa.                                                                                                                                                                         |
| <i>Schizophyllum commune</i> Fr. | Blanca                   | De coníferas y latifoliadas con alta humedad (Roble, Haya y Pino). | Cuerpos de fructificación encespelados, blancos de 3 cm y cubiertos de pelillos finos. Laminillas de los cuerpos de fructificación con borde partido a lo largo de toda su longitud.                                                                                                                                         | Presenta actividad lacasa, manganeso peroxidasa y las lignino peroxidasa. Inespecífico de hospedero, se reporta creciendo sobre madera muerta o árboles en pie. Considerado una plaga causando daños a los árboles de plantaciones forestales, parques y jardines.                                                                                                               |
| <i>Polysticus versicolor</i> Fr. | Blanca (fibrosa)         | Latifoliadas y algunas coníferas.                                  | La madera se decolora y las manchas se extienden: Hifas de 0,5 a 5 µ; cuerpo fructífero con tubos en la parte inferior sensible a los taninos. Cuerpos de fructificación coloreados superiormente de forma concéntrica.                                                                                                      | En considerado un hongo agresivo para la madera, degradándola rápidamente, parasitando árboles en pie. La infección se extiende de arriba y abajo del tronco desde el punto de inicio, recorriendo hacia fuera en las ramas e incluso en las raíces. En los árboles vivos el hongo produce esporóforos en gran abundancia, pero rara vez se produce fructificación en la madera. |
| <i>Chaetomium globosum</i> Kunze | Parda y blanca           | De coníferas y latifoliadas con altos grados de humedad.           | Hongo con fuerte presencia en suelo y plantas, se caracteriza por degradar la pulpa craft, Esta especie forma un micelio escaso y delgado, pero con numerosos ascocarpos verde oliva, que se distribuyen uniformemente sobre la superficie de la colonia.                                                                    | Ataca a la madera que queda superficialmente blanda y al secar se resquebraja. Resiste a la anaerobiosis; los daños dependen de la densidad de la madera y la presencia de sales. Produce cavidades en la subcapa S2 de la pared celular.                                                                                                                                        |
| <i>Serpula lacrymans</i> Wulf.   | Parda seca (cúbica)      | Coníferas y latifoliadas con distintos grados de humedad.          | La madera se decolora, ablanda y agrieta: micelio externo de blanco pasa a rojo, coloreado quinoide; hifas de 2,5 a 4 µ. Micelio incoloro muy ramificado, hifas de 1,8 µ. Cuerpos de fructificación con basidiosporas que colorean de rojo-oro viejo. Cordones miceliares, los rizomorfos para transporte de agua, de 5,8 µ. | Organismo causante de severos daños a la madera, con la capacidad de generar pudrición en bajas condiciones de humedad. <i>S. lacrymans</i> es considerado como el destructor más perjudicial de materiales de construcción de madera en interiores en regiones templadas.                                                                                                       |

**Continúa Cuadro 4.**  
**Continued Table 4.**

|                                   |              |           |                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------|--------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lenzites abietina</i><br>Bull. | Parda húmeda | Coníferas | Cuerpos de fructificación coloreados, hifas de 4 µ. Cistidios de gran tamaño.                                                                                                                                                       | Organismo con alta presencia en construcciones y todo tipo de objetos manufacturados con madera, degradan la celulosa y lignina en menor medida. En sitios en donde se almacena la madera, este hongo produce pérdida de peso en este material lignocelulósico. La madera se colorea, amarillenta, obscurece. Micelio blanco pasa a marrón purpura; hifas de 1-2,5 µ. Resistente a las creosotas, a altas temperaturas, a los medios anaeróbicos. Sin luz origina fructificación. |
| <i>Lentinus lepideus</i>          | Parda húmeda | Coníferas | Se distingue por presentar un sombrero convexo de 12 cm y pie de 7cm Cutícula de blanco a crema, escamosa. Láminas adnatas y decurrentes, espaciadas. Saprofito de troncos, tocones, muebles, madera vieja de ferrocarril y postes. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

los componentes vegetales en la protección de la madera de baja durabilidad se establece como una prioridad de atención inmediata.

#### Actividad bacteriana antagónica de hongos xilofagos

Además de componentes identificados con capacidad preservante de madera, procedentes de plantas como aceites esenciales, ceras, resinas y extractivos, se propone la opción de utilizar a los microorganismos o sus exudados como agentes con actividad antagónica en la protección de la madera contra el deterioro biológico. Del grupo de hongos productores de exudados destacan las especies fúngicas del género *Trichoderma*, que reprimen el crecimiento de fitopatógenos mediante procesos de micoparasitismo y/o producción de toxinas antifúngicas (Widmer, 2014). También, un amplio grupo de bacterias son capaces de antagonizar el desarrollo de algunos hongos mediante variados mecanismos de acción. En este grupo se encuentran las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), que por medio de la producción de sideróforos (Saha *et al.*, 2016), antibióticos (Tariq *et al.*, 2017) o competencia por espacios de

COVs are organic molecules with a molecular mass of <300 Da and their main characteristic is a high vapor pressure that facilitates its volatilization (Zou *et al.*, 2007). Some have anti-fungal potential and can act at a distance by diffusion in the air *e.g.* la rhizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, in an *in vitro* system, limited the growth of the fungi *Botrytis cinerea* and of the oomycete *Phytophthora cinnamomi*, due to the production of amine dimethylhexadecylamine (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013). Likewise, with this experimental approach, Orozco-Mosqueda *et al.*, (2015) characterized the anti-fungal activity of diverse amines with antagonistic action on four strains of the xylophagous fungi *Hypocrea* sp. (UMTM3) and *Fusarium* sp. (UMTM13) obtained by fungal scrutiny in wood in decomposition, the origin of which was a pine-oak forest. The *vitro* test showed that the amines evaluated presented an inhibiting effect on the growth of the UMTM fungal isolations, in which dimethylhexadecylamine stood out. Due to its fungal deadliness, it is a potentially useful biomolecule in the preventive treatment of wood against the attack of xylophagous fungi and blue stain fungus. Included in the main bacterial genuses identified as producers of COVs is *Pseudomonas*,

colonización en raíces y producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs), generan un excelente y distintivo efecto antimicrobiano (Cuadro 5).

Los COVs son moléculas orgánicas con masa molecular de <300 Da, se caracterizan por tener una alta presión de vapor que facilita su volatilización (Zou *et al.*, 2007). Algunos tienen potencial antifúngico y pueden actuar a distancia a través de su difusión por el aire *e.g.* la rizobacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2, en un sistema *in vitro* limitó el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* y

since *Pseudomonas* spp. synthesize hydrocyanic acid (HCN), a growth inhibitor in lignocellulosic pathogens. This metabolite is produced from glycine in essentially microaerophilic conditions, where the HCN synthetases codified by the genes *hcnABC* are crucial for the competition of *P. fluorescens* (Haas and Défago, 2005). Other bacterial species of this genus that produce fungicides are *P. chlororaphis* (cyclohexanol), *P. corrugata* (2-ethyl-1-hexanol), *P. aurantiaca* (nonanal, benzothiazole and dimethyl sulfate). The compound 2,4-Di-*tert*-butylphenol

**Cuadro 5. Clasificación de las PGPRs de acuerdo con el antagonismo con fitopatógenos.**  
**Table 5. Clasificación de las PGPRs depending on the antagonism with phytopathogens.**

| PGPRs     | Microrganismo antagonico                                                                       | Compuesto sintetizado                                                                                                                                                    | Efecto inducido en plantas y fitopatógenos                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Autor                                           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|           | <i>Bacillus pumilus</i> y <i>Bacillus licheniformis</i> .                                      | Giberelinas GA1, GA2, GA3 y GA4                                                                                                                                          | Elongación del tallo de aliso ( <i>Alnus glutinosa</i> [L.] Gaertn.).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Gutiérrez-Mañero <i>et al.</i> , 2001           |
| Directo   | <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>                                   | Ácido indol acético, sideróforos y ácido salicílico                                                                                                                      | Son eficientes en la promoción del crecimiento vegetal en cultivos de importancia económica.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Sivasakthi <i>et al.</i> , 2014                 |
|           | <i>Azotobacter</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Bacillus</i> . | Hormonas vegetales, Ácido indol acético, amoníaco, cianuro de hidrogeno, sideroforos, solubilización de fosfatos                                                         | Promueve el crecimiento vegetal de la planta e inhibición de fitopatógenos como <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>Rhizoctonia botanica</i> .<br>Inhibe el crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., interactuando con las moléculas de colesterol, interrumpe la membrana citoplasmática fúngica, crea canales transmembranales, que permiten la liberación de iones vitales como el K <sup>+</sup>                              | Ahmad <i>et al.</i> , 2008                      |
|           | <i>Bacillus subtilis</i> .                                                                     | Iturina A                                                                                                                                                                | Inhibición de fitopatógenos como <i>Curvularia</i> sp. y <i>Pyricularia grisea</i> . Genera un efecto de biocontrol a través de la acción de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac.                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Ariza y Sánchez, 2012; Liu <i>et al.</i> , 2015 |
| Indirecto | <i>Bacillus</i> sp.                                                                            | Metabolitos secundarios con actividad anti fúngica                                                                                                                       | Promueve el crecimiento vegetal de la plata e inhibición de fitopatógenos como <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Rhizoctonia</i> y <i>Colletotricum</i> sp., por medio de enzimas mucolíticas como quitinasa, β(1,3)-glucanasa y β(1,4)-glucanasa que degradan los componentes de la pared celular de hongos, la quitina, B(1,3)-glucano y enlaces glucosídicos son lisados. | Tejera <i>et al.</i> , 2012                     |
|           | <i>Bacillus</i> sp.                                                                            | Ácido indol acético, sideróforos, fitasa. Ácidos orgánicos, ACC desaminasa, cianógenos, enzimas líticas, oxalato oxidasa, fuentes de fosfatos orgánicos, potasio y zinc. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Kumar <i>et al.</i> , 2012                      |



del oomiceto *Phytophthora cinnamomi*, debido a la producción de la amina dimetilhexadecilamina (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013). Asimismo, con este enfoque experimental Orozco-Mosqueda *et al.*, (2015) caracterizaron la actividad antifúngica de diversas aminas con acción antagónica sobre cuatro cepas de los hongos xilófagos *Hypocrea* sp. (UMTM3) y *Fusarium* sp. (UMTM13) obtenidos mediante un escrutinio fúngico en madera en descomposición cuyo origen fue un bosque de pino-encino. El ensayo *in vitro* evidenció que las aminas evaluadas mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los aislados fúngicos UMTM, donde destacó la dimetilhexadecilamina. Por su letalidad fúngica es una biomolécula potencialmente útil en el tratamiento preventivo de la madera contra el ataque de hongos xilófagos y de la mancha azul. Dentro de los principales géneros bacterianos identificados como interesantes productores de COVs es *Pseudomonas*. Ya que *Pseudomonas* spp. sintetizan ácido cianhídrico (HCN), un inhibidor del crecimiento de patógenos lignocelulósicos. Este metabolito se produce a partir de glicina en condiciones esencialmente microaerófilas, donde las sintetasas de HCN codificadas por los genes *hcnA-BC* son fundamentales para la competencia de *P. fluorescens* (Haas y Défago, 2005). Otras especies bacterianas de este género que producen antifúngicos son: *P. chlororaphis* (ciclohexanol), *P. corrugata* (2-etil-1-hexanol), *P. aurantiaca* (nonanal, benzotiazol y trisulfuro de dimetilo). El compuesto 2,4-Di-*ter*-burtilfenol lo produce *Lysobacter enzymogenes* ISE13, utilizado en la represión del ciclo de vida del hongo *Colletotrichum acutatum* y del oomiceto *Phytophthora capsici*, ya que inhiben el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de esporas y zoosporas, así como también limitar la formación del apresorio de *C. acutatum*

is produced by *Lysobacter enzymogenes* ISE13, used in the suppression of the life cycle of the fungus *Colletotrichum acutatum* and the oomycete *Phytophthora capsici*, since they inhibit mycelial growth, sporulation and the germination of spores and zoospores, as well as limiting the formation of the appressorium of *C. acutatum* (Pedraza, 2015). Also, an important number of strains of the genus *Paenibacillus* can act as antagonists to pathogenic fungi, such as *P. ehimensis* KWN38, which synthesizes butanol, which produces an inhibition (>50 %) in the development of hyphae of the fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and of the oomycete *Phytophthora capsici* (Naing *et al.*, 2014). The bacteria *Paenibacillus polymyxa* presents volatile components such as 1-Octen-3-ol, benzothiazole, citronellol and 1,3-dichloropropene, which severely inhibit mycelial growth and affect the spreading of fungal pathogens, and they show an interesting insecticidal and herbicidal activity (Zhao *et al.*, 2011). Likewise, the effect of *Streptomyces platensis* COVs on plant pathogenic fungi was reported in a study that identified antifungal compounds such as 2-phenylethanol and a derivative of felandren, substances responsible for the suppression of mycelial growth in *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* (Wan *et al.*, 2008). Also strains of *Bacillus subtilis* produce COVs that significantly limit mycelial growth, pigment production (inhibition of 43 to 93 % respectively) and control the germination of *Sclerotinia sclerotiorum* with alkynes, alcohols, esters, ketones, amines, phenols and heterocyclic compounds (Liu *et al.*, 2008). Microbial technologies based on sustainable principles that use agents with minimum environmental effects are the alternative and a perspective for the preservation of wood resources and its derivative.

(Pedraza, 2015). También, un importante número de cepas del género *Paenibacillus* pueden actuar como antagonistas de hongos fitopatógenos, por ejemplo, *P. ehimensis* KWN38 sintetiza butanol, el cual genera una inhibición (>50 %) en el desarrollo de hifas de los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y del oomiceto *Phytophthora capsici* (Naing *et al.*, 2014). La bacteria *Paenibacillus polymyxa* presenta componentes volátiles como 1-Octen-3-ol, benzotiazol, citronelol y 1,3-dicloropropeno, los cuales inhiben severamente el crecimiento micelial y afectan la propagación de patógenos fúngicos, adicionalmente muestran una interesante actividad insecticida y herbicida (Zhao *et al.*, 2011). Asimismo, el efecto de COVs de *Streptomyces platensis* sobre hongos fitopatógenos se reportó. En dicho estudio se identificaron compuestos antifúngicos como 2-feniletanol y un derivado del felandreno, sustancias responsables de la supresión del crecimiento micelial en *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea* (Wan *et al.*, 2008). También, cepas de *Bacillus subtilis* producen COVs que limitan significativamente el crecimiento micelial, producción de pigmentos (inhibición de 43 a 93 % respectivamente) y controlan la germinación de *Sclerotinia sclerotiorum*, por medio de alquinos, alcoholes, ésteres, cetonas, aminas, fenoles y compuestos heterocíclicos (Liu *et al.*, 2008). Tecnologías microbianas fundamentadas en principios sustentables que emplean agentes de mínima afectación ambiental son la alternativa y a la vez una perspectiva para la preservación de del recurso maderable y derivado.

### **Estrategias bacterianas para el control de hongos que deterioran la madera**

Las bacterias exhiben diversos mecanismos a través de los cuales pueden inhibir el desarrollo de microorganismos causantes del deterioro de la

### **Bacterial strategies for the control of fungi that deteriorate wood**

Bacteria present diverse mechanisms through which they can inhibit the growth of microorganisms that cause the deterioration of wood and other forestry products (Zavattieri *et al.*, 2016; Cely *et al.*, 2016). Some of the bioactive metabolites may suppress fungal germination, spreading, or affect other activities of fungal development, such as invasive activity, the survival of fungal propagules embedded in clefts or the surface of wood to avoid their spreading (Figure 2). Most of these bacterial bioactives are catalogued in the group of antibiotics that inhibit the syntheses of the cell wall and of proteins, or alter the structure of the microbial membrane system, or cause the degradation of the genetic material of the target microorganism (Maksimov *et al.*, 2011). Some species of the genus *Bacillus* produce insecticidal antibiotics and proteins *e.g.* *B. subtilis* produce antibiotics, yet considered PGPRs, since they promote plant growth and a biological control over some soil pathogens. *B. thuringensis* produces proteins that affect the development of insects, and is therefore used as an insecticide. Both bacilli are an unexplored source of bioactives for the control of wood-decaying fungi.

Fungi require microelements for their development, and this need is vital, since these minerals can act as the pharmaceutical target or objective and make them unavailable to the fungus and allow its control. The molecular chelating of ions avoids their availability and therefore the assimilation by the fungus, therefore its development. This fungal control strategy can be carried out with the siderophores, that are compounds with low molecular weight, produced and secreted by plant roots and some bacteria, *e.g.* siderophores capture elements such as iron ( $Fe^{+3}$ )

madera y otros productos forestales (Zavattieri *et al.*, 2016; Cely *et al.*, 2016). Alguno de los metabolitos bioactivos bacterianos puede suprimir la germinación, propagación o afectar otras actividades del desarrollo fúngico, tales como la actividad invasora, la supervivencia de los propágulos fúngicos anidados en hendiduras o superficie de la madera para evitar su dispersión (Figura 2). La mayoría de estos bioactivos bacterianos están catalogados en el grupo de antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular y la síntesis de proteínas o alterar la estructura del sistema membranal microbiano o provocar la degradación del material genético del microorganismo diana (Maksimov *et al.*, 2011). Algunas especies del género *Bacillus* producen antibióticos y proteínas insecticidas *e.g.* *B. subtilis* producen antibióticos, aunque consideradas PGPRs debido a que ejercen efecto promotor del crecimiento vegetal y un control biológico sobre

(Saha *et al.*, 2016). The best siderophore-producing bacteria are found in the bacterial category of PGPRs. Although siderophores are interesting, for the purpose of this investigation, it is shown as a recurring topic for its use in the protection of wood. The bacterial ability to produce siderophores calls to attention for the chelating of iron, since when it forms a siderophore  $Fe^3+$  complex, and confining it in the bacterial cytosol with a specific receptor located in the bacterial membrane causes this micronutrient to become unavailable for microorganisms that lack the specific assimilation system and acknowledgement of such a complex (Radzki *et al.*, 2013; Tariq *et al.*, 2017). In this way, when using all or most of the soluble iron in the wood, fungal growth is suppressed, as well as in other microorganisms, as occurs in the rhizosphere (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017). The ability of siderophores to act

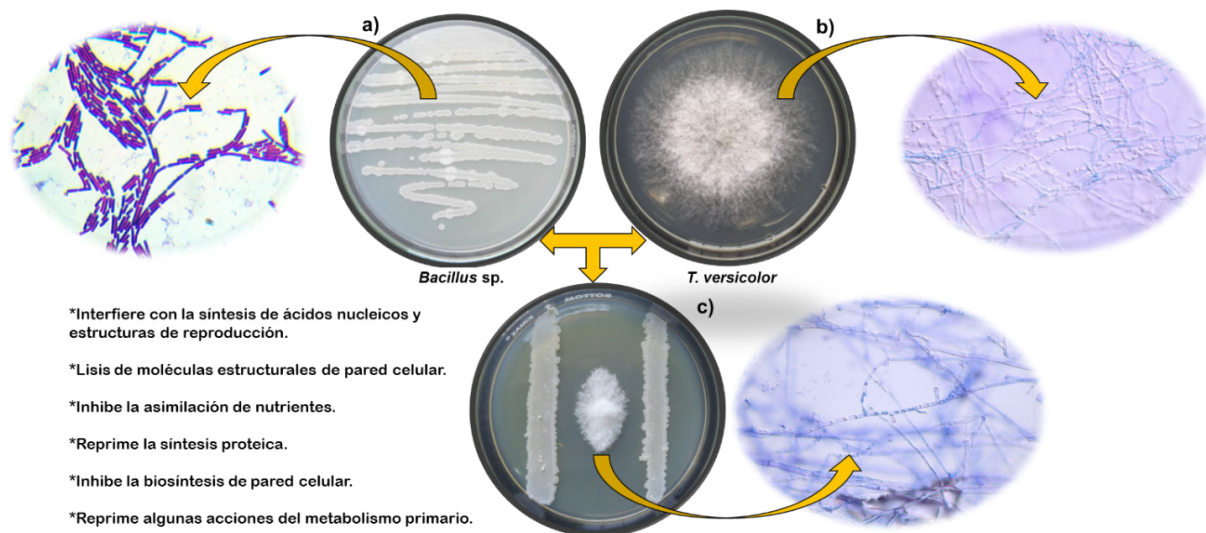


Figura 2. Modelo de inhibición de *Trametes versicolor* por la secreción de metabolitos de *Bacillus* sp. (a) el crecimiento del aislado bacteriano de *Bacillus* sp, (b) ejemplo del desarrollo del hongo fitopatogénico *T. versicolor* y (c) grado de inhibición de los metabolitos bacterianos sobre el crecimiento del fitopatogénico al estar en desarrollo simultáneo bajo condiciones *in vitro* a siete días de tiempo.

Figure 2. *Trametes versicolor* inhibition model for the secretion of *Bacillus* sp. metabolites (a) the growth of the *Bacillus* sp bacterial isolation, (b) example of the development of the phytopathogenic fungus *T. versicolor* and (c) degree of inhibition of the bacterial metabolites on the growth of the phytopathogen when in simultaneous development under *in vitro* conditions after seven days.

algunos patógenos del suelo. *B. thuringensis* produce proteínas que afectan el desarrollo de insectos por lo que se usa como insecticida. Ambos bacilos son una fuente de bioactivos inexplorada para el control de hongos deterioradores de la madera.

Los hongos requieren de microelementos para su desarrollo y esta necesidad es de vital importancia. En donde, estos minerales pueden actuar como el blanco o diana farmacológica al tornarlos no disponibles para el hongo y permitir su control. El secuestro molecular de iones evita su disponibilidad y por tanto la asimilación por el hongo y con ello se afecta su desarrollo. Esta estrategia de control fúngico se puede realizar mediante los sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular producidos y secretados por raíces vegetales y algunas bacterias, *e.g.* los sideróforos capturan elementos como el hierro ( $Fe^{+3}$ ) (Saha *et al.*, 2016). Las mejores bacterias productoras de sideróforos se encuentran en la categoría bacteriana de las PGPRs. Aunque, los sideróforos son interesantes, por el propósito de este trabajo se muestra como un tema recurrente para su aplicación en la protección de la madera. La capacidad bacteriana de producir sideróforos llama la atención para el secuestro del hierro ya que al formar un complejo  $Fe^3 +$  sideróforo, e internarlo al citosol bacteriano mediante un receptor específico localizado en la membrana bacteriana, ocasiona que este micronutriente no esté disponible para microorganismos que carezcan del sistema de asimilación específico y reconocimiento de dicho complejo (Radzki *et al.*, 2013; Tariq *et al.*, 2017). De tal manera que al utilizar la totalidad o mayoría del hierro soluble en la madera se suprime el crecimiento fúngico y de otros microorganismos, tal como ocurre en la rizósfera (Bolívar-Anillo *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2017). La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de hongos deterioradores de la madera se desconoce y es

as suppressors of wood deteriorating fungi is unknown and its deleterious action may depend on chemical, physical and biological factors, as in the Rhizosphere (Saha *et al.*, 2016). However this is one of the challenges to overcome and that may be important in the preservation of this material. Another unexplored field in wood preservation and in the control of its biodeterioration are the lytic enzymes of polymers from fungal cell walls. These enzymes are produced by diverse microorganisms, including PGPRs, in which there have been descriptions of glucanases, proteases and chitinases. These act with the degradation of the polymers that make up the fungal cell wall of wood deteriorators, as described that takes place in pathogenic fungi (El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006). Some of the main PGPRs that produce these enzymes are *Bacillus altitudinis* and *B. amyloliquefaciens* (Sunar *et al.*, 2013; Tariq *et al.*, 2017). As a natural renewable but definitely finite resource, wood is of great economic importance worldwide. A challenge in its preservation is to have strategies based on the microbial exudates to avoid the use of toxic substances in its control.

## CONCLUSIONS

Bacterial metabolites such as dimethylhexadecylamine, 2,4-Di-tert-butylphenol or of an antibiotic nature are potentially an alternative to conventional preservatives of low durability wood. But there is still a lack of knowledge in terms of production, use and doses of the microbial exudates. Therefore, the challenge is to attain high yields and reliability of these secondary metabolites comparable to the conventional preservatives using biotechnology strategies that include microbiological components



posible que su acción deletérea dependa de factores químicos, físicos y biológicos como ocurre en la rizósfera (Saha *et al.*, 2016). Sin embargo, este es uno de los retos a superar y que puede ser importante en la preservación de este material. Otro campo inexplorado en la preservación de la madera y en el control de su biodeterioro son las enzimas líticas de polímeros de pared celular fúngica. Enzimas que diversos microorganismos las producen entre los que se encuentran las PGPRs, en quienes se han descrito las glucanasas, proteasas y quitinasas. Estas actúan mediante la degradación de los polímeros que componen la pared celular fúngica de los deterioradores de la madera, al igual como se describió que ocurre en hongos fitopatógenos (El-Tarabily y Sivasithamparam, 2006). Entre las principales PGPRs productoras de estas enzimas destacan *Bacillus altitudinis* y *B. amyloliquefaciens* (Sunar *et al.*, 2013; Tariq *et al.*, 2017). Como recurso natural renovable pero definitivamente agotable, la madera es de importancia económica a nivel mundial. Un reto en el área de su preservación es tener estrategias basadas en los exudados microbianos para evitar el uso de sustancias tóxicas en su manejo.

## CONCLUSIONES

Metabolitos bacterianos como la dimetilhexadecilamina, 2,4-Di-ter-butilfenol o de naturaleza antibiótica potencialmente son una alternativa a los preservadores convencionales de la madera de baja durabilidad. Pero aún, un desconocimiento existe en cuanto a la producción, modo de empleo y dosificación de los exudados microbianos. Por lo tanto, el reto es alcanzar rendimientos y confiabilidad de estos metabolitos secundarios comparable con los preservadores convencionales mediante estrategias biotecnológicas que incluyen componentes microbiológicos.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the UMSNH for funding this investigation.

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

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la UMSNH por el financiamiento a esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Agboton C, Onzo A, Korie S, Tamò M and Vidal S. 2017. Spatial and temporal infestation rates of *Apate terebrans* (Coleoptera: Bostrichidae) in cashew orchards in Benin, West Africa. *African Entomology* 25(1):24-36. <https://doi.org/10.4001/003.025.0024>
- Ahmad F, Ahmad I and Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163:173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Arbelo A y Garbuyo E. 2012. Patologías en la construcción en madera. Estudio de caso: vivienda Punta Colorada. Disponible en línea: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1884/5/ARB6.pdf>
- Ariza Y y Sánchez L. 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova* 10:149-155. Disponible en línea: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200002&lng=en&tlng=es
- A.S.T.M D-2017-81. American Society for Testing and Materials. (ASTM). 1994. D-2017-81: Standard Method of Accelerated Laboratory Natural Decay Resistance for Woods. *Annual Book of ASTM Standard*, Philadelphia, v. 410, p. 324-328. Disponible en línea: <https://www.astm.org/Standard/standards-and-publications.html>
- Auffan M, Masion A, Labille J, Diot MA, Liu W, Olivi L, Proux O, Ziarelli F, Chaurand P, Geantef C, Bottero JY and Rose J. 2014. Long-term aging of a CeO₂ based nanocomposite used for wood protection. *Environmental Pollution* 188:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.016>
- AWPA P5-83 1983. American Wood-Preserver's Association (AWPA). 1983. P5-83. Standard for waterborne preservatives. In: *American Wood Preservers' Association AWPA*. Pp. 1-4
- Berocal JA. 2007. Clasificación de daños producidos por agentes de biodeterioro en la madera. *Revista Forestal*

- Mesoamericana Kurú 4:54-62. Disponible en línea: <http://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/500/427>
- Bobadilla EA, Pereyra O, Silva F y Stehr AM. 2005. Durabilidad natural de la madera de dos especies aptas para la industria de la construcción. *Floresta* 35:419-428. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v35i3.5192>
- Bolívar-Anillo HJ, Contreras-Zentella ML y Teherán-Sierra LG. 2016. *Burkholderia tropica* una bacteria con gran potencial para su uso en la agricultura. *TIP* 19:102-108. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.06.003>
- Carrillo-Parra A, Hapla F, Mai C y Garza-Ocañas F. 2011. Durabilidad de la madera de *Prosopis laevigata* y efecto de sus extractos en hongos que degradan la madera. *Madera y bosques* 17:7-21. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140504712011000100001&lng=es&tlng=en
- Cely MV, Siviero MA, Emiliano J, Spago FR, Freitas VF, Barazetti AR, Goya ET, de Souza Lambertini, G, dos Santos IM, De Oliveira AG and Andrade G. 2016. Inoculation of *Schizolobium parahyba* with Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Increases Wood Yield under Field Conditions. *Frontiers in Plant Science* 7:1-13. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01708>
- Cheng SS, Liu JY, Hsui YR and Chang ST. 2006. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology* 97:306-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.030>
- Damian BLM, Martínez MRE, Salgado GR y Martínez PMM. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9:136-142. ISSN:0717-7917. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/html/856/85612475009/>
- El-Tarabily KA and Sivasithamparan K. 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* 38:1505-1520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.12.017>
- FAO 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations. State of the world's forests. Rome, Italy: FAO Forestry Department.
- Findlay WPK. 1951. The value of laboratory test on wood preservatives. [S.l.]: Convention British Wood Preserving Association.
- Flower CE and Gonzalez-Meler MA. 2015. Responses of temperate forest productivity to insect and pathogen disturbances. *Annual Review of Plant Biology* 66:547-569. Disponible en línea: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-arplant-043014-115540>
- Freeman MH, Shupe TF, Vlosky RP and Barnes HM. 2003. Past, present, and future of the wood preservation industry: wood is a renewable natural resource that typically is preservative treated to ensure structural integrity in many exterior applications. *Forest Products Journal* 53(10):8-16. Disponible en línea: <http://go.galegroup.com/ps/i.do?id=GALE%7CA110822270&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=fulltext&issn=00157473&p=AONE&sw=w&authCount=1&u=umsnh1&selfRedirect=true>
- González-Laredo RF, Rosales-Castro M, Rocha-Guzmán NE, Gallegos-Infante JA, Moreno-Jiménez MR y Karchesy JJ. 2015. Wood preservation using natural products. *Madera y Bosques* 21:63-76. <http://dx.doi.org/10.21829/myb.2015.210427>
- Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A and Del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8:195-204. Disponible en línea: <http://scielo.isciii.es/pdf/im/v8n3/07%20Martinez.pdf>
- Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo F and Talon M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacilluslicheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111:206-211. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>
- Haas D and Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3:307-319. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmi-0129>
- Ibáñez OC, Mantero C, Rabinovich M, Cecchetto G y Cerdeiras P. 2012. Deterioro y preservación de madera. *Revista Digital Universitaria* 13(5):1-15 Disponible en línea: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num5/art55/index.html>
- Kartal SN, Yoshimura T and Imamura Y. 2009. Modification of wood with Si compounds to limit boron leaching from treated wood and to increase termite and decay resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63:187-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.08.006>
- Konradsen F, van der Hoek W, Cole DC, Hutchinson G, Daisley H, Singh S and Eddleston M. 2003. Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides. *Toxicology* 192(2):249-261. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00339-1)
- Kumar H, Dubey RC and Maheshwari DK. 2017. Seed-coating fenugreek with *Burkholderia* rhizobacteria enhances yield in field trials and can combat Fusarium wilt. *Rhizosphere* 3:92-99. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2017.01.004>
- Kumar P, Dubey RC and Maheshwari DK. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research* 167:493-499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Lebow S, Arango R, Woodward B, Lebow P and Ohno K. 2015. Efficacy of alternatives to zinc naphthenate for dip treatment of wood packaging materials. *International Biodeterioration and Biodegradation* 104:371-376. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.07.006>
- Liu C, Sheng J, Chen L, Zheng Y, Lee DYW, Yang Y, Xu M and Shen L. 2015. Biocontrol activity of *Bacillus subtilis* isolated from *Agaricus bisporus* mushroom compost against pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63(26):6009-6018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02218>
- Liu W, Mu W, Zhu B and Liu F. 2008. Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. *Current Research on Bacteriology* 1:28-34. Disponible en línea: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/crb/2008/28-34.pdf>

- Maksimov IV, Abizgil' Dina RR and Pusenkova LI. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 47:333-345. <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683811040090>
- Manual del grupo andino para la preservación de maderas. 1988. Ed. Proyecto subregional de promoción industrial de la madera para construcción de la Junta del Acuerdo de Cartagena L.
- Martínez PMM, del Río RE, Flores GA, Martínez MRE, Ron Echeverría OA and Raya GD. 2012. *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb: The biotechnological profile of a tropical tree. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11:385-399. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85624131001.pdf>
- Matan N and Matan N. 2008. Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration and Biodegradation* 62:75-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.07.014>
- Moglia JG, Amórtegui IC y Giménez AM. 2015. Ocurrencia de la mancha roja en el leño de *Aspidosperma quebrachoblanco*. *Revista de Ciencias Forestales* 23:1-2. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/481/48145593003.pdf>
- Naing KW, Anees M, Kim SJ, Nam Y, Kim YC and Kim KY. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiolog* 64:55-63. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-006>
- Nascimento MS, Santana ALBD, Maranhão CA, Oliveira LS and Bieber L. 2013. Phenolic extractives and natural resistance of wood. Pp:349-370. In *Biodegradation-Life of Science*. <http://dx.doi.org/10.5772/56358>
- NMX-C-222-1983. Norma Mexicana. "Industria de la Construcción-Vivienda de Madera Prevención de Ataque por Termitas-Especificaciones".
- NMX-C-239-1985. Norma Mexicana para la "Calificación y clasificación de la madera de pino para uso estructural".
- Orozco-Mosqueda M, Valencia-Cantero E, López-Albarrán P, Martínez-Pacheco M y Velázquez-Becerra C. 2015. La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminas inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología* 47:219-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.005>
- Patel N, Oudemans PV, Hillman BI and Kobayashi DY. 2013. Use of the tetrazolium salt MTT to measure cell viability effects of the bacterial antagonist *Lysobacter enzymogenes* on the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103(6):1271-1280. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9907-3>
- Pedraza RO. 2015. Siderophores production by *Azospirillum*: biological importance, assessing methods and biocontrol activity. In *Handbook for Azospirillum*. Pp. 251-262. Springer International Publishing. 514p. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_14
- Radzki W, Mañero FG, Algar E, García JL, García-Villaraco A and Solano BR. 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104(3):321-330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Ramírez-López CB, García-Sánchez E, Martínez-Muñoz RE, Del Río RE y Martínez-Pacheco MM. 2016. Chemical composition of the essential oil from *Ageratina jocotepecana* and its repellent effect on drywood termite *Incisitermes marginipennis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 15(1):53-60. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85643330005>
- Raya-González D, Martínez-Muñoz RE, Ron-Echeverría OA, Flores-García A, Macías-Rodríguez LI and Martínez-Pacheco MM. 2013. Dissuasive effect of an extract aqueous from *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb on the drywood termite *Incisitermes marginipennis* (Isoptera:Kalotermitidae) (Latreille). *EJFA* 25:524-530. <http://dx.doi.org/10.9755/ejfa.v25i7.15987>
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma B K, Bhattacharjee S and Tribedi P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 23(5):3984-3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Schmidt O. 2007. Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycological Progress* 6:261-279. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-007-0534-0>
- Schwarze FW. 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews* 21(4):133-170. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.09.001>
- Singh AP and Singh T. 2014. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy* 62:198-206. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.013>
- Singh AP, Kim YS and Singh T. 2016. Bacterial degradation of wood. *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, and Applications* 9:169-190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00009-7>
- Singh T and Singh AP. 2012. A review on natural products as wood protectant. *Wood Science and Technology* 46:851-870. <http://dx.doi.org/10.1007/s00226-011-0448-5>
- Sivasakthi S, Usharani G and Saranraj P. 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research* 9(16):1265-1277. <https://dx.doi.org/10.5897/AJAR2013.7914>
- Stirling R, Daniels CR, Clark JE and Morris PI. 2007. Methods for determining the role of extractives in the natural durability of western red cedar. *International Research Group on Wood Protection*. Doc No. IRG-WP 07e20356.
- Stork NE, McBroom J, Gely C and Hamilton AJ. 2015. New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(24):7519-7523. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1502408112>
- Subramanian J, Ramesh T and Kalaiselvam M. 2014. Fungal laccases-properties and applications: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive* 5(2):8-16. Disponible en línea: <http://www.ijpba.info/ijpba/index.php/ijpba/article/viewFile/1237/881>

- Sunar K, Dey P, Chakraborty U and Chakraborty B. 2013. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. *Journal of Basic Microbiology* 55:91-104. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201300227>
- Tariq M, Noman M, Ahmed T, Hameed A, Manzoor N and Zafar M. 2017. Antagonistic features displayed by Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Review. *Journal of Plant Science and Phytopathology* 1:38-43. Disponible en línea: <https://www.heighpubs.org/jpsp/pdf/jpsp-aid1004.pdf>
- Tascioglu C, Yalcin M, de Troya T y Sivrikaya H. 2012. Termiticidal properties of some wood and bark extracts used as wood preservatives. *BioResources* 7:2960-2969. Disponible en línea: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_07_3_2960_Tascioglu_YTS_Termiticidal_Wood_Bark_Extracts
- Tascioglu C, Yalcin M, Sen S and Akcay C. 2013. Antifungal properties of some plant extracts used as wood preservatives. *International Biodeterioration and Biodegradation* 85:23-28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.004>
- Tejera B, Heydrich M y Rojas MM. 2012. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal* 27:117-122. Disponible en línea: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200008
- Ulyshen MD. 2015. Insect-mediated nitrogen dynamics in decomposing wood. *Ecological Entomology* 40:97-112. <https://doi.org/10.1111/een.12176>
- Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez LI, López-Bucio J, Flores-Cortez I, Santoyo G, Hernández-Soberano C and Valencia-Cantero E. 2013. The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*. *Protoplasma* 25:1251-1262. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-013-0506-y>
- Veronovski N, Verhovšek D and Godnjavec J. 2013. The influence of surface-treated nano-TiO₂ (rutile) incorporation in water-based acrylic coatings on wood protection. *Wood science and technology* 47(2):317-328. <http://dx.doi.org/10.1007/s00226-012-0498-3>
- Wan M, Li G, Zhang J, Jiang D and Huang HC. 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control* 46:552-559. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.015>
- Widmer TL. 2014. Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil. *Biological Control* 79:43-48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.08.003>
- Yang VW and Clausen CA. 2007. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59:302-306. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.004>
- Zanni E. 2004. Patología de madera. Degradación y Rehabilitación de Estructuras de Madera. Primera Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 244p.
- Zanni E. 2008. Patología de la construcción y restauración de obras de arquitectura. Primera Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. 300p.
- Zavattieri MA, Ragonezi C and Klimaszevska K. 2016. Adventitious rooting of conifers: influence of biological factors. *Trees* 30(4):1021-1032. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1412-7>
- Zhao LJ, Yang XN, Li XY, Wei MU and Feng LIU. 2011. Antifungal, insecticidal and herbicidal properties of volatile components from *Paenibacillus polymyxa* strain BMP-11. *Agricultural Sciences in China* 10:728-736. [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60056-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60056-4)
- Zou CS, Mo MH, Gu YQ, Zhou JP and Zhang KQ. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology and Biochemistry* 39:2371-2379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.009>

Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems

Los fosfitos como alternativa para el manejo de problemas fitopatológicos

Moisés Gilberto Yáñez-Juárez, Carlos Alfonso López-Orona, Felipe Ayala-Tafoya*, Leopoldo Partida-Ruvalcaba, Teresa de Jesús Velázquez-Alcaraz y Raymundo Medina-López, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado Km 17.5, Aparatado Postal 25, CP. 80000, Culiacán, Sinaloa, México. *Autor para correspondencia: tafoya@uas.edu.mx.

Recibido: 31 de Octubre, 2017.

Aceptado: 22 de Diciembre, 2017.

Yáñez-Juárez MG, López-Orona CA, Ayala-Tafoya F, Partida-Ruvalcaba L, Velázquez-Alcaraz TJ, Medina-López R. 2017. Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 79-94.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-7

Primera publicación DOI: 01 de Enero, 2018.

First DOI publication: January 01, 2018.

Resumen. Los fosfitos son compuestos derivados del ácido fosforoso empleados como alternativa para el control de organismos fitoparásitos y su eficacia se ha probado contra protozoarios, oomicetes, hongos, bacterias y nematodos; sin embargo, en comparación con los fungicidas convencionales sintetizados, generalmente son menos eficaces para disminuir el daño por fitopatógenos. El ion fosfito es fácilmente transportado en las plantas vía xilema y floema, por lo que se ha utilizado en aplicación foliar, baño a la raíz y cuello de la planta, inyección al tronco, a través de riego por goteo mezclado en la solución nutritiva en hidroponía, tratamiento a semilla, aplicación aérea en bajo volumen o como tratamiento en inmersión de semillas y frutos. Los

Abstract. Phosphites are compounds derived from phosphorous acid used as an alternative for the control of phytoparasitic organisms and their effectiveness has been tested against protozoa, oomycetes, fungi, bacteria and nematodes; however, compared to conventional synthesized fungicides, phosphites are generally less effective at reducing damage by phytopathogens. The phosphite ion is easily transported in the plants via xylem and phloem, so it has been used in foliar application, drench of plant root and neck, injection trunk, through drip irrigation mixed in the nutrient solution in hydroponics, seed treatment, aerial application in low volume, or as treatment in immersion of seeds and fruits. The mechanisms of action involved in the prophylactic effects of phosphites are diverse and include the stimulation of biochemical and structural defense mechanisms in plants and direct action that restricts the growth, development and reproduction of phytopathogenic organisms.

Key words: potassium phosphite, biostimulant, control of phytopathogens.

mecanismos de acción involucrados en los efectos profilácticos de los fosfitos son diversos e incluyen la estimulación de los mecanismos de defensa bioquímica y estructural en las plantas, además de la acción directa que restringe el crecimiento, desarrollo y reproducción de los organismos fitopatógenos.

Palabras clave: fosfito de potasio, bioestimulante, control de fitopatógenos.

El uso irracional en la agricultura de pesticidas sintetizados, incrementa los problemas de contaminación ambiental, salud pública, disminución de la biodiversidad en los agroecosistemas y desarrollo de organismos fitopatógenos con resistencia, además, la comercialización agrícola actual demanda productos inocuos para los consumidores, provenientes de procesos con bajo impacto ambiental. Así, adquiere relevancia el control de enfermedades basado en el empleo de sales inorgánicas, que además de ser eficaces para el manejo de enfermedades en los cultivos muestren mínimas consecuencias adversas. Al respecto, Deliopoulos *et al.* (2010) reportan que se han utilizado 34 diferentes sales con esa finalidad, además indican que las sales de fosfito destacan por su frecuencia de utilización y eficacia en el control.

Los fosfitos son oxianiones derivados del ácido fosforoso ($H_3PO_3^-$), que regularmente se combinan con cationes no metales como potasio, sodio, calcio o amonio. Los términos “fosfito” y “fosfanato” son comúnmente utilizados en la literatura para referirse a las sales derivadas del ácido fosforoso, al igual que “hidrogenofosfanatos”, “ortofosfitos”, “compuestos del ácido fosfónico” o “compuestos del ácido fosforoso” (Deliopoulos *et al.*, 2010).

La diferencia química entre fosfato ($H_2PO_4^-$) y fosfito ($H_2PO_3^-$) es un átomo de oxígeno el cual es

The irrational use of synthetic pesticides in agriculture increases problems of environmental pollution and public health, and decreases biodiversity in the agroecosystems as well as the development of resistant-phytopathogenic organisms. Furthermore, the current agricultural marketing requires products that are safe for consumers and created using low environmental impact processes. Thus, disease control based on the use of inorganic salts, which aside from being effective in managing crop diseases have minimum adverse consequences, becomes relevant. To this regard, Deliopoulos *et al.* (2010) reported that 34 different salts have been used for such purpose, and suggested that phosphite salts stand out because of their use frequency and control effectiveness.

Phosphites are oxyanions derived from phosphorous acid ($H_3PO_3^-$) regularly combined with non-metal cations, such as potassium, sodium, calcium or ammonia. The terms “phosphite” and “phosphonate” are commonly used in the literature to refer to salts derived from phosphorous acid, the same as “hydrogen phosphates”, “orthophosphites”, “phosphonic acid compounds” and “phosphorous acid compounds” (Deliopoulos *et al.*, 2010).

The chemical difference between phosphate ($H_2PO_4^-$) and phosphite ($H_2PO_3^-$) is an oxygen atom that is replaced by another of hydrogen (Figure 1). When oxygen is replaced, there is a profound difference in the way phosphates and phosphites behave in living organisms (McDonald *et al.*, 2001; Achary *et al.*, 2017). Due to their structural similarity, phosphites are thought to be akin to phosphates. However, the use of phosphites as fungicides and biostimulants to control plant pathogens is widely accepted, but their use as a phosphorus source in plant nutrition is currently debated (Borza *et al.*, 2014; Gómez-Merino and Trejo-Téllez, 2015; Alexandersson *et al.*, 2016; Manna *et al.*, 2016). Such difference gives

sustituido por otro de hidrógeno (Figura 1). La sustitución del oxígeno da lugar a profundas diferencias en la manera en que los fosfatos y fosfitos se comportan en los organismos vivos (McDonald *et al.*, 2001; Achary *et al.*, 2017). Debido a su similitud estructural, los fosfitos son considerados como análogos de los fosfatos, sin embargo, el uso de los fosfitos como fungicidas y bioestimulantes para el control de patógenos de plantas es ampliamente aceptado, pero su utilización como fuente de fósforo en la nutrición de plantas es actualmente debatida (Borza *et al.*, 2014; Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015; Alexandersson *et al.*, 2016; Manna *et al.*, 2016). Además, esa diferencia da a los fosfitos una mayor movilidad en el suelo y en los tejidos de las plantas, así como una mayor capacidad para penetrar a través de hojas, tallos y raíces (Tkaczyk *et al.*, 2016).

El uso de los fosfitos en la agricultura, se ha investigado principalmente por su acción en el control de organismos fitoparásitos o como fuente de nutrición en plantas cultivadas (Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015; Alexandersson *et al.*, 2016). Esto último puede ocurrir únicamente si los fosfitos se aplican al suelo y entran en contacto con bacterias que tienen la capacidad de oxidarlos a fosfatos (McDonald *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2016). No obstante, este proceso es muy lento, y puede tomar hasta cuatro meses para completarse, lo que resulta impráctico para la agricultura (McDonald *et al.*, 2001; Lovatt y Mikkelsen, 2006).

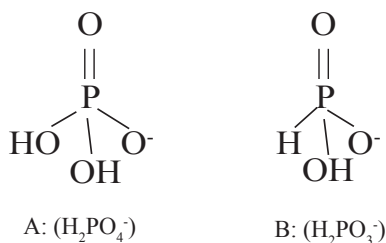


Figura 1. Estructura del grupo fosfato (A) y fosfito (B).
Figure 1. Structure of the phosphate (A) and phosphite (B) group.

phosphites a greater mobility in soil and plant tissues, as well as a greater capacity to penetrate through leaves, stems and roots (Tkaczyk *et al.*, 2016).

The use of phosphites in agriculture has been studied mainly because of their action to control phytoparasite organisms or as a nutrition source for cultivated plants (Gómez-Merino and Trejo-Téllez, 2015; Alexandersson *et al.*, 2016). The latter may occur only if phosphites are applied to soil and come into contact with bacteria that have the capacity to oxidize them to phosphates (McDonald *et al.*, 2001; Manna *et al.*, 2016). However, since this is a very slow process that can take up to four months, it becomes impractical in agriculture (McDonald *et al.*, 2001; Lovatt and Mikkelsen, 2006).

In early 1930, researchers concluded that phosphites were not an efficient nutrition source for plants. However, 40 years later, phosphites returned to the agrochemicals market as an alternative for controlling plant diseases, when the French company Rhône-Poulenc offered the active ingredient fosetyl-aluminum to control mildews and diseases caused the *Phytophthora* genus (Tkaczyk *et al.*, 2016; Achary *et al.*, 2017). Phosphites, as an alternative for controlling phytoparasite organisms, have been extensively studied and proven to be effective against protozoa, oomycetes, fungi, bacteria and phytoparasite nematodes (Table 1), as well as biostimulators (Gómez-Merino and Trejo-Téllez, 2015) that reduce damages caused by weeds (Manna *et al.*, 2016; Achary *et al.*, 2017) and UV-B radiation (Oyarburo *et al.*, 2015).

APPLICATION METHODS

The phosphite ion is easily transported in plants via xylem and phloem (McDonald *et al.*, 2001; Tkaczyk *et al.*, 2016), so it has been used in foliar applications (Rebollar-Alviter *et al.*, 2010; Silva *et*

Fue a principios de 1930 cuando se concluyó que los fosfitos no eran fuente eficiente de fósforo para la nutrición de las plantas y 40 años después, regresó al mercado de los agroquímicos como alternativa para el manejo de enfermedades, cuando la compañía Francesa Rhône-Poulenc ofreció el ingrediente activo fosetil-aluminio para el control de mildiús y enfermedades causadas por el género *Phytophthora* (Tkaczyk *et al.*, 2016; Achary *et al.*, 2017). Los fosfitos, como alternativa para el control de organismos fitoparásitos, han sido estudiados ampliamente y su eficacia se ha probado contra protozoarios, oomicetes, hongos, bacterias y nematodos fitoparásitos (Cuadro 1); adicionalmente, se ha comprobado su eficacia como bioestimulador (Gómez-Merino y Trejo-Téllez, 2015), para disminuir los daños por malezas (Manna *et al.*, 2016; Achary *et al.*, 2017) y radiación UV-B (Oyarburo *et al.*, 2015).

MÉTODOS DE APLICACIÓN

El ion fosfito es fácilmente transportado en las plantas vía xilema y floema (McDonald *et al.*, 2001; Tkaczyk *et al.*, 2016), por lo que se ha utilizado en aplicación foliar (Rebollar-Alviter *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Pagani *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2014; Liljeroth *et al.*, 2016; Borza *et al.*, 2017), baño a la raíz y cuello de la planta (Oka *et al.*, 2007; Akinsanmi y Dreth, 2013), inyección al tronco (Bock *et al.*, 2012; Akinsanmi y Dreth, 2013; Aćimović *et al.*, 2015; Aćimović *et al.*, 2016), a través de riego por goteo mezclado en la solución nutritiva en hidroponía (Förster *et al.*, 1998), tratamiento a semilla (Abbasi y Lazarovits 2006; Lobato *et al.*, 2008), aplicación aérea en bajo volumen (Hardy *et al.*, 2001) o como tratamiento en inmersión de semillas y frutos (Anderson *et al.*, 2012; Cerioni *et al.*, 2013, Borin *et al.*, 2017).

et al., 2011; Pagani *et al.*, 2014; Yáñez *et al.*, 2014; Liljeroth *et al.*, 2016; Borza *et al.*, 2017), drench of plants root and neck (Oka *et al.*, 2007; Akinsanmi and Dreth, 2013), trunk injection (Bock *et al.*, 2012; Akinsanmi and Dreth, 2013; Aćimović *et al.*, 2015; Aćimović *et al.*, 2016) through drip irrigation mixed in a nutrient solution in hydroponics (Förster *et al.*, 1998), seed treatments (Abbasi and Lazarovits 2006; Lobato *et al.*, 2008), low-volume aerial applications (Hardy *et al.*, 2001) or as a treatment in seed and fruits immersion (Anderson *et al.*, 2012; Cerioni *et al.*, 2013, Borin *et al.*, 2017).

EFFECTIVENESS

The levels of effectiveness of phosphites to control phytoparasite organisms vary depending on the ion bonded to phosphite, application method, pathogen organism and host plant (Table 2; Figure 2). For example, mandarin orange fruits immersed in solutions containing calcium and potassium phosphites contributed to reduce 50% of fruits infected with citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* (Cerioni *et al.*, 2013); also, soja plants treated with potassium phosphite showed up to 50% less damage by *Peronospora manshurica* than non-treated plants (Silva *et al.*, 2011). Abbasi and Lazarovits (2006) reported 80% less cucumber plants infected by *Pythium* spp. when seeds were treated by immersion in solutions containing copper phosphite. Ogoshi *et al.* (2013) obtained a 62.5% decrease in the severity of *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants treated with potassium phosphite. In another experiment, 93% of papaya plants treated with potassium phosphite survived the attack of *Phytophthora palmivora*, but only 24% of non-treated plants survived (Vawdrey and Westerhuis, 2007).

Cuadro 1. Organismos fitoparásitos controlados con fosfitos.
Table 1. Control of phytoparasite organisms using phosphites.

| Organismo fitoparásito | Planta hospedante | Fosfito | Referencia |
|--|----------------------------|-----------|--|
| Protozoarios | | | |
| <i>Plasmodiophora brassicae</i> | <i>Brassica rapa</i> | Potasio | Kammerich <i>et al.</i> , 2014 |
| Oomycetes | | | |
| <i>Peronospora destructor</i> | <i>Allium cepa</i> | Potasio | Monsalve <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>P. manshurica</i> | <i>Glicine max</i> | Potasio | Silva <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>P. parasitica</i> | <i>Brassica oleracea</i> | Potasio | Becót <i>et al.</i> , 2000 |
| <i>Phytophthora cinnamomi</i> | <i>Macadamia spp.</i> | Potasio | Akinsanmi y Dreth, 2013 |
| <i>P. cinnamomi</i> | <i>Ananas comosus</i> | Potasio | Anderson <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Phytophthora infestans</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Aluminio | Kromann <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>P. infestans</i> | <i>S. tuberosum</i> | Calcio | Lobato <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>P. infestans</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Borza <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>P. infestans</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Kromann <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>P. infestans</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Liljeroth <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>P. nicotianae</i> | <i>Nicotiana tabacum</i> | Potasio | Smillie <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>P. palmivora</i> | <i>Carica papaya</i> | Potasio | Smillie <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Plasmopara viticola</i> | <i>Vitis vinifera</i> | Potasio | Pinto <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | <i>Cucumis melo</i> | Potasio | Méndez <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Pythium aphanidermatum</i> | <i>C. sativus</i> | Cobre | Abbasi y Lazarovits, 2006 |
| <i>P. irregulare</i> | <i>C. sativus</i> | Cobre | Abbasi y Lazarovits, 2006 |
| <i>P. ultimum</i> | <i>C. sativus</i> | Cobre | Abbasi y Lazarovits, 2006 |
| <i>P. ultimum</i> | <i>C. sativus</i> | Potasio | Mofidnakhai <i>et al.</i> , 2016 |
| Hongos | | | |
| <i>Alternaria alternata</i> | <i>Malus domestica</i> | Potasio | Reuveni <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>Cercospora coffeicola</i> | <i>Coffea arabica</i> | Potasio | Costa <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Cochliobolus miyabeanus</i> | <i>Oryza sativa</i> | Potasio | Nascimento <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <i>C. arabica</i> | Potasio | Ogoshi <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | <i>Fragaria vesca</i> | Potasio | MacKenzie <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>C. gloeosporioides</i> | <i>Malus domestica</i> | Potasio | Araujo <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>Fusarium solani</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Calcio | Lobato <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>F. solani</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Lobato <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Fusicladium effusum</i> | <i>Carya illinoensis</i> | Potasio | Bock <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Hemileia vastatrix</i> | <i>Coffea arabica</i> | Potasio | Costa <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Oidium sp.</i> | <i>Cucumis sativus</i> | Potasio | Yáñez <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Oidium sp.</i> | <i>C. sativus</i> | Potasio | Yáñez <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Penicillium digitatum</i> | <i>Citrus limon</i> | Potasio | Cerioni <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>P. italicum</i> | <i>C. limon</i> | Potasio | Cerioni <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>P. expansum</i> | <i>Malus domestica</i> | Potasio | Amiri y Bompeix, 2011 |
| <i>P. expansum</i> | <i>Malus domestica</i> | Potasio | Lai <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Calcio | Lobato <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. solani</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Lobato <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Venturia inaequalis</i> | <i>S. tuberosum</i> | Potasio | Percival <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>V. pirina</i> | <i>Pyrus communis</i> | Potasio | Percival <i>et al.</i> , 2009 |
| Bacterias | | | |
| <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Solanum tuberosum</i> | Potasio | Lobato <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>E. amylovora</i> | <i>Pyrus malus</i> | Potasio | Aćimović <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Pseudomonas syringae pv. actinidiae</i> | <i>Actinidia deliciosa</i> | Aluminio | Monchiero <i>et al.</i> , 2015 |
| Nematodos | | | |
| <i>Helicotylenchus spp.</i> | <i>Musa paradisiaca</i> | Potasio | Quintero-Vargas y Castaño-Zapata, 2012 |
| <i>Heterodera avenae</i> | <i>Avena sativa</i> | Potasio | Oka <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Meloidogyne marylandi</i> | <i>Triticum aestivum</i> | Potasio | Oka <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>Meloidogyne spp.</i> | <i>M. paradisiaca</i> | Potasio | Quintero-Vargas y Castaño-Zapata, 2012 |
| <i>Pratylenchus bracyurus</i> | <i>Glycine max</i> | Potasio | Dias-Areira <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>Pratylenchus bracyurus</i> | <i>Zea mays</i> | Potasio | Dias-Areira <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>P. bracyurus</i> | <i>Zea mays</i> | Manganeso | Puerari <i>et al.</i> , 20015 |
| <i>Radopholus similis</i> | <i>M. paradisiaca</i> | Potasio | Quintero-Vargas y Castaño-Zapata, 2012 |

EFICACIA

Los niveles de eficacia de los fosfitos en el control de organismos fitoparásitos varían dependiendo de: ión unido al fosfito, método de aplicación, organismo patógeno y planta hospedante (Cuadro 2; Figura 2); por ejemplo, la inmersión de frutos de mandarina en soluciones elaboradas con fosfito de calcio y potasio, sirvió para disminuir 50% de frutos dañados por moho verde de los cítricos, originado por *Penicillium digitatum* (Cerioni *et al.*, 2013); también, plantas de soya tratadas con fosfito de potasio mostraron hasta 50% menos daño por *Peronospora manshurica* en comparación con las plantas sin tratar (Silva *et al.*, 2011). Abbasi y Lazarovits (2006) reportan 80% menos plantas de pepino infectadas por *Pythium* spp. cuando las semillas fueron tratadas por inmersión en soluciones con fosfito de cobre. Ogoshi *et al.* (2013) obtuvieron disminución de 62.5% en la severidad de *Colletotrichum gloeosporioides* en plantas de café tratadas con fosfito de potasio. También, 93% de

Cuadro 2. Sensibilidad a fosfitos de patógenos en papa (Tomado de Lobato *et al.*, 2010).

Table 2. Pathogen sensitivity to phosphites in potato (Taken from Lobato *et al.*, 2010).

| | Fosfito de calcio | Fosfito de potasio | Fosfito de cobre |
|-------------------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| Patógeno | | mg mL ⁻¹ | |
| <i>Phytophthora infestans</i> | 0.09 ^x | 0.15 | <0.04 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | 1.87 | >3.56 | 1.04 |
| <i>Fusarium solani</i> | 1.29 | >3.56 | 0.68 |
| <i>Streptomyces scabies</i> | 0.83 | 1.99 | 0.22 |

^xConcentración del compuesto para inhibir el 50% de su crecimiento / ^xCompound concentration to inhibit 50% growth.

Compared with conventional synthetic fungicides, phosphites are usually less effective to reduce damages caused by phytopathogens. Méndez *et al.* (2010) were able to reduce the damage caused by *Pseudoperonospora cubensis* in melon plants treated with chlorothalonil and mancozeb, but not in those that were treated with potassium phosphite (Figure 3). Acímović *et al.* (2016) were also able to significantly reduce the incidence of *Erwinia*

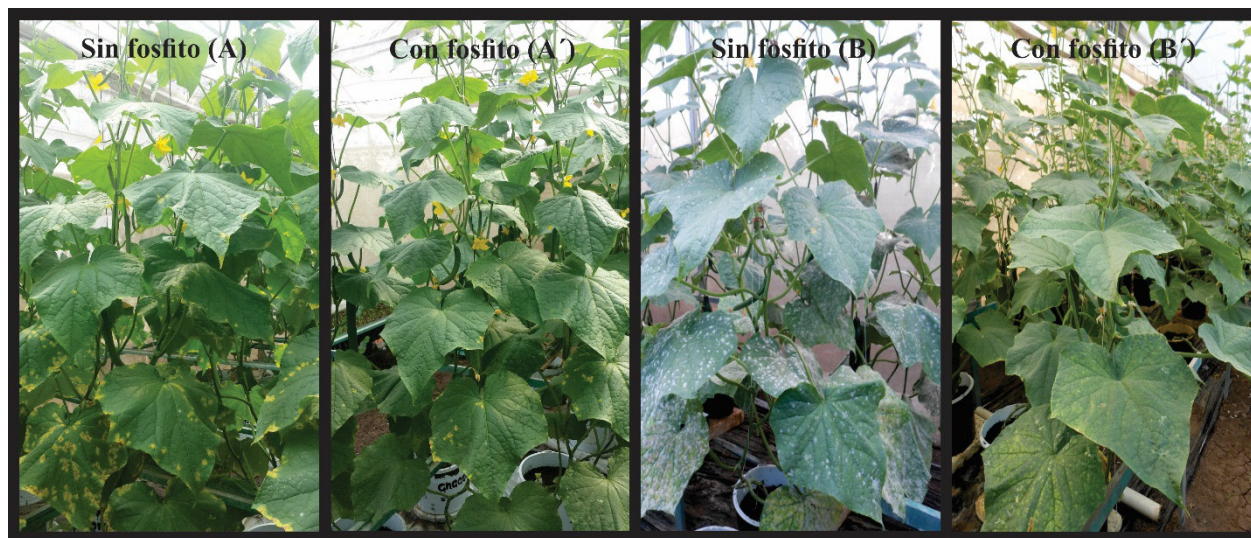


Figura 2. Incidencia y severidad de *Pseudoperonospora cubensis* (A y A') y *Sphaerotheca fuliginea* (B y B') en plantas de pepino cultivadas en invernadero.

Figure 2. Incidence and severity of *Pseudoperonospora cubensis* (A and A') and *Sphaerotheca fuliginea* (B and B') in cucumber plants cultivated in the greenhouse.

las plantas de papaya tratadas con fosfito de potasio sobrevivieron al ataque de *Phytophthora palmivora*, en contraste con el 24% de sobrevivencia de las plantas sin tratar (Vawdrey y Westerhuis, 2007).

En comparación con los fungicidas convencionales sintetizados, los fosfitos generalmente son menos eficaces para disminuir el daño por los patógenos que atacan plantas, al respecto Méndez *et al.* (2010) consiguieron que plantas de melón tratadas con clorotalonil y mancozeb, mostraran menor daño por *Pseudoperonospora cubensis* que aquellas que recibieron tratamiento con fosfito de potasio (Figura 3). También, Aćimović *et al.* (2016) lograron incidencia de *Erwinia amylovora* significativamente inferior con sulfato de estreptomycin, en comparación con la incidencia obtenida con fosfito de potasio, cuando esos compuestos se inyectaron al tallo de árboles de manzana (Figura 4). Meyer y Hausbeck (2013) reportaron disminución significativa en la incidencia de plantas de calabaza muertas

amylovora using streptomycin sulfate, compared with the incidence of the pathogen when they used potassium phosphite (Figure 4); the compounds were injected into apple tree trunks. Meyer and Hausbeck (2013) reported a significant decrease in the incidence of death squash plants infected by *Phytophthora capsici* when they were treated with fluopicolide, mandipropamid or dimethomorph fungicides, compared with the incidence of plants treated with potassium phosphite. In general, the reports on the effectiveness of phosphites and conventional fungicides in controlling phytoparasite organisms suggest that phosphites are less effective and could not replace fungicides at all, but that if they are included as part of an integrated pest management program they could help reduce the use of fungicides as well as the probability that the organisms develop resistance (Liljeroth *et al.*, 2016). Méndez *et al.* (2010) reported similar effectiveness against *Pseudoperonospora cubensis* in squash plants by alternately using chlorothalonil/

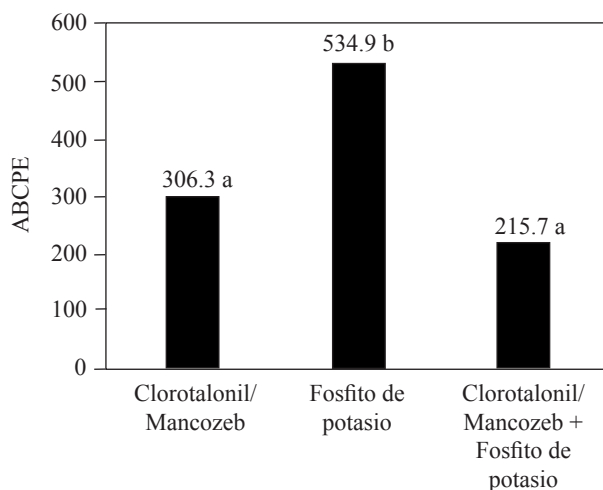


Figura 3. Promedio del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) obtenido con el tratamiento para el combate de *Pseudoperonospora cubensis* en plantas de pepino (Elaboración de los autores con datos de Méndez *et al.*, 2010).

Figure 3. Average area under the progress curve (ABCPE) from a treatment against *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber plants (Developed by the authors with data from Méndez *et al.*, 2010).

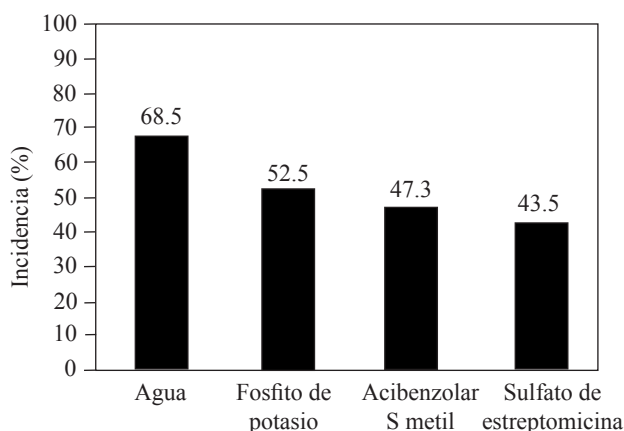


Figura 4. Control de *Erwinia amylovora* después de dos aplicaciones de inductor de resistencia o antibiótico, al tronco de árboles de manzana (Elaboración de los autores con datos de Aćimović *et al.*, 2016).

Figure 4. Control of *Erwinia amylovora* after two applications of a resistance inducer or antibiotics to trunks of apple trees (Developed by the authors with data from Aćimović *et al.*, 2016).

por *Phytophthora capsici*, cuando fueron tratadas con los fungicidas fluopicolide, mandipropamid o dimethomorph, en comparación con la incidencia registrada en las plantas tratadas con fosfito de potasio. En general, los reportes comparativos de la eficacia en el control entre los fosfitos y los fungicidas convencionales, indican que los primeros son menos eficaces y que no los podrían sustituir por completo, pero su integración como parte de un programa de manejo integrado puede permitir disminuir el uso de fungicidas y reducir la posibilidad de generar resistencia por los organismos (Liljeroth *et al.*, 2016). Al respecto, Méndez *et al.* (2010) determinaron eficacia similar en el combate de *Pseudoperonospora cubensis* en plantas de calabaza con clorotalonil/mancozeb y fosfito de potasio aplicados de manera alternada, comparada con la eficacia registrada cuando se utilizó únicamente los fungicidas (Figura 3). También, Liljeroth *et al.* (2016) reportaron que la protección contra *Phytophthora infestans* en papa, fue semejante cuando los fungicidas fluazinam, cyazofamida, mandipropamida, metalaxyl + fluazinam o fluopicolide + propamocarb, se usaron al 100% de la dosis recomendada o al 50% de la dosis en mezcla con fosfito de potasio.

MODO DE ACCIÓN

Los mecanismos de acción involucrados en los efectos profilácticos de los fosfitos incluyen acción directa e indirecta. Se ha determinado que el ion fosfito al entrar en contacto con los organismos fitopatógenos, afecta su crecimiento y reproducción al influir en la expresión de genes que codifican la síntesis de compuestos indispensables en la estructura y fisiología celular (acción directa). Además, al entrar a las células del tejido vegetal (acción indirecta) activa los mecanismos bioquímicos (producción de: polisacáridos, proteínas relacionadas con la patogénesis, fitoalexinas, etc.) y

mancozeb and potassium phosphite compared with the effectiveness when using only fungicides (Figure 3). Liljeroth *et al.* (2016) also reported that the protection against *Phytophthora infestans* in potato was similar using fluazinam, cyazofamid, mandipropamid, metalaxyl + fluazinam or fluopicolide + propamocarb at 100% of the recommended dose, or at 50% of the dose mixed with potassium phosphite.

ACTION MODE

The action mechanisms involved in the prophylactic effects of phosphites include direct and indirect action. It has been stated that when the phosphite ion come into contact with phytopathogen organisms, it affects their growth and reproduction, because it influences the expression of genes that encode the synthesis of essential compounds in their cell structure and physiology (direct action). When the phosphite ion enters the plant tissue cells (indirect action) activates biochemical (production of: polysaccharides, proteins related to pathogenesis, phytoalexins, etc.) and structural defense (such as callose deposition) mechanisms that restrict pathogens penetration and survival in the plant (Figure 5).

Direct action

The addition of phosphites to the medium culture reduced mycelium growth, as well as the number of spore-generating structures and of produced and germinated spores (Figure 6). Thus, with this practice, we observed a growth decrease of *Alternaria alternata* (Reuveni *et al.*, 2003), *Colletotrichum gloeosporioides* (Araujo *et al.*, 2010), *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* (Hofgaard *et al.*, 2010), *Mycosphaerella fijiensis* (Mogollón and Castaño, 2012), *Penicillium*

estructurales de defensa (como la deposición de calosa) que restringen la penetración y supervivencia de los patógenos en la planta (Figura 5).

Acción directa

Los fosfitos adicionados al medio de cultivo para organismos fitopatógenos, originaron que disminuyera el crecimiento del micelio, el número de estructuras generadoras de esporas, la cantidad de esporas producidas y su germinación (Figura 6). Así, mediante esa práctica se reportó disminución en el crecimiento de *Alternaria alternata* (Reuveni *et al.*, 2003), *Colletotrichum gloeosporioides* (Araujo *et al.*, 2010), *Fusarium culmorum* y *F. graminearum* (Hofgaard *et al.*, 2010), *Mycosphaerella*

digitatum (Cerioni *et al.*, 2013), *Phytophthora cinnamomi* (Wilkinson *et al.*, 2001; Won *et al.*, 2009; King *et al.*, 2010), *P. cinnamomi*, *P. palmivora* and *P. nicotianae* (Smillie *et al.*, 1989), *P. infestans* (Bórza *et al.*, 2014), *P. plurivora* (Dalio *et al.*, 2014) and *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum*, *P. torulosum*, *P. volutum* and *P. graminicola* (Cook *et al.*, 2009). The decrease level in the microorganisms' growth as a consequence of the phosphite ion is determined by the organism tested, amount of phosphite added to the culture medium, type of ion bonded to phosphite and pH produced by the culture medium (Lobato *et al.*, 2010).

The susceptibility of the microorganisms to the phosphite ion was demonstrated by Wong *et*

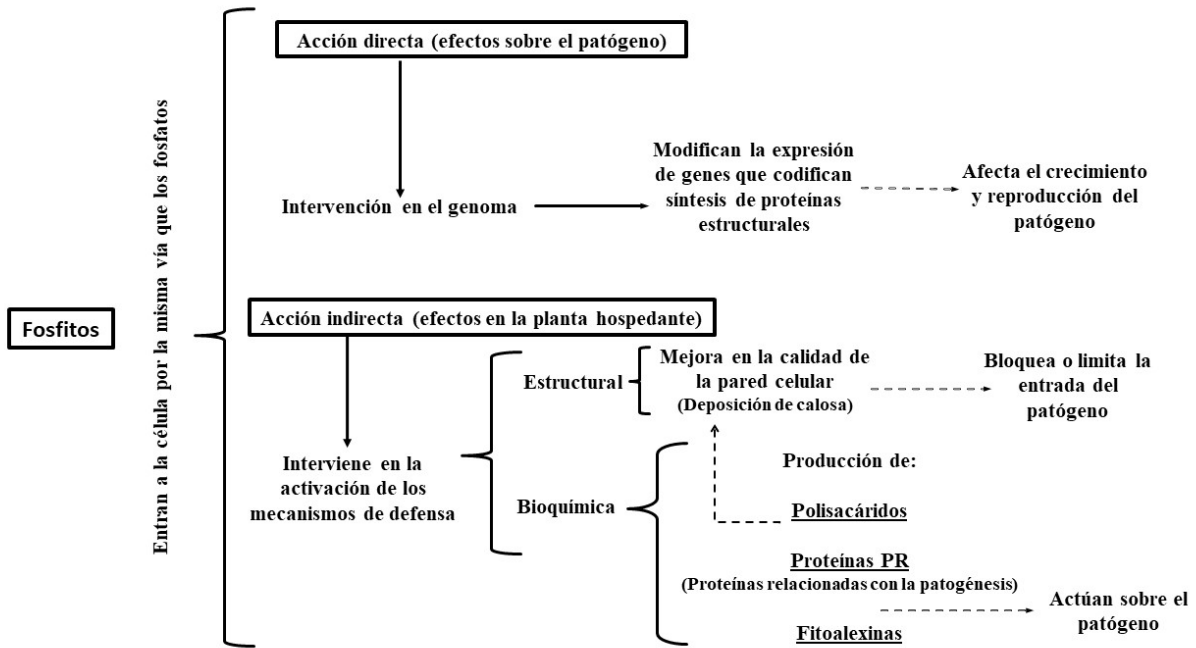


Figura 5. Modo de acción de los fosfitos, representación esquemática (Elaboración de los autores con datos de: Daniel y Guest, 2006; Jackson *et al.*, 2000; King *et al.*, 2010; Eshraghi *et al.*, 2011; Olivieri *et al.*, 2012; Cerioni *et al.*, 2013; Dalio *et al.*, 2014).

Figure 5. Action mode of phosphites, schematic representation (developed by the authors using data from Daniel and Guest, 2006; Jackson *et al.*, 2000; King *et al.*, 2010; Eshraghi *et al.*, 2011; Olivieri *et al.*, 2012; Cerioni *et al.*, 2013; Dalio *et al.*, 2014).

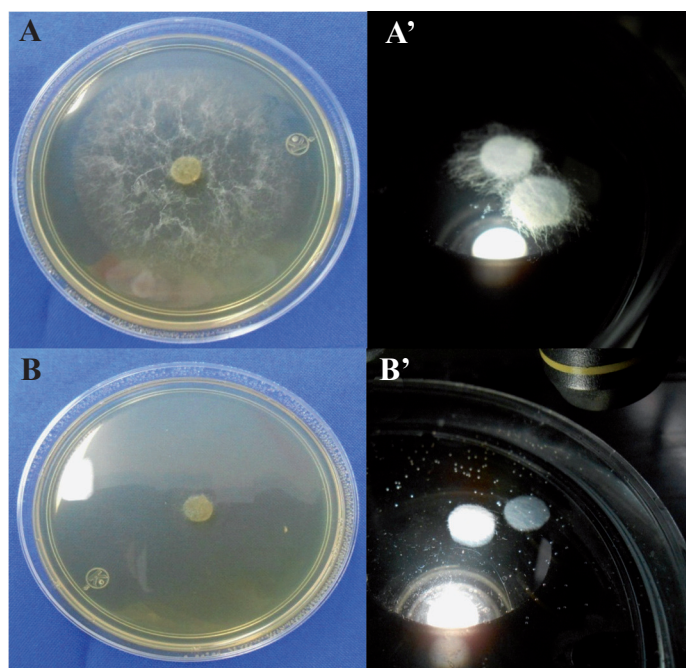


Figura 6. Crecimiento de *Pythium aphanidermatum* en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (izquierda) y agua destilada (derecha). A y A' sin fosfito de potasio; B y B' con fosfito de potasio.

Figure 6. *Pythium aphanidermatum* in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium (left) and distilled water (right). A and A' without potassium phosphite; B and B' with potassium phosphite.

fijiensis (Mogollón y Castaño, 2012), *Penicillium digitatum* (Cerioni *et al.*, 2013), *Phytophthora cinnamomi* (Wilkinson *et al.*, 2001; Won *et al.*, 2009; King *et al.*, 2010), *P. cinnamomi*, *P. palmivora* y *P. nicotianae* (Smillie *et al.*, 1989), *P. infestans* (Bórza *et al.*, 2014), *P. plurivora* (Dalio *et al.*, 2014) y *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum*, *P. torulosum*, *P. volutum* y *P. graminicola* (Cook *et al.*, 2009). El grado de disminución en el crecimiento de los microorganismos como consecuencia del ion fosfito, está determinado por el organismo ensayado, la cantidad de fosfito agregado al medio de cultivo, el tipo de ion unido al fosfito y el pH que se origine en el medio de cultivo (Lobato *et al.*, 2010).

La susceptibilidad de los microorganismos al ion fosfito fue comprobada por Wong *et al.* (2009),

al. (2009), who determined the negative effect of phosphite and the positive effect of phosphate on *Phytophthora cinnamomic* growth, when grown in a culture medium enriched with salts containing each ion individually.

As for interspecific susceptibility, Hofgaard *et al.* (2010) were able to reduce *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *Microdochium majus* mycelium growth by 60, 80 and 90%, respectively, using 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ of potassium phosphite. To inhibit *Phytophthora infestans in vitro* growth, Lobato *et al.* (2010) used a lower dose, followed by the dose used to inhibit *Streptomyces scabies*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* growth.

The intraspecific susceptibility was studied by Wilkinson *et al.* (2001), who determined that from 21 *Phytophthora cinnamomi* isolates collected

quienes determinaron el efecto negativo de fosfito y el positivo de fosfato sobre el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*, cuando creció en medio de cultivo enriquecido con sales que contenían cada ion de manera individual.

En relación a la susceptibilidad interespecífica, Hofgaard *et al.* (2010) obtuvieron disminuciones de 60, 80 y 90% en el crecimiento del micelio de *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* y *Microdochium majus*, respectivamente, con 10 $\mu\text{l ml}^{-1}$ de fosfito de potasio. Lobato *et al.* (2010) determinaron que para inhibir el crecimiento *in vitro*, la dosis menor se empleó para *Phytophthora infestans*, seguida de la usada para inhibir a *Streptomyces scabies*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*.

La susceptibilidad intraespecífica fue estudiada por Wilkinson *et al.* (2001), quienes determinaron que de 21 aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* colectados en el oeste de Australia, 9% resultaron susceptibles a fosfito de potasio, 82% mostraron susceptibilidad intermedia y 9% fueron tolerantes. Smillie *et al.* (1989) determinaron la susceptibilidad de *Phytophthora cinnamomi*, *P. palmivora* y *P. nicotiana* a fosfito de potasio, explicando además que a medida que la concentración de fosfito se incrementó en el medio de cultivo, disminuyó el peso de la biomasa producida por las tres especies de *Phytophthora*. También Cook *et al.* (2009) evaluaron la concentración necesaria de fosfito y el fungicida mefenoxan, para inhibir el 50% del crecimiento del micelio de ocho aislamientos de *Pythium aphanidermatum*, y reportaron que todos los aislamientos fueron susceptibles a los dos compuestos, pero que las concentraciones de fosfito utilizadas fueron mayores que las del fungicida.

Por otro lado, el ion fosfito disminuyó el pH en el medio de cultivo a niveles de acidez que se relacionaron con menor crecimiento de *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Streptomyces scabies* (Lobato *et al.*, 2010). Araujo *et*

in western Australia, 9% were susceptible, 82% intermediate susceptible and 9% tolerant. Smillie *et al.* (1989) showed *Phytophthora cinnamomi*, *P. palmivora* and *P. nicotiana* susceptibility to potassium phosphite, and explained that as the concentration of phosphite increased in the culture medium, the weight of the biomass produced by *Phytophthora* species decreased. Cook *et al.* (2009) also evaluated the concentration of phosphite and mefenoxan fungicide needed to inhibit 50% mycelium growth of eight *Pythium aphanidermatum* isolates, and reported that all the isolates were susceptible to both compounds, but that the concentrations of phosphite were higher than those of the fungicide.

On the other hand, the phosphate ion reduced pH in the culture medium at acidity levels that were associated with *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* and *Streptomyces scabies* low growth (Lobato *et al.*, 2010). Araujo *et al.* (2010) reported a larger decrease in the diameter of *Colletotrichum gloeosporioides* colonies as well as in the growth speed index using formulations containing potassium phosphite, which reduced pH in the medium culture. Also, potassium phosphite affected *Alternaria alternata* (Reuveni *et al.*, 2003), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ogoshi *et al.*, 2013), *Penicillium digitatum* (Cerioni *et al.*, 2013), *P. expansum* (Amiri and Bompeix, 2011) and *Peronospora parasitica* (Becót *et al.*, 2000) spore germination, as well as *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* (Davis and Grant, 1996), *Mycosphaerella fijiensis* (Mogollón y Castaño, 2012), *Peronospora sparsa* (Hukkanen *et al.*, 2008), *Phytophthora plurivora* (Dalio *et al.*, 2014) and *P. cinnamomi* (Wong *et al.*, 2009) spore production.

The effect of phosphites added to a medium culture was explained by King *et al.* (2010), who reported changes induced by potassium phosphite

al. (2010) reportaron mayor disminución del diámetro de las colonias y el índice de velocidad de crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, con formulaciones de fosfito de potasio que originaron mayor disminución del pH en el medio de cultivo. Además, fosfito de potasio afectó la germinación de esporas de *Alternaria alternata* (Reuveni *et al.*, 2003), *Colletotrichum gloeosporioides* (Ogoshi *et al.*, 2013), *Penicillium digitatum* (Cerioni *et al.*, 2013), *P. expansum* (Amiri y Bompeix, 2011) y *Peronospora parasitica* (Becót *et al.*, 2000); así como la producción de esporas de *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* (Davis y Grant, 1996), *Mycosphaerella fijiensis* (Mogollón y Castaño, 2012), *Peronospora sparsa* (Hukkanen *et al.*, 2008), *Phytophthora plurivora* (Dalio *et al.*, 2014) y *P. cinnamomi* (Wong *et al.*, 2009).

El efecto de los fosfitos agregados al medio de cultivo fue explicado por King *et al.* (2010), quienes reportaron modificación inducida por fosfito de potasio en la expresión de genes que codifican la síntesis de proteínas que constituyen la pared y el citoesqueleto de las células de *Phytophthora cinnamomi*, lo que originó distorsión de hifas y lisis de pared celular.

Acción indirecta

La acción indirecta del ión fosfito incluye la estimulación de los mecanismos de defensa estructural y bioquímica en las plantas; así, Pilbeam *et al.* (2011) describieron deposición de lignina y suberina alrededor del tejido dañado por *Phytophthora cinnamomi* en plantas de eucalipto tratadas con fosfito de potasio, efecto que limitó el desarrollo del patógeno. También Olivieri *et al.* (2012) refirieron aumento en el contenido de pectina en el tejido de la peridermis y la corteza, en tubérculos procedentes de plantas de papa tratadas con fosfito de potasio, condición que mejora la resistencia a

in the expression of the genes that encode protein synthesis and builds *Phytophthora cinnamomi* cells and cytoskeleton, which caused hyphae distortion and cell wall lysis.

Indirect action

The indirect action of the phosphite ion includes stimulation of structural and biochemical defense mechanisms in plants. Pilbeam *et al.* (2011) described lignin and suberine deposition around tissue damaged by *Phytophthora cinnamomi* in eucalyptus plants treated with potassium phosphite, which limited the pathogen's development. Olivieri *et al.* (2012) reported an increased pectin content in periderm and cortex tissue and tubers from potato plants treated with potassium phosphite, a feature that improves resistance to different pathogens. Jackson *et al.* (2000) reported that the development of lesions caused by *P. cinnamomi* was highly restricted when they applied a high concentration of phosphite in *Eucalyptus marginata* tissue, and that the reduced number of lesions was associated with a significant increase of defense enzymes (4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) and cinnamyl-alcohol dehydrogenase) and soluble phenols. Daniel and Guest (2006) demonstrated that when *Arabidopsis thaliana* plantlets were treated with potassium phosphite and inoculated with *Phytophthora palmivora* zoospores, the infected cells showed increased cytoplasmic activity, development of cytoplasmic aggregates, release of hydrogen peroxide, located cell death, and enhanced phenolic compounds accumulation. Eshraghi *et al.* (2011) also reported that when *Arabidopsis thaliana* plantlets were treated with potassium phosphite and inoculated with *Phytophthora cinnamomi*, the infected cells increased their production of calose and hydrogen peroxide.

diversos patógenos. Jackson *et al.* (2000) reportaron que el desarrollo de lesiones por *P. cinnamomi* fue altamente restringido, cuando la concentración de fosfito en el tejido de *Eucalyptus marginata* fue alta y la disminución en el desarrollo de lesiones se asoció con un aumento significativo de las enzimas de defensa (4-coumarato coenzima A ligasa y deshidrogenasa de alcohol cinnamyl) y de fenoles solubles. Daniel y Guest (2006) demostraron que en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, tratadas con fosfito de potasio e inoculadas con zoosporas de *Phytophthora palmivora*, las células infectadas aumentaron la actividad citoplasmática, el desarrollo de agregados citoplasmáticos, la liberación de peróxido de hidrógeno, muerte celular localizada y mejoraron la acumulación de compuestos fenólicos. Eshraghi *et al.* (2011) también reportaron que en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, tratadas con fosfito de potasio e inoculadas con *Phytophthora cinnamomi*, la producción de calosa y de peróxido de hidrógeno se incrementó en las células infectadas.

CONCLUSIONES

Los fosfitos son compuestos eficaces para el control de protozoarios, oomycetes, hongos, bacterias y nematodos fitoparásitos, sin embargo, en comparación con los fungicidas convencionales sintetizados suelen ser menos eficaces. Los niveles de eficacia de los fosfitos para resolver problemas fitopatológicos están en relación con: organismo problema, planta hospedante e ion unido al fosfito. Por su eficiente translocación en tejido vegetal, se pueden suministrar al follaje, tallos, raíces o frutos. Los mecanismos de acción involucrados en los efectos profilácticos de los fosfitos son diversos e incluyen la estimulación de los mecanismos de defensa bioquímica y estructural en las plantas, además de la acción directa que restringe el crecimiento,

CONCLUSIONS

Phosphites are effective compounds to control protozoa, oomycetes, fungi, bacteria and phytoparasite nematodes, but compared with synthetic conventional fungicides, they tend to be less effective. The effectiveness level of phosphites to solve phytopathological problems is associated with the problem organism, the host plant and the ion bonded to phosphite. Because of its efficient translocation in plant tissue, they can be applied to canopy, stems, roots or fruits. The action mechanisms involved in the prophylactic effects of phosphites are diverse and include the stimulation of biochemical and structural defense mechanisms in plants, besides the direct action that limits phytoparasite organisms' growth, development and reproduction. Integrating phosphites as part of a phytopathological problems management program allows to reduce the number of fungicide applications as well as the probability that the organisms develop resistance.

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

desarrollo y reproducción de los organismos fitoparásitos. La integración de los fosfitos como parte de un programa de manejo de problemas fitopatológicos permite disminuir el número de aplicaciones de fungicidas y reducir la posibilidad de generar resistencia por los organismos fitoparásitos.

## LITERATURA CITADA

Abbasi PA and Lazarovits G. 2006. Seed treatment with phosphonate (AG3) suppresses *Pythium* damping-off of cucumber seedlings. *Plant Disease* 90:459-464. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0459>

- Achary VMM, Ram B, Manna M, Datta D, Bhatt A, Reddy M and Agrawal PR. 2017. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. *Plant Biotechnology Journal* 1-16. <https://doi.org/10.1111/pbi.12803>
- Acimović SG, Zeng Q, McGhee GC, Sundin GW and Wise JC. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Front. Plant Science* 6:1-6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00016>
- Acimović SG, VanWoerkom AH, Garavaglia T, Vandervoort C, Sundin GW and Wise JC. 2016. Seasonal and cross-seasonal timing of fungicide trunk injections in apple trees to optimize management of apple scab. *Plant Disease* 100:1606-1616. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1061-RE>
- Akinsanmi OA and Drenth A. 2013. Phosphite and metalaxyl rejuvenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Crop Protection* 53:29-36. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.06.007>
- Alexandersson E, Mulugeta T, Lankinen Å, Liljeroth E and Andreasson E. 2016. Plant resistance inducers against pathogens in *Solanaceae* species-from molecular mechanisms to field application. *International Journal Molecular Sciences* 17:1-25. <https://doi.org/10.3390/ijms17101673>
- Amiri A and Bompeix G. 2011. Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. *Crop Protection* 30:222-227. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.10.010>
- Anderson JM, Pegg KG, Scott C and Drenth A. 2012. Phosphonate applied as a pre-plant dip controls *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot in susceptible pineapple hybrids. *Australasian Plant Pathology* 41:59-68. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0090-6>
- Araújo L, Valdebenito-Sanhueza RM and Stadnik MJ. 2010. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infecional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. *Tropical Plant Pathology* 35:54-59. <http://www.scielo.br/pdf/tpp/v35n1/a10v35n1>
- Becót S, Pajot E, Le Corred D, Monot C and Silué D. 2000. Phytogard (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection* 19:417-425. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00034-X)
- Bock CH, Brenneman TB, Hotchkiss MW and Wood BW. 2012. Evaluation of a phosphite fungicide to control pecan scab in the southeastern USA. *Crop Protection* 36:58-64. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.009>
- Borin RC, Possenti JC, Rey MS, Bernardi C and Mazaro SM. 2017. Phosphites associated to fungicides for diseases control and sanity in corn seeds. *Applied Research and Agrotechnology* 10:83-92. <https://doi.org/10.5935/PAeT.V10.N1.09>
- Borza T, Peters RD, Wu Y, Schofield A, Rand J, Ganga Z, Al-Mughrabi KI, Coffin RH and Wang-Pruski G. 2017. Phosphite uptake and distribution in potato tubers following foliar and postharvest applications of phosphite-based fungicides for late blight control. *Annals of Applied Biology* 1:127-139. <https://doi.org/10.1111/aab.12322>
- Borza T, Schofield A, Sakthivel G, Bergese J, Gao X, Rand J and Wang-Pruski G. 2014. Ion chromatography analysis of phosphite uptake and translocation by potato plants: dose-dependent uptake and inhibition of *Phytophthora infestans* development. *Crop Protection* 56:74-81. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.024>
- Cerioni L, Rapisarda VA, Doctor J, Fikkert S, Ruiz T, Fassel R and Smilanick JL. 2013. Use of phosphite salts in laboratory and semicommercial tests to control citrus postharvest decay. *Plant Disease* 97:201-212. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0299-RE>
- Cook PJ, Landschoot PJ and Schlossberg MJ. 2009. Inhibition of *Pythium* spp. and suppression of Pythium blight of turfgrasses with phosphonate fungicides. *Plant Disease* 93:809-814. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0809>
- Costa BHG, De Resende MLV, Ribeiro PM, Mathioni SM, Padua MS and Da Silva MJB. 2014. Suppression of rust and brown eye spot diseases on coffee by phosphites and by-products of coffee and citrus industries. *Journal of Phytopathology* 162:635-642. <https://doi.org/10.1111/jph.12237>
- Dalio RJD, Fleischmann F, Humez M and Osswald W. 2014. Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. *PLoS One* 9, e87860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087860>
- Daniel R and Guest D. 2006. Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:194-201. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2006.01.003>
- Davis AJ and Grant GR. 1996. The effect of phosphonate on the sporulation of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Australasian Plant Pathology* 25:31-35. <https://doi.org/10.1071/AP96007>
- Dias-Arieira CRP, Marini PM, Fontana LF, Roldi M and Silva TRB. 2012. Effect of *Azospirillum brasilense*, Stimulate® and potassium phosphite to control *Pratylenchus brachyurus* in soybean and maize. *Nematropica* 42:170-175. <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/79597/76915>
- Deliopoulos T, Kettlewell PS and Hare MC. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: a review. *Crop Protection* 29:1059-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.05.011>
- Eshraghi L, Anderson J, Aryamanesh N, Shearer B, McComb J, Hardy GES and O'Brien PA. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* 60:1086-1095. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02471.x>
- Förster H, Adaskaveg JE, Kim DH and Stanghellini ME. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Disease* 82:1165-1170. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.10.1165>
- Gómez-Merino FC and Trejo-Téllez LI. 2015. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:82-90. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.035>
- Hardy GES, Barrett S and Shearer BL. 2001. The future of phosphite as a fungicide to control the soilborne plant pathogen *Phytophthora cinnamomi* in natural ecosystems.

- Australians Plant Pathology 30:133-139. <https://doi.org/10.1071/AP01012>
- Hofgaard IS, Ergon A, Henriksen B and Tronsmo AM. 2010. The effect of potential resistance inducers on development of *Microdochium majus* and *Fusarium culmorum* in winter wheat. European Journal of Plant Pathology 128:269-281. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9662-5>
- Hukkanen A, Kostamo K, Kärenlampi S and Kokko H. 2008. Impact of agrochemicals on *Peronospora sparsa* and phenolic profiles in three *Rubus arcticus* cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:1008-1016. <https://doi.org/10.1021/jf072973p>
- Jackson TJ, Burgess T, Colquhoun I and Hardy GESTJ. 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathology 49:147-154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00422.x>
- Kammerich J, Beckmann S, Scharafat I and Ludwig-Müller J. 2014. Suppression of the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* by plant growth promoting formulations in roots of two *Brassica* species. Plant Pathology 63:846-857. <https://doi.org/10.1111/ppa.12148>
- King M, Reeve W, Van der Hoek M.B, Williams N, McComb J, O'Brien PA and Hardy GE. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Mol Genet Genomics 284:425-35. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0579-7>
- Kromann P, Pérez WG, Taïpe A, Schulte-Geldermann E, Sharma BP, Andrade-Piedra JL and Forbes GA. 2012. Use of phosphonate to manage foliar potato late blight in developing countries. Plant Disease 96:1008-1015. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-12-11-1029-RE>
- Lai T, Wang Y, Fan Y, Zhou Y, Bao Y and Zhou T. 2017. The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment. International Journal of Food Microbiology 244:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.017>
- Liljeroth E, Lankinen Å, Wiik L, Burra DD, Alexandersson E and Andreasson E. 2016. Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. Crop Protection 86:42-55. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.003>
- Lobato MC, Machinandierena MF, Tambascio C, Dosio GAA, Caldiz DO, Dalio GR, Andreu AB and Olivieri FP. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. European Journal Plant Pathology 130:155-163. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9741-2>
- Lobato MC, Olivieri FP, González AEA, Wolski EA, Daleo GR, Caldiz DO and Andreu AB. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. European Journal Plant Pathology 122:349-358. <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9299-9>
- Lobato MC, Olivieri FP, Daleo GR and Andreu AB. 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. Journal Plant Disease Protection 3:102-109. <https://doi.org/10.1007/BF03356343>
- Lovatt CJ and Mikkelsen RL. 2006. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? Better Crops 90:11-13. [https://www.ipni.net/ppiweb/bcrops.nsf/\\$webindex/3EF696A6E5851563852572140026EACD/\\$file/06-4p11.pdf](https://www.ipni.net/ppiweb/bcrops.nsf/$webindex/3EF696A6E5851563852572140026EACD/$file/06-4p11.pdf)
- MacKenzie SJ, Mertely JC and Peres NA. 2009. Curative and protectant activity of fungicides for control of crown rot of strawberry caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Disease 93:815-820. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0815>
- Manna M, Achary VMM, Islam T, Agrawal PK and Reddy MK. 2016. The development of a phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice. Scientific Reports 6:1-13. <https://doi.org/10.1038/srep24941>
- McDonald AE, Grant BR and Plaxton WC. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. Journal Plant Nutrition 24:1505-1519. <http://dx.doi.org/10.1081/PLN-100106017>
- Méndez LW, Arauz LF y Ríos R. 2010. Evaluación de fungicidas convencionales e inductores de resistencia para el combate de mildiú vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*) en melón (*Cucumis melo*). Agronomía Costarricense 34:153-164. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/3629/3534>
- Meyer MD and Hausbeck MK. 2013. Using soil-applied fungicides to manage *Phytophthora* crown and root rot on summer squash. Plant Disease 97:107-112. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-11-1071-RE>
- Mofidnakhai M, Abdossi V, Dehestani A, Pirdashti H and Babaeizad V. 2016. Potassium phosphite affects growth, antioxidant enzymes activity and alleviates disease damage in cucumber plants inoculated with *Pythium ultimum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 49:207-221. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2016.1180924>
- Mogollón AM y Castaño J. 2012. Evaluación *in vitro* de inductores de resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Revista Facultad Nacional de Agronomía 65:6327-6336. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340004>
- Monchiero M, Lodovica MG, Pugliese M, Spadaro D and Garibaldi A. 2015. Efficacy of different chemical and biological products in the control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit. Australasian Plant Pathology 44:13-23. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0328-1>
- Monsalve V, Viteri RSE, Rubio CNJ and Tovar DF. 2012. Efectos del fosfito de potasio en combinación con el fungicida metalaxyl + mancozeb en el control de mildiú vellosa (*Peronospora destructor* Berk) en cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín 65:6317-6325. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340003>
- Nascimento KJT, Araujo L, Resende RS, Schurt DA, Silva WL and Rodrigues FA. 2016. Silicon, acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite in the control of brown spot in rice. Bragantia 75:212-221. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.281>
- Ogoshi C, de Abreu MS, da Silva BM, Neto HS, Júnior PMR and de Resende MLV. 2013. Potassium phosphite: a promising product in the management of diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in coffee plants. Bioscience Journal 29:1558-1565. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/17148/13302>

- Oka Y, Tkachi N and Mor M. 2007. Phosphite inhibits development of the nematodes *Heterodera avenae* and *Meloidogyne marylandi* in cereals. *Phytopathology* 97:396-404. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-4-0396>
- Olivieri FP, Feldman ML, Machinandiarena MF, Lobato MC, Caldiz DO, Dalo GR and Andreu AB. 2012. Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Protection* 32:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.025>
- Oyarburo NS, Machinandiarena MF, Feldman ML, Daleo GR, Andreu AB and Olivieri FP. 2015. Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 88:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.01.003>
- Pagani APS, Dianese AC and Cafê-Filho AC. 2014. Management of wheat blast with synthetic fungicides, partial resistance and silicate and phosphite minerals. *Phytoparasitica* 42:609-617. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0401-x>
- Percival GC, Noviss K and Haynes I. 2009. Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (*Venturia inaequalis*) and pear (*Venturia pirina*) scab. *Crop Protection* 28:629-633. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.03.010>
- Pilbeam RA, Howard K, Shearer BL and Hardy GEJ. 2011. Phosphite stimulated histological responses of *Eucalyptus marginata* to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Tree* 25:1121-1131. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0587-1>
- Pinto KM, Do Nascimento C, Gomes EC, Da Silva HF and Miranda J. 2012. Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. *European Journal Plant Pathology* 134:745-754. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0050-1>
- Puerari HH, Dias-Arieira CR, Cardoso MR, Hernandez I and Brito ODC. 2015. Resistance inducers in the control of root lesion nematodes in resistant and susceptible cultivars of maize. *Phytoparasitica* 43:383-389. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0447-9>
- Quintero-Vargas C y Castaño-Zapata J. 2012. Evaluación de inductores de resistencia para el manejo de nematodos fitoparásitos en plántulas de plátano. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 36:575-586. <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v36n141/v36n141a08.pdf>
- Rebollar-Alviter A, Wilson LL, Madden LV and Ellis MA. 2010. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite with protectant efficacy of azoxystrobin and potassium phosphite for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. *Crop Protection* 29:349-353. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.009>
- Reuveni M, Sheglov D and Cohen Y. 2003. Control of moldy-core decay in apple fruits by  $\beta$ -aminobutyric acids and potassium phosphites. *Plant Disease* 87:933-936. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.933>
- Silva OC, Santos HAA, Dalla-Pria M and May-De Mio LL. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Protection* 30:598-604. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.02.015>
- Smillie R, Grant BR and Guest D. 1989. The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. *Phytopathology* 79:921-926. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-921>
- Tkaczyk M, Kubiak KA, Sawicki J, Nowakowska JA and Oszako T. 2016. The use of phosphates in forestry. *Forest Research Papers* 77:76-81. <https://doi.org/10.1515/frp-2016-0009>
- Vawdrey LL and Westerhuis D. 2007. Field and glasshouse evaluations of metalaxyl, potassium phosphonate, acibenzolar and tea tree oil in managing *Phytophthora* root rot of papaya in far northern Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 36:270-276. <https://doi.org/10.1071/AP07016>
- Wilkinson CJ, Holmes JM, Tynan KM, Colquhoun IJ, McComb JA, Hardy GESTJ and Dell B. 2001. Ability of phosphite applied in a glasshouse trial to control *Phytophthora cinnamomi* in five plant species native to Western Australia. *Australasian Plant Pathology* 30:343-351. <https://doi.org/10.1071/AP01055>
- Wong MA, McComb BJ, Hardy BGEJ and O'Brien PA. 2009. Phosphite induces expression of a putative proteophosphoglycan gene in *Phytophthora cinnamomi*. *Australasian Plant Pathology* 38:235-241. <https://doi.org/10.1071/AP08101>
- Yáñez JMG, Ayala TF, Partida RL, Velázquez AT, Godoy ATP y Díaz VT. 2014. Efecto de bicarbonatos en el control de cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5:991-1000. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342014000600007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000600007)
- Yáñez JMG, León DJF, Godoy ATP, Gastélum LR, López MM, Cruz OJE y Cervantes DL. 2012. Alternativas para el control de la cenicilla (*Oidium* sp.) en pepino (*Cucumis sativus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:259-270. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263123201004>



# The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity

## El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola

María Fernanda Villarreal-Delgado, Eber Daniel Villa-Rodríguez, Luis Alberto Cira-Chávez, María Isabel Estrada-Alvarado, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México; Fannie Isela Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México; Sergio de los Santos-Villalobos\*, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. \*Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

Recibido: 30 de Junio, 2017.

Aceptado: 15 de Diciembre, 2017.

Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5

Primera publicación DOI: 03 de Enero, 2018.

First DOI publication: January 03, 2018.

**Resumen.** El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. En la presente revisión se describe y analiza al género *Bacillus*, y sus principales mecanismos de acción, tales como la excreción de antibióticos, toxinas, sideróforos, enzimas líticas e induciendo la resistencia sistémica,

**Abstract.** The genus *Bacillus* is widely distributed in agro-systems, being one of its main applications the control of diseases in agricultural crops. The present review describes and analyzes the genus *Bacillus*, and its main mechanisms of action, such the excretion of antibiotics, toxins, siderophores, lytic enzymes and Induced systemic resistance, focused on its ability to be used as biocontrol agent of pests and diseases in plants; as well as its use in formulations of biopesticides, which have been incorporated into Integrated Pest Management programs. In addition, the *Bacillus* genus is analyzed in terms of agricultural biosecurity, as well as the principal criteria for the effective selection of biocontrol agents, considering strains not pathogenic to humans, and that do not negatively impact the microbial communities of agro-ecosystems, as a side-effect by its non-specific biological activity against a particular plant pathogen.

enfocado en su capacidad para ser utilizado como agente de control biológico de plagas y enfermedades en plantas; así como su uso en la formulación de bioplaguicidas, que han sido incorporados a los programas de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Además, se analiza el uso del género *Bacillus* en la agricultura bajo un enfoque de bioseguridad agrícola, así como los principales criterios indispensables de selección de agentes de control biológico promisorios, considerando cepas no patogénicas para el ser humano, y que no impacten negativamente a las comunidades microbianas de los agro-ecosistemas, como efecto secundario por su actividad biológica no específica contra un fitopatógeno en particular.

**Palabras clave:** biocontrol, fitopatógenos, bioplaguicidas.

La agricultura representa una actividad determinante en el desarrollo económico, social y ambiental del mundo, ya que contribuye con el 80% de los alimentos que se consumen (FAO, 2014). Sin embargo, aproximadamente entre el 20 y 30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas y enfermedades, siendo los hongos, bacterias, nematodos, virus e insectos los principales agentes causales (Pérez-García *et al.*, 2011). De esta manera, con el objetivo de combatir las enfermedades en los cultivos agrícolas se han utilizado ampliamente diversos compuestos químicos tales como: insecticidas, fungicidas y nematicidas. No obstante, el éxito de la aplicación de estos compuestos en el incremento de la productividad agrícola mundial, su uso excesivo ha impactado negativamente los suelos, ecosistemas y la salud humana, *i.e.* el captan, fungicida utilizado en México, cuyo uso se ha prohibido en otros países por su efecto cancerígeno (Arellano-Aguilar y Rendón, 2016).

**Key words:** biocontrol, phytopathogens, biopesticides.

Agriculture is a decisive activity in worldwide economic, social and environmental development, since it contributes to 80% of the food consumed globally (FAO, 2014). However, approximately 20 to 30% of the agricultural production is affected by pests and diseases, with fungi, bacteria, nematodes, viruses and insects being the main causal agents (Pérez-García *et al.*, 2011). In this way, in order to fight diseases in crops, chemical compounds have been widely used, including insecticides, fungicides and nematicides. However, despite the success in the application of these compounds in the increase of worldwide agricultural activity, their excessive use has had a negative impact on soils, ecosystems and human health, *i.e.* captan, a fungicide used in Mexico, the use of which has been prohibited in other countries due to its carcinogenic effect (Arellano-Aguilar and Rendón, 2016).

On the other hand, the incidence of pests and diseases can be minimized by the use of cultural practices such as crop rotation and the system of planting in separate plots; however, these are not entirely efficient (Sainju *et al.*, 2016). Thus, the Integrated Pest and Disease Management (IPDM) is a crucial alternative in the development of a sustainable agriculture that guarantees global food security, which uses the combination of biological, cultural and chemical methods in a compatible way (from Olivar *et al.*, 2008). The IPDM highlights the use of biological control agents (BCA) as a sustainable alternative to mitigate the negative effects in the productivity and quality of the crops caused by different diseases, reducing the resistance of phytopathogenic organisms, and reducing the contamination of soils and water tables. This helps produce innocuous foods and reduces the costs of agricultural production (Reyes *et al.*, 2015).

Por otra parte, la incidencia de plagas y enfermedades puede ser minimizada por el uso de prácticas culturales, por ejemplo, la rotación de cultivos y el sistema de siembra por parcelas separadas; sin embargo, éstas no son completamente eficientes (Sainju *et al.*, 2016). Así, el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) es una alternativa indispensable en el desarrollo de una agricultura sustentable que garantiza la seguridad alimentaria global, en el cual se utiliza la combinación de métodos biológicos, culturales y químicos de forma compatible (de Olivar *et al.*, 2008). En el MIPE se destaca el uso de agentes de control biológico (ACB) como una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas causada por distintas enfermedades, disminuyendo la resistencia de los organismos fitopatógenos, y reduciendo la contaminación de los suelos y mantos acuíferos. Lo cual permite la producción de alimentos inocuos y disminuye los costos de producción agrícola (Reyes *et al.*, 2015).

El uso de ACB inició a principios del siglo XIX, utilizando organismos vivos o sus metabolitos para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas (Badii *et al.*, 2000). En las últimas décadas, se ha descrito el efecto que ejerce una gran diversidad de microorganismos rizosféricos en el control de organismos fitopatógenos, ya que la rizósfera representa la primera línea de defensa de la planta contra organismos fitopatógenos edáficos, evitando así el establecimiento de éstos en la raíz (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Lo anterior ha conducido al estudio de múltiples mecanismos utilizados por los ACB para controlar el crecimiento, desarrollo e infección de organismos fitopatógenos en diversos cultivos agrícolas de importancia económica, entre estos mecanismos destacan: a) mecanismos de contacto como, hiperparasitismo y predación (Chen *et al.*, 2016); b) la producción de compuestos de

The use of BCA began in the early 19th Century, using live organisms or their metabolites to mitigate diseases in agricultural crops (Badii *et al.*, 2000). In recent decades, the effect of a large diversity of rhizospheric microorganisms in the control of phytopathogenic organisms has been reported, since the rhizosphere represents the first line of defense of the plant against edaphic phytopathogenic organisms, thus avoiding their establishment in the roots (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). This has led to the study of multiple mechanisms used by the BCA to control the growth, development and infection of phytopathogenic organisms in diverse economically important crops; some of the most important of these mechanisms include: a) contact mechanisms such as hyperparasitism and predation (Chen *et al.*, 2016); b) the production of compounds with low molecular weights with a direct effect on the growth of the antibiotic pathogen (phenazines, 2,4-diacetylfluoroglucinol, cyclic lipopeptides), lytic enzymes (chitinases, glucanases, proteases), products of unregulated residues (ammonia, carbon dioxide, hydroxide cyanide) (Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Jaaffar *et al.*, 2017; Piechulla *et al.*, 2017) and c) indirect mechanisms from the competition for space and nutrients (consumption of leached-exudates, production of siderophores, induction to the systemic response in plants through the production of phytohormones and molecular patterns) (Pal and Gardener, 2006; Yu *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2015). These action mechanisms have been observed in the microbial strains used as BCA, in which the *Bacillus* genus has been widely studied due to its high abundance and diversity in agro-systems (soil, water and plant), with a significantly higher population in comparison to other microbial genera, and also due to its diverse metabolic capabilities, with an outstanding capability to produce antibiotics and other antimicrobial and antifungal metabolites

bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno antibióticos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos), enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas), productos de residuos no regulados (amoníaco, dióxido de carbono, cianuro de hidróxido) (Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Jaaffar *et al.*, 2017; Piechulla *et al.*, 2017) y c) mecanismos indirectos por competencia de espacio y nutrientes (consumo de lixiviados-exudados, producción de sideróforos, inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas y patrones moleculares) (Pal y Gardener, 2006; Yu *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2015). Estos mecanismos de acción han sido observados en las cepas microbianas utilizadas como ACB, entre las cuales el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a su alta abundancia y diversidad en los agro-sistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos, y además por sus diversas capacidades metabólicas, destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Por ejemplo, diversos estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está relacionado con la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, *i.e.* el 8.5 y 4% del genoma de las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. subtilis* 168, respectivamente (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Esto justifica el amplio uso de cepas de este género bacteriano como ACB para el control de enfermedades que afectan los cultivos agrícolas. Sin embargo, la eficiencia de cepas sin riesgos a la bioseguridad del género *Bacillus* utilizadas como ACB es maximizada por su introducción efectiva al agro-sistema, induciendo sus mecanismos de control biológico. Así, la presente revisión se centra en analizar y discutir el

(Tejera-Hernández *et al.*, 2011). For example, several molecular studies have revealed that a significant percentage of the genome of strains of the *Bacillus* genus is related to the production of secondary metabolites related to the control of phytopathogens, *i.e.* 8.5 and 4% of the genome of strains *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *B. subtilis* 168, respectively (Raaijmakers and Mazzola, 2012). This justifies the wide use of strains of this bacterial genus as BCA for the control of diseases that affect agricultural crops. However, the efficiency of strains without risks to the biosecurity of the *Bacillus* genus used as BCA is maximized by their effective introduction to the agro-system, inducing their biological control mechanisms. Therefore, this study focuses on the analysis and discussion of the *Bacillus* genus, its main action mechanisms against plant diseases, as well as its implementation, without risks to biosafety with the development of biopesticides, since the scientific foundation of these bioproducts on its action mechanisms, environmental and biosafety implications, and the formulation of biopesticides are decisive for the development of a sustainable agriculture.

## The *Bacillus* genus

### Classification

The *Bacillus* genus was first reported by Cohn (1872), who described it as heat-resistant, endospore-producing bacteria. The species of *Bacillus* belong to the bacteria kingdom; Phylum Firmicutes; Class Bacilli; Order Bacillales and Family Bacillaceae (Maughan and van der Auwera, 2011). Currently, the genus includes over 336 species, which, because of their genetic similarity, can be classified into different groups, the most important of which are a) the group of *B. cereus*,



género *Bacillus*, sus principales mecanismos de acción contra enfermedades en plantas, así como su implementación, sin riesgos a la bioseguridad, mediante el desarrollo de bioplaguicidas, ya que el sustento científico de estos bioproductos sobre sus mecanismos de acción, implicaciones ecológicas, de bioseguridad, y la formulación de los bioplaguicidas son determinantes para el desarrollo de una agricultura sustentable.

## El género *Bacillus*

### Clasificación

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn (1872), quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Maughan y van der Auwera, 2011). Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados: a) el grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye a *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo que incluye a *Bacillus* sp. NRRLB-14911-*coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2010; LPSN, 2016).

### Ecología

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos

related to pathogenicity, which includes *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) the environmental bacilli, which are characteristically present in different habitats, such as the group of *Bacillus subtilis*, composed of *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) the group of *B. clausii-halodurans*; and d) the group that includes *Bacillus* sp. NRRLB-14911-*coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2010; LPSN, 2016).

### Ecology

The *Bacillus* species are widely distributed worldwide due to their ability to form endospores, a characteristic that provides them with resistance and boosts its isolation in several habitats, both water and terrestrial ecosystems, and even in environments under extreme conditions (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). However, soils are considered the main reservoir of this bacterial genus, since most *Bacillus* species are saprophytic and are able to use the large diversity of organic substrates in the soil, making this a complex matrix for the establishment of a large genetic and functional diversity of microbial species (McSpadden, 2004). For this reason, the multiple *Bacillus* species can grow in soil, the cultivable counts are found in the range of log 3 to log 6 per gram of fresh weight of soil, essentially in genetically similar species to the group of *B. subtilis* and *B. cereus* (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). Regardless of rRNA studies in soil contradicting the relative abundance of cultivable and un-cultivable species of this bacterial genus (Kumar *et al.*, 2011).

Under a focus aimed at agricultural sustainability, few investigations have aimed at understanding the specific population diversity and dynamics of *Bacillus* in rhizospheric soils, in which the bacterial communities that inhabit the rhizosphere respond particularly to the soil fertility

como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, el suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas (McSpadden, 2004). Por lo cual, múltiples especies de *Bacillus* pueden desarrollarse en los suelos, cuyos recuentos cultivables se encuentra en el intervalo de log 3 a log 6 por gramo de peso fresco de suelo, esencialmente en especies similares genéticamente al grupo de *B. subtilis* y *B. cereus* (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). No obstante que estudios de ARNr en suelo contradicen la abundancia relativa de especies cultivables y no cultivables de este género bacteriano (Kumar *et al.*, 2011).

Bajo un enfoque dirigido a la sustentabilidad agrícola se han realizado escasas investigaciones con el objetivo de comprender la diversidad y dinámica poblacional específica de *Bacillus* en suelos rizosféricos, donde las comunidades bacterianas que habitan la rizósfera responden particularmente a la fertilidad del suelo y los exudados de las raíces de las plantas, los cuales varían con la fenología y genotipo vegetal (de Souza *et al.*, 2015), por lo que bacterias que interaccionen con las plantas y presenten capacidades asociativas, endofíticas o procesos simbióticos para adaptarse a las condiciones rizosféricas son reconocidas como potenciales inoculantes microbianos. Rudrappa *et al.* (2008) reportaron que la producción de biopelículas de *B. subtilis* FB17 es un mecanismo de colonización rizosférica, esto debido a su atracción por el ácido L-málico secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana* e inducido por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Por otra parte, Kumar *et al.* (2011), López-Fernández *et al.* (2016) y

and the exudates of plant roots, which vary with the phenology and genotype of the plant (de Souza *et al.*, 2015), and therefore bacteria that interact with plants and present associative or endophytic capacities, or symbiotic processes to adapt to the rhizospheric conditions are acknowledged as potential microbial inoculants. Rudrappa *et al.* (2008) reported that the production of *B. subtilis* FB17 biofilm is a rhizosphere colonization mechanism, due to its attraction to the L-malic acid secreted by the roots of *Arabidopsis thaliana* and induced by the foliar pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. On the other hand, Kumar *et al.* (2011), López-Fernández *et al.* (2016) and Selim *et al.* (2016) point out that diverse species of *Bacillus* may reside in internal tissues of grape (*Vitis vinifera*) and cotton plants (*Gossypium barbadense* L). These characteristics play a crucial role in the development, colonization and function of *Bacillus*, stimulating their relationship with the host plant, the biological control characteristics of which are strengthened.

### Main characteristics

Some of the main characteristics of the *Bacillus* genus are its optional aerobic or sometimes anaerobic growth, Gram-positive, bacillary morphology, flagellar motility, and variable size (0.5 to 10 µm), its optimal growth being in a neutral pH, with a wide interval of growth temperatures, although most species are mesophilic (temperature between 30 and 45 °C), its metabolic diversity related to the promotion of plant growth and control of pathogens (Tejera-Hernández *et al.*, 2011); other features that stand out are its capacity to produce endospores (oval or cylindrical) as a mechanism of resistance to diverse types of stress (Calvo and Zúñiga, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011) (Figure 1).

Selim *et al.* (2016) señalan que diversas especies de *Bacillus* pueden ser residentes de tejidos internos en plantas de uva (*Vitis vinífera*) y algodón (*Gossypium barbadense* L). Estas características tienen un papel determinante en el desarrollo, colonización y función de *Bacillus* estimulando su asociación con la planta hospedera, cuyas características de control biológico son potenciadas.

### Principales características

Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 µm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011); además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés (Calvo y Zúñiga, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011) (Figura 1).

La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas, éstas se forman durante su segunda fase del ciclo de vida, el cual se encuentra conformado por una fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación (Figura 2). Durante la primera etapa, la bacteria crece de forma exponencial mediante fisión binaria, ya que se encuentra en un medio con las condiciones favorables para su desarrollo. La segunda fase comienza como una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés (alta densidad de población, escasez de nutrientes, factores externos como salinidad, temperatura, pH, entre otros), así la célula

The presence of endospores confers the *Bacillus* genus its capacity to spread and its prevalence in ecosystems. These form during the second phase of its life cycle, which is composed of a phase of vegetative growth and a phase of sporulation (Figure 2). During the first stage, the bacteria grows exponentially by binary fission, since it is found in a medium with favorable conditions for its growth. The second phase begins as a strategy for survival in the presence of some type of stress (high population density, lack of nutrients, external factors such as salinity, temperature, pH, and others). In this way, the vegetative cell begins the formation of the endospore, which implies an asymmetric cell division, giving way to the formation of two compartments: a mother cell and the immersion of a prespore. Later, the prespore is swallowed, forming a cell within the mother cell. During the later stages, the prespore is covered by protective layers (protein components, peptidoglycan and a wall that resides below it formed by germ cells), followed by the dehydration and the final maturation of the prespore. Finally, the mother cell is lysed by programmed cell death, releasing the endospore. The endospore can remain viable in the environment until the conditions become favorable to begin their metabolic processes and generate a vegetative cell (Errington 2003; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; CALS; 2016). Due to this, the formation of endospores resistant to heat and desiccation is an important characteristic for the formulation of biotechnological products based on strains of this bacterial genus (Pérez-García *et al.*, 2011).

### The *Bacillus* genus as a Biological Control Agent

Large diversity of species of the *Bacillus* genus have proven to have antagonistic activity against diverse phytopathogenic microorganisms in agricultural crops, such as maize, rice, fruit

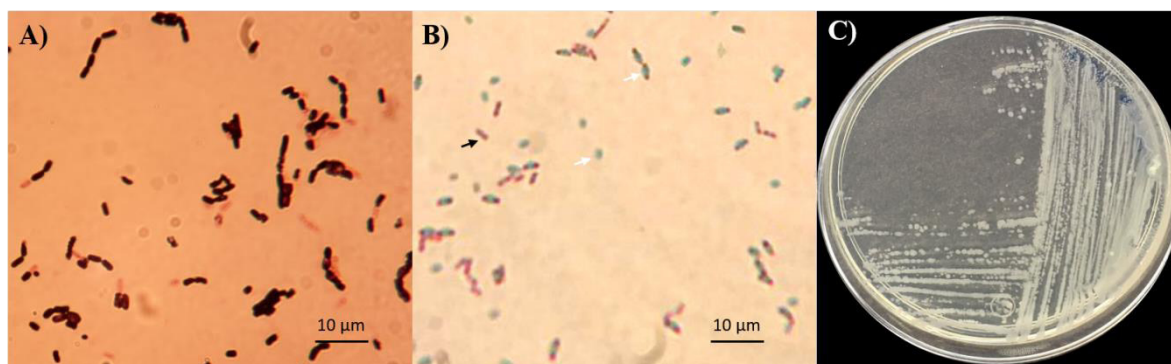


Figura 1. Características morfológicas de *Bacillus* sp. TE3 perteneciente a la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativo ([www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)). A) Células bacilares, Gram positivas; B) endosporas (flecha blanca) y células bacilares (flecha negra); y C) morfología macroscópica de la cepa TE3.

Figure 1. Morphological characteristics of *Bacillus* sp. TE3 belonging to the Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms ([www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)). A) Bacillary cells, Gram positive; B) endospores (white arrow) and bacillary cells (black arrow); and C) macroscopic morphology of strain TE3.

vegetativa inicia la formación de la endospora, lo cual implica la división celular asimétrica, dando lugar a la formación de dos compartimentos, célula

trees, and others (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). The study of this ability of *Bacillus* began with the discovery of insecticidal activity of Cry

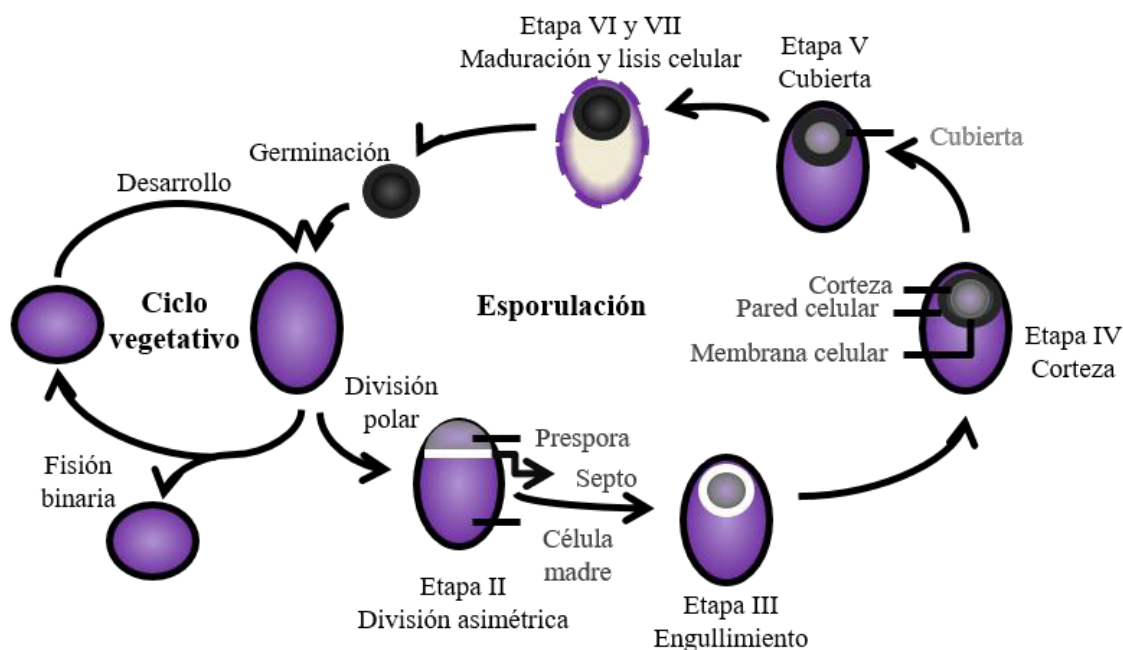


Figura 2. Ciclo de reproducción del género *Bacillus*. Modificado de Errigton, (2003).  
Figure 2. Reproduction cycle of the genus *Bacillus*. Modified from Errigton, (2003).



madre y la inmersión de una preespora. Posteriormente, la preespora es engullida, formando una célula dentro de la célula madre. Durante las etapas posteriores, la preespora es recubierta de capas protectoras (componentes proteicos, peptidoglicano y una pared que reside debajo de ésta, formada por células germinales), seguido de la deshidratación, y la maduración final de la preespora. Finalmente, la célula madre se lisa mediante muerte celular programada, liberando la endospora. La endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Errigton 2003; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; CALS; 2016). Por lo anterior, la formación de endosporas resistentes al calor y desecación es una característica de importancia para la formulación de productos biotecnológicos a base de cepas de este género bacteriano (Pérez-García *et al.*, 2011).

### **El género *Bacillus* como Agente de Control Biológico**

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen A) la excreción

proteínas producidas por *B. thuringiensis*; actualmente, several species of the *Bacillus* genus (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. licheniformis*) are widely studied to mitigate the incidence of diseases of importance to agriculture (Raaijmakers and Mazzola, 2012). Some of the main ways in which these strains avoid the establishment and development of phytopathogenic organisms is through different mechanisms, which include A) the excretion of antibiotics, B) siderophores, C) lytic enzymes, D) toxins and E) inducing the systemic resistance of the plant (ISR) (Figure 3) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### **Main mechanisms of biological control of the *Bacillus* genus**

#### **Production of lipopeptides**

One of the most important characteristics of the *Bacillus* genus is its capacity to produce a large variety of antibiotics capable of inhibiting the growth of phytopathogenic agents, including non-ribosomal cyclic peptides, which have been the most widely studied. Lipopeptides (LPs) structurally consist of a cyclic peptide joined to a chain of  $\beta$ -hydroxy or  $\beta$ -amino fatty acids (Figure 4-A), classified into 3 different families (iturines, fengicines and surfactines), according to their amino acid sequences and length of the fatty acid (Ongena and Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013). These molecules are synthesized by multienzymatic complexes, known as nonribosomal peptide synthetase (NRPS), which are independent to messenger RNA (Chowdhury *et al.*, 2015). The families of iturines, fengicines and surfactines have been widely studied for their antibacterial and antifungal activity (Meena and Kanwar, 2015). The antimicrobial activity of these LPs occurs because of their interaction with the cytoplasmic membrane

de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Figura 3) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*

#### Producción de lipopéptidos

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino (Figura 4-A), clasificándose en 3 diferentes familias (iturinas, fengicinas y surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Ongena y Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013). Estas moléculas

of bacterial or fungal cells, causing the formation of pores and an osmotic imbalance, which triggers the cell death of the phytopathogenic microorganisms (Figure 4-B) (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). However, recent reports claim that some lipopeptides can have multiple action mechanisms, altering cell processes such as intracellular calcium homeostasis, energetic metabolism and RNA processing (Zhang *et al.*, 2016).

The role of the LPs has become evident in the growth inhibition in phytopathogenic microorganisms. Touré *et al.* (2004) identified several isoforms of lipopeptides in extracts produced from liquid cultures of *B. subtilis* GA1. Later, in a test for co-inoculation of strains GA1 and *Botrytis cinerea* in apple fruits, they identified the presence of fengicines and iturines in inhibitory concentrations, showing the activity of these lipopeptides *in-situ*. Likewise, genetic expression and mutagenesis analyses have contributed significantly to the understanding the role of lipopeptides in the microbial activity of the *Bacillus* genus against phytopathogenic microorganisms

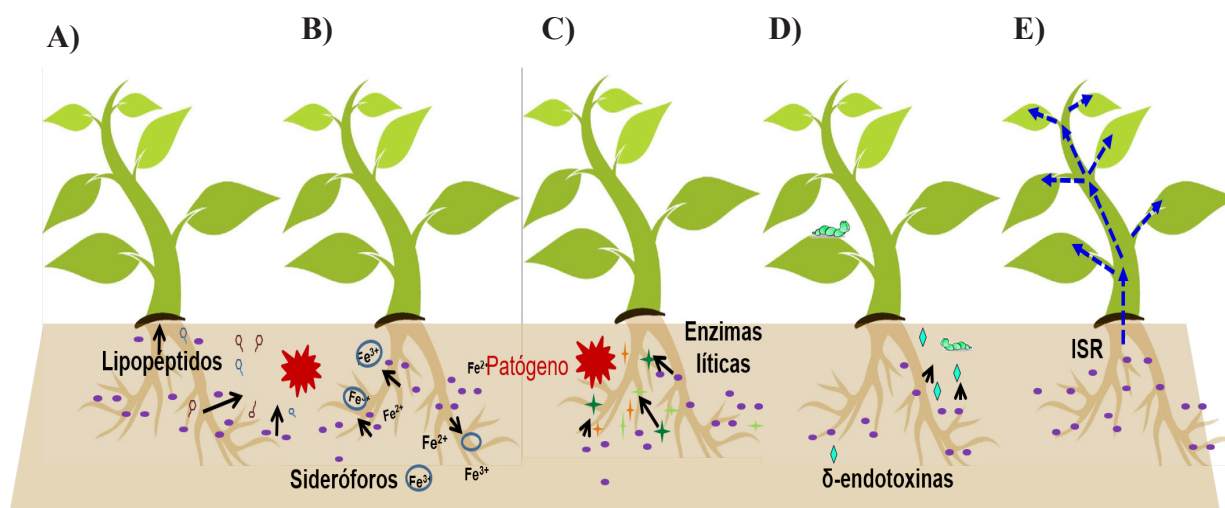
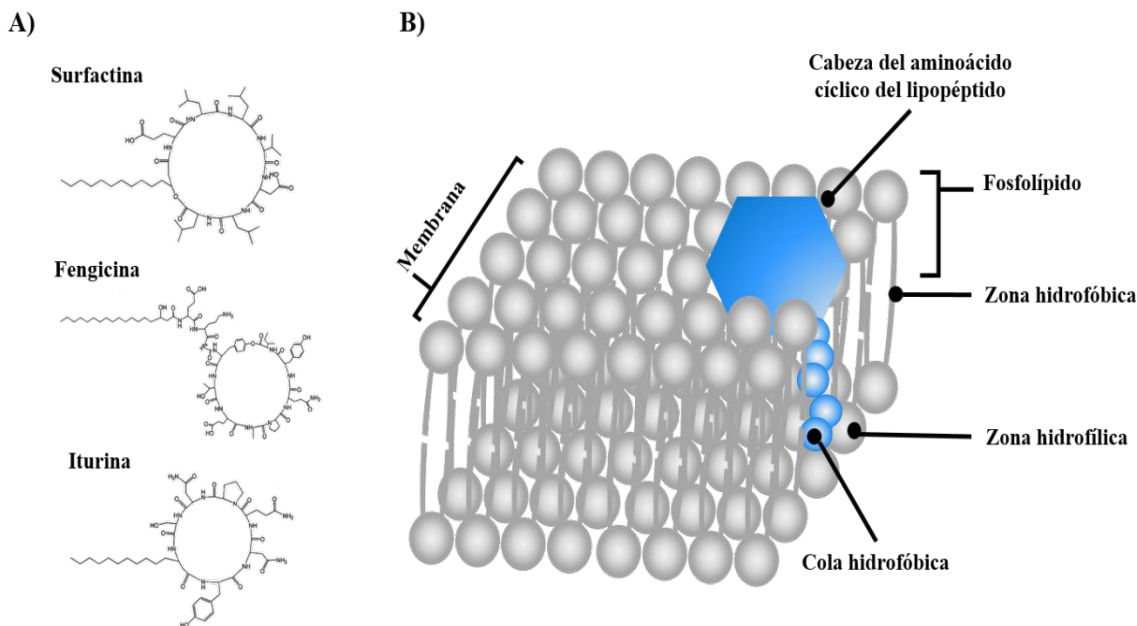


Figura 3. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D)  $\delta$ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica.

Figure 3. Main biological control mechanisms of the genus *Bacillus*. Production of A) lipopeptides, B) siderophores, C) lytic enzymes, D)  $\delta$ -endotoxins, E) induction to the systemic response.



**Figura 4. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos. Modificado de Ongena y Jaques (2008); Bayer (2016).**

**Figure 4. Lipopeptides as metabolites involved in the biological control of plant pathogens. A) Representatives of the family of lipopeptides, B) Action mechanism of lipopeptides. Modified from Ongena and Jaques (2008); Bayer (2016).**

son sintetizadas por complejos multi-enzimáticos, conocidos como sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés, nonribosomal peptide synthetase), las cuales son independientes del RNA mensajero (Chowdhury *et al.*, 2015). Las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas, han sido ampliamente estudiadas por su actividad antibacteriana y antifúngica (Meena y Kanwar, 2015). La actividad antimicrobiana de estos LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Figura 4-B) (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos lipopéptidos pueden tener múltiples mecanismos de acción, al-

(Xu *et al.*, 2013). For example, Li *et al.* (2014) mutated the gene of the phosphopantetheine transferase (*sfp*) in the strain SQR9 of *B. amyloliquefaciens*, crucial for the functioning of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), and therefore the synthesis of lipopeptides. This mutation resulted in a phenotype lacking antifungal activity against diverse agriculturally important phytopathogens, including *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Phytophthora parasitica*. The efficient control of diseases by the biological control agents requires these to be able to establish in, and interact with, their host plant (Pérez-García *et al.*, 2011). Likewise, along with antibiosis, lipopeptides have an influence on the establishment of *Bacillus* with the regulation of

terando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del RNA (Zhang *et al.*, 2016). El papel de los LPs se ha evidenciado en la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Touré *et al.* (2004) identificaron múltiples isoformas de lipopéptidos en extractos generados a partir de cultivos líquidos de *B. subtilis* GA1. Posteriormente, en un ensayo de co-inoculación de la cepa GA1 y *Botrytis cinerea* en frutos de manzano, identificaron la presencia de fengicinas e iturinas en concentraciones inhibitorias, demostrando la actividad de estos lipopéptidos *in-situ*. Además, análisis de expresión génica y mutagénesis dirigida han contribuido de manera significativa a comprender el papel de los lipopéptidos en la actividad antimicrobiana del género *Bacillus* contra microorganismos fitopatógenos (Xu *et al.*, 2013). Por ejemplo, Li *et al.* (2014) mutaron el gen de la fosfopanteteína transferasa (*sfp*) en la cepa SQR9 de *B. amyloliquefaciens*, indispensable en el funcionamiento de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), y por tanto de la síntesis de lipopéptidos. Dicha mutación resultó en un fenotipo carente de actividad antifúngica contra diversos fitopatógenos de importancia agrícola, incluyendo *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Phytophthora parasitica*.

El control eficiente de enfermedades por parte de los agentes de control biológico requiere que éstos sean capaces de establecerse e interactuar con su planta hospedera (Pérez-García *et al.*, 2011). Así, además de la antibiosis, los lipopéptidos influyen en el establecimiento de *Bacillus* mediante la regulación de procesos celulares como motilidad y formación de biopelículas (Choudhary y Jhori, 2009; Xu *et al.*, 2013). Esto último ha sido observado en la mutante de *B. subtilis* 6051 deficiente en la producción de surfactinas, observándose la formación de una biopelícula irregular durante la

cell processes such as motility and the formation of biofilms (Choudhary and Jhori, 2009; Xu *et al.*, 2013). The latter has been observed in the mutant of *B. subtilis* 6051, deficient in the production of surfactines, producing an irregular biofilm during colonization, as well as the reduction in its capacity to control infections caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis thaliana* (Bais *et al.*, 2004). Similarly, the role of lipopeptides in the motility of *Bacillus* has been proven with the study of deficient mutants in the production of lipopeptides, *i.e.* *Bacillus subtilis* 168 deficient of the gen *sfp* gene, displayed a loss in motility in semi-solid agar, although it was restored when purified lipopeptides were added to the culture medium (Kinsinger *et al.*, 2003). Due to the role of the lipopeptides in several cell processes (antibiosis, formation of biofilms and motility), its isolated study on the motility *in situ* of *Bacillus* is complex.

Despite lipopeptides not being the only metabolites of the antibiome of the *Bacillus* genus involved in the biological control of phytopathogens, they have been proposed as the most efficient metabolites for this biological activity, due to its ecological role and antimicrobial capability, which explains their use in the search and selection of promissory BCA of this genus (Cawoy *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015).

### Production of lytic enzymes

The production of enzymes involved in the degradation of the cell wall of phytopathogenic agents is one of the most widely reported biological control mechanisms, in particular against pathogens of fungal origins. The fungal cell is made up of glycoproteins, polysaccharides and other components that vary according to the fungal species (Bowman and Free, 2006). The fraction



colonización, así como la disminución de su capacidad para controlar infecciones causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en *Arabidopsis thaliana* (Bais *et al.*, 2004). De manera similar, el papel de los lipopéptidos en la motilidad de *Bacillus* ha sido demostrado mediante el estudio de mutantes deficientes en la producción de lipopéptidos, *i.e.* *Bacillus subtilis* 168 deficiente del gen *sfp*, mostró pérdida de la motilidad en agar semi-sólido, sin embargo, ésta fue restablecida cuando lipopéptidos purificados fueron agregados al medio de cultivo (Kinsinger *et al.*, 2003). Debido al papel de los lipopéptidos en múltiples procesos celulares (antibiosis, formación de biopelículas y motilidad), su estudio aislado sobre la motilidad *in situ* de *Bacillus* es complejo.

No obstante que los lipopéptidos no son los únicos metabolitos del antibioma del género *Bacillus* involucrados en el control biológico de fitopatógenos, éstos han sido propuestos como los metabolitos más eficientes para esta actividad biológica debido a su papel ecológico y capacidad antimicrobiana, por lo cual se han utilizado para la búsqueda y selección de ACB promisorios de este género (Cawoy *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015).

### Producción de enzimas líticas

La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico. La pared celular de hongos está conformada por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según la especie fúngica (Bowman y Free, 2006). La fracción de polisacáridos puede comprender hasta un 80% de la pared celular de hongos, encontrándose principalmente quitina (~ 10 – 20%) y glucano (~ 50 – 60%), los cuales están compuestos por residuos de beta-1,3-glucosa y beta-1,4-N-acetilglucosamina,

of polysaccharides can comprise up to 80% of the cell wall of fungi, particularly chitin (~ 10 – 20%) and glucane (~ 50 – 60%), which are composed of residues of beta-1,3-glucose and beta-1,4-N-acetylglucosamine, respectively (Bowman and Free, 2006; Latgé, 2007). These polymers play a crucial role in the firmness of the cell wall by a wide network of glycosidic bonds. Therefore, the interference in these bonds can deteriorate the cell wall of phytopathogenic fungi, causing their lysis and cell death.

The production of lytic enzymes such as chitinases (EC 3.2.1.14) and  $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.6 and EC 3.2.1.39) excreted by the BCA, including the *Bacillus* genus, have displayed an inhibitory effect against pathogens of fungal origins (Compant *et al.*, 2005). These enzymes are responsible for the degradation of the main polysaccharides that make up the cell wall of the fungi, by the hydrolysis of their glycosidic bonds (Figure 5). There are currently diverse scientific studies that report the role of these enzymes in the *in vitro* antifungal activities obtained from strains of the *Bacillus* genus (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Shafi *et al.*, 2017). For example, Yan *et al.* (2011) demonstrated the role a chitinase in the control of *Rhizoctonia solani* by *B. subtilis* SL-13, evaluating the inhibitory activity of the purified enzyme, confronted with this pathogen. Chien-Jui *et al.* (2004) cloned the gene *chiCW* of *B. cereus* 28-9 on *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and showed that the purified products presented a high inhibitory activity in the germination of *Botrytis elliptica* spores. Likewise, Martínez-Absalón *et al.* (2014) observed that when placing liquid *B. thuringiensis* UM96 supernatants in the specific inhibitor of chitinases, alosamidine, they lost their ability to inhibit the growth of *Botrytis cinerea*, thus showing the importance of chitinases on the biological control activity of the strain. Similarly, different authors have reported  $\beta$ -glucanases as important

respectivamente (Bowman y Free, 2006; Latgé, 2007). Estos polímeros tienen un papel estructural determinante en la rigidez de la pared celular, mediante una red extensa de enlaces glucosídicos. Así, la interferencia en estos enlaces puede deteriorar la pared celular de hongos fitopatógenos, provocando su lisis y muerte celular.

La producción de enzimas líticas como quitinasas (EC 3.2.1.14) y  $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.6 y EC 3.2.1.39) excretadas por los ACB, incluyendo al género *Bacillus*, han mostrado un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico (Compant *et al.*, 2005). Estas enzimas son responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos (Figura 5). Actualmente, existen diversos estudios científicos que reportan el papel de estas enzimas en la actividad antifúngica *in vitro* obtenidas de cepas del género *Bacillus* (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Shafi *et al.*, 2017). Por ejemplo, Yan *et al.* (2011) demostraron el papel de una quitinasa en el control de *Rhizoctonia solani* por *B. subtilis* SL-13, evaluando la actividad inhibitoria de la enzima purificada y confrontada contra dicho patógeno. Chien-Jui *et al.* (2004) clonaron el gen *chiCW* de *B.*

components in the activity for the biological control strains of the *Bacillus* genus; Aktuganov *et al.* (2007), reported that  $\beta$ -1,3-glucanases are the main lytic enzymes involved in the *in vitro* control of *Bipolaris sorokiniana* by *Bacillus* sp. 739, and in studies with *B. amyloliquefaciens* MET0908, with the aid of scanning electronic microscopy, the lytic activity of a  $\beta$ -1,3-glucanases on the *Colletotrichum lagenarium* hyphae was observed. Also, genetic engineering studies focused on the increase of antifungal activity of *Bacillus* strains have successfully achieved the insertion of codifying genes into lytic enzymes, such as gene *ChiA* of *B. subtilis* F29-3 in *B. circulans*, obtaining a more aggressive phenotype against *Botrytis elliptica* (Chen *et al.*, 2004). In addition, Zhang *et al.* (2012) significantly increased the antifungal activity of *Burkholderia vietnamiensis* P418 in the face of different fungal phytopathogens by the chromosomal insertion of the gene *Chi113*, from a *B. Subtilis* strain.

### Production of siderophores

Iron (Fe) is an essential nutrient for important cell functions, such as in redox reactions of proteins

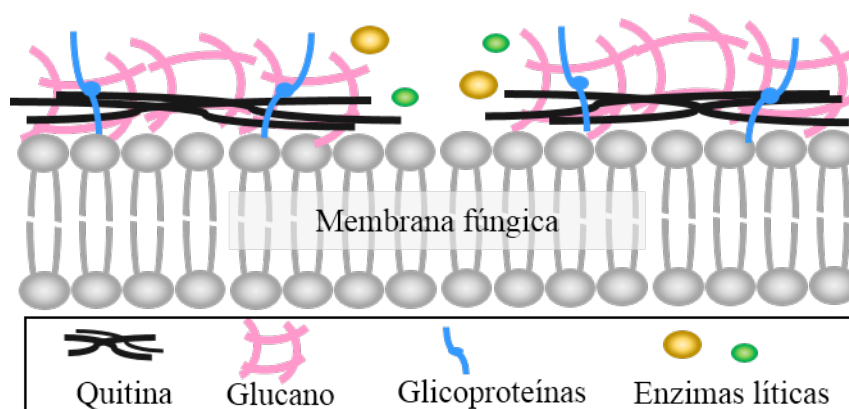


Figura 5. Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas. Modificado de Moebius *et al.* (2014).  
Figure 5. Degradation of the cell walls of plant pathogenic fungi by lytic enzymes. Modified from Moebius *et al.* (2014).

*cereus* 28-9 en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y demostraron que los productos purificados presentaron una alta actividad inhibitoria en la germinación de esporas de *Botrytis elliptica*. Así también, Martínez-Absalón *et al.* (2014) observaron que al someter sobrenadantes líquidos de *B. thuringiensis* UM96 al inhibidor específico de quitinasas, alosamidina, éstos perdieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, evidenciando la importancia de las quitinasas en la actividad de control biológico de dicha cepa. De manera similar, diferentes autores han reportado a las  $\beta$ -glucanasas como componentes importantes en la actividad control biológico de cepas del género *Bacillus*; Aktuganov *et al.* (2007), reportaron que las  $\beta$ -1,3-glucanasas son las principales enzimas líticas involucradas en el control *in vitro* de *Bipolaris sorokiniana* por *Bacillus* sp. 739, y en estudios con *B. amyloliquefaciens* MET0908 se evidenció a través de microscopía electrónica de barrido la actividad lítica de una  $\beta$ -1,3-glucanasas sobre las hifas de *Colletotrichum lagenarium*. Además, estudios de ingeniería genética enfocados a incrementar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* han logrado exitosamente la inserción de genes codificantes a enzimas líticas, tal como el gen *ChiA* de *B. subtilis* F29-3 en *B. circulans*, obteniendo un fenotipo más agresivo contra *Botrytis elliptica* (Chen *et al.*, 2004). Además, Zhang *et al.* (2012) incrementaron significativamente la actividad antifúngica de *Burkholderia vietnamiensis* P418 frente a diferentes fitopatógenos fúngicos mediante la inserción cromosómica de gen *Chi113*, proveniente de una cepa de *B. subtilis*.

### Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para importantes funciones celulares, tales como en las reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), en la cadena de transporte de electrones, y

with cofactors (Fe-S), in the electron transportation chain, and catalyzing vital enzyme reactions, such as those involving hydrogen, oxygen and nitrogen (Faraldo-Gómez and Sansom, 2003). Fe is found in nature mostly in a ferric form (Fe<sup>3+</sup>) with a low solubility, making its use impossible for some live beings (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). In response to the iron restriction in the environment, some microorganisms have developed diverse receptor protein structures with low molecular weights and high affinity to iron, called siderophores, facilitating the capturing of Fe<sup>3+</sup> (Thyagarajan *et al.*, 2017). Siderophores are secondary metabolites that act as iron sequestrants or chelators, as a consequence of their high dissociation constant due to this metal, fluctuating between 10<sup>22</sup> and 10<sup>55</sup>. This allows for the formation of Fe<sup>3+</sup>-siderophore complexes, so siderophore-producing microorganisms, using a specific receptor located in the membrane, can use it using two mechanisms: 1) directly with the Fe<sup>3+</sup>-siderophore complex through the cell membrane, or 2) reducing extracellularly to Fe<sup>2+</sup> complexes (Neilands, 1995) (Figure 6-A). Siderophores, based on their main chelating group, are classified into: hydroxamates (using hydroxamic acids), catecholates (containing catechol rings), carboxylates, phenolates, and in a combination of two or more of these groups (Wilson *et al.*, 2016) (Figure 6-B). A wide diversity of strains with the capacity of biological control belonging to the *Bacillus* genus have shown the ability to synthesize siderophores, regulating the concentration of iron in the medium through its chelation (Fe<sup>3+</sup>-siderophore), causing this metal to become unavailable for pathogenic microorganisms, which depend highly on this element for growth (Scharf *et al.*, 2014). On the other hand, the formation of such complexes does not affect the development of the plants, since most of them can grow in lower iron concentrations than required by these

catalizando reacciones enzimáticas vitales, como aquellas en las que se encuentra involucrado el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). El Fe es encontrado en la naturaleza mayormente en forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de baja solubilidad, imposibilitando su uso por algunos seres vivos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). En respuesta a la restricción de hierro en el ambiente algunos microorganismos han desarrollado diversas estructuras proteicas receptoras, de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro, llamadas sideróforos, facilitando la captación de  $\text{Fe}^{3+}$  (Thyagarajan *et al.*, 2017). Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como secuestrantes o quelantes de hierro, consecuencia de su elevada constante de disociación por este metal, oscilando entre  $10^{22}$  y  $10^{55}$ . Lo cual permite la formación de complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo, así los microorganismos productores de sideróforos, mediante un receptor específico localizado en la membrana, pueden utilizarlo por dos mecanismos: 1) directamente mediante el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo a través de la membrana celular, o 2) reducido extracelularmente a complejos  $\text{Fe}^{2+}$  (Neilands, 1995) (Figura 6-A). Los sideróforos en función de su principal grupo quelante se clasifican en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolatos (conteniendo anillos catecol), carboxilatos, fenolatos, y en combinación de dos o más de estos grupos (Wilson *et al.*, 2016) (Figura 6-B). Una amplia diversidad de cepas con capacidad de control biológico pertenecientes al género *Bacillus* han mostrado la capacidad de sintetizar sideróforos, regulando la concentración de hierro en el medio a través de su quelación ( $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo), ocasionando que este metal no se encuentre disponible para microorganismos patógenos, cuyo crecimiento es altamente dependiente de este elemento (Scharf *et al.*, 2014). Por otra parte, la formación de dichos complejos no afecta el desarrollo de las plantas, la mayoría de ellas pueden

biological control agents; likewise, some plants have the ability to use these microbial complexes, increasing their bioavailability to this element (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

In this way, several species of the *Bacillus* genus have been reported for their ability to control plant diseases by the secretion of siderophores, limiting the growth and colonization of iron-dependent phytopathogenic microorganisms (Fgaier and Eberl, 2011). Yu *et al.* (2011) showed, in co-culture tests in chrome azurol sulfonate (CAS) agar slides that *B. subtilis* CAS15 strongly antagonized the growth of 15 pathogenic fungi belonging to the genera of *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pythium*, *Magnaporthe* and *Phytophthora*, with inhibition rates in the interval of 19 to 94%, attributing this effect to the catecholate siderophores (Bacillibactin), identified by ESI-MS and DHB. Similarly, May *et al.* (2001) reported the potential of strains of the *Bacillus* genus on the production of siderophores by the analysis of genes involved in the synthesis of Bacillibactin (BB), particularly in *B. subtilis*, observing that the mutant strain JJM405 in gene *dhb*, presented a limited production of BB, while ATCC21332 (wild strain) presented a higher production of this siderophore.

### Production of $\delta$ -endotoxins

$\delta$ -endotoxins, produced particularly by *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), are protein parasporal bodies made up of polypeptide units of different molecular weights, from 27 to 140 kDa. There are currently 300 reported holotypes of *Bt* toxins, classified into 73 Cry and 3 Cyt families (Porcar and Juárez, 2004; Xu *et al.*, 2014). *Bt* toxins are produced during the sporulation phase; the Cry (crystal) protein is known for its toxic effects in an objective organism (most belong to the order of insects); likewise, Cyt (cytolytic) protein has been related to toxic



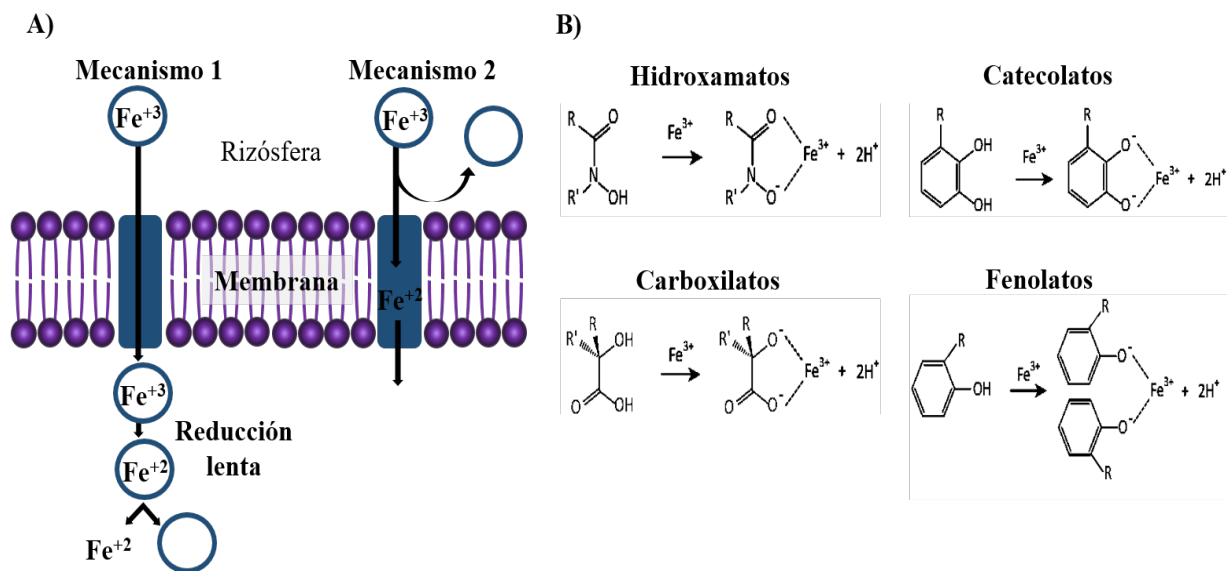


Figura 6. Los sideróforos como mecanismo de inhibición a fitopatógenos. A) Captura y solubilización de hierro, B) principales estructuras quelantes de los sideróforos. Modificado de Neilands (1995); Wilson *et al.* (2016).

Figure 6. Siderophores as a mechanism for the inhibition of plant pathogens. A) Capture and solubilization of iron, B) main chelating structures of siderophores. Modified from Neilands (1995); Wilson *et al.* (2016).

crecer en concentraciones de hierro inferiores que aquellas requeridas por estos agentes de control biológico, así mismo algunas plantas presentan la capacidad de aprovechar estos complejos microbianos, incrementando su biodisponibilidad a este elemento (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

Así, diversas especies de género *Bacillus* han sido reportadas por su capacidad para controlar enfermedades de plantas mediante la secreción de sideróforos, limitando el crecimiento y colonización de microorganismos fitopatógenos dependientes de hierro (Fgaier y Eberl, 2011). Yu *et al.* (2011) demostraron en ensayos de co-cultivo en placas de agar cromo azurol sulfonato (CAS) que *B. subtilis* CAS15 antagonizó fuertemente el crecimiento de 15 patógenos fúngicos, pertenecientes a los géneros de *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pythium*, *Magnaporthe* y *Phytophthora*, con tasas de inhibición que se ubicaron en el intervalo de 19 a 94%, atribuyendo

effects on a large variety of insects, particularly diptera; however, its cytotoxicity has been tested on mammal cells (Soberón and Bravo, 2007).

Cry proteins are widely used for their efficiency in the biological control of insects, the action mechanism of which begins once the Cry proteins are processed proteolytically through proteases present in the host's middle intestine, separating a section of amino acids in the N-terminal region and in the C-terminal end (depending on the nature of the Cry protein), thus releasing active and toxic fragments that interact with the receptor proteins present in the intestine cells (Figure 7). These fragments are acknowledged by specific receptors in the membrane and inserted through the cadherin (1), giving rise to a series of signals for the formation of a pre-porous oligomeric structure (2-3), and consequently lytic porous (4), which triggers an osmotic imbalance, which destroys the

este efecto a sideróforos de tipo catecolato (Bacillibactina), identificado por ESI-MS y DHB. De forma similar, May *et al.* (2001) reportaron el potencial de cepas del género *Bacillus* sobre la producción de sideróforos mediante el análisis de genes involucrados en la síntesis de Bacillibactina (BB), particularmente en *B. subtilis*, observando que la cepa mutante JJM405 en el gen *dhb*, presentó una limitada producción de BB, mientras ATCC21332 (cepa silvestre) presentó una mayor producción de este sideróforo.

### Producción de $\delta$ -endotoxinas

Las  $\delta$ -endotoxinas, producidas particularmente por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), son cuerpos paraesporales proteicos conformados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, desde 27 a 140 kDa. Actualmente se han reportado 300 holotipos de toxinas *Bt*, clasificándose en 73 familias Cry, y 3 Cyt (Porcar y Juárez, 2004; Xu *et al.*, 2014). Las toxinas *Bt* son producidas durante la fase de esporulación, la proteína Cry (cristal) es conocida por sus efectos tóxicos específicos en un organismo objetivo (la mayoría pertenece al orden de los insectos), así mismo las proteínas Cyt (citotóxica) han sido relacionadas con efectos tóxicos sobre una gran variedad de insectos, principalmente dípteros; sin embargo, también se ha comprobado su citotoxicidad contra células de mamíferos (Soberón y Bravo, 2007).

Las proteínas Cry se encuentran ampliamente utilizadas por su eficacia en el control biológico de insectos, cuyo mecanismo de acción inicia una vez que las proteínas Cry son procesadas proteolíticamente a través de proteasas presentes en el intestino medio del huésped, separando una sección de aminoácidos en la región N-terminal y en el extremo C-terminal (dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry), liberando así fragmentos activos y tóxicos que interactúan con las proteínas receptoras

intestinal epithelium and the consequent cell death (5) (Portela-Dussán *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Several authors have reported the potential of Cry proteins in the toxicity of agriculturally important pests. For example, Niedmann and Meza-Basso (2006) point out that the tomato leafminer (*Tuta absoluta*) causes losses of between 60 and 100% of the crops that are not treated with insecticides, thus showing the potential of *Bt*, highlighting that in tests run on tomato leaves with added Cry protein concentrates extracted from strains LM-11, LM-12, LM-14 and LM-33 of *Bt*, mortality was reduced to between 20 and 60% of the *T. Absoluta* larvae, which would suggest the reduction in losses of up to 12 and 60%. On the other hand, Vázquez-Ramírez *et al.* (2015) highlight the prevailing role *Bt* strains can take against the pest of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), on biotests carried out with Cry protein extracts obtained from strains LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 and LBIT-428 of *Bt*, showed that they all had a toxic effect on the fall armyworm, although strains LBIT-13 and LBIT-418 showed a high toxicity towards *S. frugiperda*, with  $CL_{50}$  of 137.2 and 197.2 ng cm<sup>-2</sup>, respectively, in comparison with the commercial standard HD-1 ( $CL_{50}$  of 142 ng cm<sup>-2</sup>).

### Induced systemic response

Throughout evolutionary history, plants have developed mechanisms to defend themselves against the invasion of pathogenic organisms (bacteria, fungi, nematodes, insects, etc.). These mechanisms are latent and are activated by stimuli during the interaction with pathogenic agents. In general terms, these mechanisms are known as systemic acquired resistance (SAR) and become activated, not only in the site of the infection, but systemically in other tissues (Pieterse *et al.*, 2014).

SAR is activated by stimuli perceived mainly by two receptors, the PRRs (pattern recognition

presentes en células intestinales (Figura 7). Estos fragmentos son reconocidos por receptores específicos en la membrana e insertados a través de la caderina (1), dando sucesión a una serie de señales para la formación de una estructura oligomérica pre-poro (2-3) y consecuentemente el poro lítico (4), por el cual se efectúa un desequilibrio osmótico, que finalmente destruye el epitelio intestinal y en consiguiente la muerte celular (5) (Portela-Dussán *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014).

Diversos autores han reportado el potencial de las proteínas Cry en la toxicidad de plagas de importancia agrícola. Por ejemplo, Niedmann y Meza-Basso (2006) señalan que la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) ocasiona pérdidas de un 60 al 100% de los cultivos que no son tratados con insecticidas, con ello, demuestran el potencial de *Bt* destacando que en ensayos en hojas de tomate adicionadas con concentrados de proteínas Cry extraídas de las cepas LM-11, LM-12, LM-14 y LM-33 de *Bt*, se logró la mortalidad entre un 20 y 60% de las larvas de *T. absoluta*, lo cual sugeriría la disminución de las pérdidas en un 12 y 60%. Por otra parte, Vázquez-Ramírez *et al.* (2015) destacan el papel preponderante

receptores) and NB-LRRs (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) (Pieterse *et al.*, 2014). The former perceives cell components such as fungal chitin or flagellins (PAMPs o MAMPs, pathogen o microbe associated molecular patterns) triggering the first line of defense, known as PTI (PAMP-triggered immunity). In pathogens with mechanisms for the evasion of PTI, a second line of defense is activated, which perceives virulence effector proteins via receptors NB-LRRs (Boller *et al.*, 2009). SAR depends on the signaling of salicylic acid (SA), which activates *PR* (pathogenesis-related) genes by codifying many of them to *PR* proteins with antimicrobial ability (*e.i. PRI*) (Vlot *et al.*, 2009).

Similarly to SAR, the systemic response in plants may be induced (ISR, induced systemic resistance) by chemical signals (elicitors) produced by beneficial microorganisms (Pérez-Montañón *et al.*, 2014) (Figure 3-E). Despite SAR and ISR being considered synonymous due to the similarity between the mechanisms (Pieterse *et al.*, 2014), signaling in ISR depends on the jasmonic acid and ethylene (Pieterse, 1998The protection of

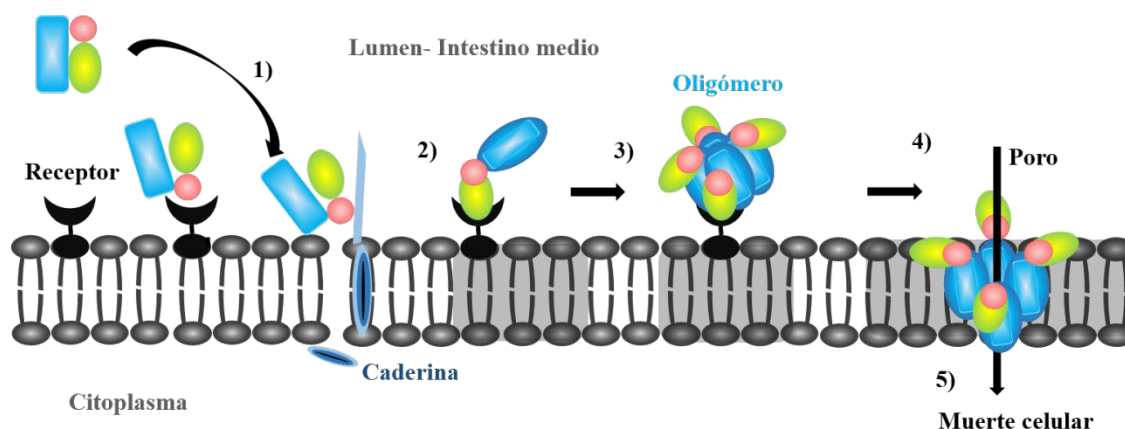


Figura 7. El mecanismo de acción de las proteínas Cry en insectos. Modificado de Xu *et al.* (2014).  
Figure 7. Action mechanism of Cry proteins in insects. Modified from Xu *et al.* (2014).

que pueden ocupar cepas de *Bt* contra la plaga del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), en bioensayos realizados con extractos de proteínas Cry obtenidos de las cepas LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 y LBIT-428 de *Bt*, demostraron que todas ellas tenían un efecto tóxico en el gusano cogollero, sin embargo, las cepas LBIT-13 y LBIT-418 mostraron alta toxicidad hacia *S. frugiperda*, con  $CL_{50}$  de 137.2 y 197.2 ng cm<sup>-2</sup>, respectivamente, esto en comparación con el estándar comercial HD-1 ( $CL_{50}$  de 142 ng cm<sup>-2</sup>).

### Respuesta sistémica inducida

Durante la historia evolutiva, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse de la invasión de organismos patógenos (bacterias, hongos, nematodos, insectos, etc.). Dichos mecanismos se encuentran latentes y son activados por estímulos durante la interacción con agentes patógenos. En términos generales, estos mecanismos se conocen como resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés, systemic acquired resistance) y se caracteriza por activarse no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos (Pieterse *et al.*, 2014).

SAR es activado a través de estímulos percibidos principalmente por dos receptores, los PRRs (pattern recognition receptors) y NB-LRRs (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) (Pieterse *et al.*, 2014). El primero de éstos percibe componentes celulares como quitina fúngica o flagelinas (PAMPs o MAMPs, pathogen o microbe associated molecular patterns) desencadenando la primera línea de defensa, conocida como PTI (PAMP-triggered immunity). En patógenos con mecanismos para evadir a PTI, una segunda línea de defensa es activada, la cual percibe proteínas efectoras de virulencia mediante receptores NB-LRRs (Boller *et al.*, 2009). SAR es dependiente de la señalización

agriculturally important crops (tomato, peppers, bean, rice, etc.) by inducing the systemic response using strains of the *Bacillus* genus has been documented (Akram *et al.*, 2016; Choudhary and Johri, 2009; Wang *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). *Bacillus* produces a large diversity of eliciting molecules that induce a systemic response in plants, including lipopeptides (Chowdhury *et al.*, 2015), phytohormones (Ryu *et al.*, 2003) and volatile compounds (Kim *et al.*, 2015). The latter activate *PR* genes, which protect from the invasion of pathogenic genes. This has been observed in tobacco plants, where *PR2* codifies for one  $\beta$ -1,3 glucanase and *PR3* codifies for one chitinase, they were activated in response to volatile compounds of *Bacillus* sp. JS, conferring resistance to *Rhizocronia solani* and *Phytophthora nicotianae* (Kim *et al.*, 2015). Along with *PR* genes, *Bacillus* activates other plant protection mechanisms, which include structural changes in the cell wall with the accumulation of lignin (Singh *et al.*, 2016) or the production or secondary metabolites such as flavonoids, phytoalexins, auxins or glucosinolates in general (Pretali *et al.*, 2016). Despite the plant protection mechanisms induced by elicitors being activated by different metabolically routes, a microorganism can activate multiple protection mechanisms. This has been observed in wheat plants, where after the inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* B-16, the production of multiple *PR* proteins and secondary metabolites such as gallic acid and ferulic acid was induced, conferring resistance against *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016).

### The *Bacillus* genus and pesticides

The use of chemical pesticides as the main method for the control of pests and diseases in agriculture has helped increase agricultural



de ácido salicílico (SA), el cual, activa genes *PR* (pathogenesis-related) codificando muchos de ellos a proteínas *PR* con capacidad antimicrobiana (*e.i. PRI*) (Vlot *et al.*, 2009). De manera similar al SAR, la respuesta sistémica en plantas puede ser inducida (ISR, induced systemic resistance) por señales químicas (elicitors) producidas por microorganismos benéficos (Pérez-Montaña *et al.*, 2014) (Figura 3-E). No obstante que SAR e ISR son considerados sinónimos debido a la similitud entre los mecanismos (Pieterse *et al.*, 2014), la señalización en ISR es dependiente del ácido jasmónico y etileno (Pieterse, 1998).

La protección de cultivos de importancia agrícola (tomate, pimiento, frijol, arroz, etc.) mediante la inducción de respuesta sistémica utilizando cepas del género *Bacillus* ha sido bien documentada (Akram *et al.*, 2016; Choudhary and Johri, 2009; Wang *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). *Bacillus* produce una gran diversidad de moléculas elicitoras que inducen respuesta sistémica en plantas, incluyendo a lipopéptidos (Chowdhury *et al.*, 2015), fitohormonas (Ryu *et al.*, 2003) y compuestos volátiles (Kim *et al.*, 2015). Estos últimos activan genes *PR*, los cuales protegen de la invasión de agentes patógenos. Este hecho ha sido observado en plantas de tabaco, donde *PR2* codifica por una  $\beta$ -1,3 glucanasa y *PR3* codifica por una quitinasa, fueron activados en respuesta a compuestos volátiles de *Bacillus* sp. JS, confiriendo resistencia ante *Rhizocronia solani* y *Phytophthora nicotianae* (Kim *et al.*, 2015). Además de genes *PR*, *Bacillus* activa otros mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) o la producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas o glucosinolatos en general (Pretali *et al.*, 2016). No obstante que los mecanismos de protección de plantas inducidos por elicitors son activados por diferentes

productivity significantly in the past decades. However, their excessive use has created resistance to these compounds by phytopathogenic microorganisms, while having harmful effects on human health and the environment. This shows the need to generate efficient and environmentally friendly alternatives to reduce the use of synthetic products in order to achieve an efficient and sustainable control of diseases in agricultural crops (Pérez-García *et al.*, 2011).

Biological control is an important part of the management of pests and diseases, and it consists of the use of living organisms to reduce and maintain the abundance of a pest or pathogen below the levels of economic damage. The potential of this alternative is based on an efficient control of a pest or disease in the middle and long terms, compatible with a low environmental risk and a sustainable production. In this way, the management of pests and diseases can be carried out by several methods: the use of synthetic pesticides, crops modified genetically to resist pests, biological control or the combination of one or more of these strategies. Biopesticides are a particular group of tools for the protection of crops used in the MIPE. Although there is not a formal definition for this term, a biopesticide refers to an agent produced at a massive scale, from a living microorganism or a natural product, and sold for the control of pests or diseases in plants (this definition covers most of the products classified as biopesticides, within the countries of the Organization for the Economic Co-operation and Development, OCDE, 2009). Biopesticides can be classified into three groups, depending on the active substance: i) biochemical products, that mainly comprise secondary metabolites of plants and microorganisms; ii) semi-chemical products, mostly made up of pheromones; and iii) microorganisms, which include bacteria, viruses, fungi, and protozoa (Chandler *et al.*, 2011).

rutas metabólicas, un microorganismo es capaz de activar múltiples mecanismos de protección. Esto último ha sido observado en plantas de trigo, donde tras la inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* B-16, se indujo producción de múltiples proteínas PR y metabolitos secundarios como ácido gálico y ácido ferúlico, confiriendo resistencia contra *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016).

### El género *Bacillus* y los bioplaguicidas

El uso de plaguicidas químicos como principal método de control de plagas y enfermedades en la agricultura, ha permitido incrementar significativamente la productividad agrícola en las últimas décadas; sin embargo, su uso excesivo ha originado resistencia a estos compuestos por microorganismos fitopatógenos, y a su vez se han asociado efectos nocivos a la salud humana, y al medio ambiente. Lo anterior, hace evidente la necesidad de generar alternativas eficientes y amigables con el ambiente para reducir el uso de productos sintéticos, logrando de esta manera un manejo eficaz y sustentable del control de enfermedades en los cultivos agrícolas (Pérez-García *et al.*, 2011).

El control biológico es una parte importante para el manejo de plagas y enfermedades, que consiste en la utilización de organismos vivos para reducir y mantener la abundancia de una plaga o un patógeno por debajo de los niveles de daño económico. El potencial de esta alternativa se fundamenta en un control eficiente de una plaga o enfermedad a mediano y largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental, y una producción sustentable. Así, el manejo de plagas y enfermedades se puede llevar a cabo por varios métodos alternativos: el uso de plaguicidas sintéticos, cultivos genéticamente modificados resistentes a plagas, el control biológico, o bien la combinación de una o más de estas estrategias. Los bioplaguicidas son un grupo particular

Of the commercially available microbial pesticides, *Bacillus* is the most widely exploited in agricultural biotechnology, with 85% of the bacterial products, due to its large metabolic versatility that allow it to perform a biological control of pests and diseases through diverse mechanisms. Also, this bacterial genus is able to produce endospores, which are the main active ingredient of the formulae, and confer to them – as a property – a greater viability in time (Ongena and Jaques, 2008).

One of the biological control mechanisms that has been most exploited in the biopesticides market is the ability of the *Bacillus* genus of producing  $\delta$ -endotoxins. This mechanism was the milestone in the development of the first microbial biopesticide for the biological control of lepidoptera, produces from *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. As mentioned earlier, *B. thuringiensis* (*Bt*) produces Cry proteins (*Bt*-  $\delta$  endotoxins) during spore formation, which is capable of producing lysis in cells of the digestive tract when consumed by susceptible insects. Strain HD-1 is one of the most studied strains, since it characteristically carries varieties of cry antilepidoptera genes: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* and *cry1Ia* (Höfte and Whiteley, 1989; Sauka and Benintende, 2008).

Currently, *B. Thuringiensis*-based products account for 75% of the biopesticides sold globally (Olson, 2015), with a substantial impact on the Mexican biopesticide market since 1980. In Mexico, the use of *Bt*-based formulae is an efficient formula for the control of insects and it accounts for between 4 and 10% of the total of insecticides used for maize, cotton and vegetable crops (Tamez *et al.*, 2001). Likewise, other species of the *Bacillus* genus, such as: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *B. amyloliquefaciens*, stand out for their successful implementation in commercial formulations, and those developed mainly for the control of fungal

de herramientas de protección de cultivos utilizados en el MIPE, aunque no existe una definición formalmente para este término, un bioplaguicida hace referencia a un agente producido en masa a partir de un microorganismo vivo o un producto natural, y comercializado para el control de plagas o enfermedades de plantas (esta definición abarca la mayoría de los productos clasificados como bioplaguicidas, dentro de los países de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos) (OCDE, 2009). Los bioplaguicidas pueden ser clasificados en tres tipos, de acuerdo con la sustancia activa: i) productos bioquímicos, que comprenden principalmente metabolitos secundarios de plantas y microorganismos; ii) productos semi-químicos, constituidos principalmente por feromonas; y iii) microorganismos, incluyen bacterias, virus, hongos y protozoarios, (Chandler *et al.*, 2011).

Dentro de los bioplaguicidas microbianos disponibles comercialmente, *Bacillus* es el género más explotado en la biotecnología agrícola, con un 85% de los productos bacterianos, debido a su gran versatilidad metabólica que le permiten llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos. Además, este género bacteriano es capaz de producir endosporas, siendo éstas el principal ingrediente activo de los formulados, y confiriéndoles -como propiedad- una mayor viabilidad en el tiempo (Ongena y Jaques, 2008).

Uno de los mecanismos de control biológico que ha sido mayormente explotado en el mercado de los bioplaguicidas, es la capacidad del género *Bacillus* de producir  $\delta$ -endotoxinas. Este mecanismo fue el parteaguas en el desarrollo del primer bioplaguicida microbiano para el control biológico de lepidópteros, el cual fue elaborado a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Como se mencionó anteriormente, *B. thuringiensis* (*Bt*) produce proteínas Cry (*Bt*- $\delta$  endotoxinas) durante la formación de esporas, la cual es capaz de producir lisis

diseases (Table 1). For example, Galindo *et al.*, (2015) developed the first Mexican wide-spectrum biofungicide “Fungifree AB”, produced with viable *B. subtilis* 83 spores. This bacteria is a natural antagonist to diverse phytopathogens, used to prevent at least 8 pathogens of different etiologies: *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Sphaerothecamacularis*, in over 20 agriculture crops; They even indicate that the success of its formula resides, not only in the support provided by scientists, but also in the publication of its results in a journal read by professionals in agribusiness, thus allowing the linked that bonded crop exporting companies in search for sustainable alternatives that could allow them to control phytopathogens (*i. e. Colletotrichum gloeosporioides*).

In recent years, the chemical pesticide production market has declined 2% every year, while the production of biopesticides presents an annual increase of 20% (Cheng *et al.*, 2010). There are several reasons for the increasing interest towards microbial biopesticides, including the limited development of resistance of pathogenic organisms to them, a reduction in the rate of discovery of new insecticides, a greater public perception of the dangers related to synthetic pesticides, the highest number of studies on the specificity of microbial pesticides, improvements in production, the technology of formulation and dissemination, as well as the interaction with producers and regulation bodies. In this way, biopesticides account for a small fraction of the global market focused on crop protection: 5% (approximate value of \$3 billion USD). However, biopesticides are expected to have a Compound Annual Growth Rate (CAGR) of at least 8.64% by 2023, estimating a value of over \$4.5 billion USD (Olson *et al.*, 2013; Olson, 2015). It is worth mentioning that the transition and integration of the use of biopesticides in current agricultural practices

en células del tracto digestivo cuando es consumida por insectos susceptibles. La cepa HD-1 es una de las cepas mejor estudiadas, ya que se caracteriza por la portación de variedad de genes cry antilepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia* (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka y Benintende, 2008).

Actualmente, los productos a base de *B. thuringiensis* representan el 75% de los bioplaguicidas comercializados mundialmente (Olson, 2015), impactando sustancialmente el mercado de bioplaguicidas nacional, desde 1980. En México, la aplicación de formulados a base de *Bt* representa una alternativa eficaz para el control de insectos, presentando un porcentaje de uso de 4 a 10% del total de insecticidas utilizados para los cultivos de maíz, algodón y hortalizas (Tamez *et al.*, 2001). Además, otras especies del género de *Bacillus*, tales como: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, destacan por su implementación exitosa en formulaciones comerciales y desarrolladas principalmente para el control de enfermedades fúngicas (Cuadro 1). Por ejemplo, Galindo *et al.*, (2015) desarrollaron el primer biofungicida mexicano de amplio espectro “Fungifree AB”, formulado con esporas viables de *B. subtilis* 83. Esta bacteria es un antagonista natural de diversos fitopatógenos, utilizado para la prevención de por lo menos 8 patógenos de distinta etiología: *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Sphaerothecamacularis*, en más de 20 cultivos agrícolas; incluso señalan que el éxito de su formulado reside, además del sustento científico, en la publicación de sus resultados en una revista de divulgación consultada por los profesionales en agronegocios, permitiendo con esto el vínculo que enlazó a las compañías exportadoras de cultivos en búsqueda de alternativas sustentables que les permitiera el control de fitopatógenos (*i. e.* *Colletotrichum gloeosporioides*).

En los últimos años, el mercado de la producción de plaguicidas químicos ha declinado un 2%

should comply with the following requirements: a) effectiveness against the pest or disease; b) compatibility with other control methods; c) low or no environmental impact; d) long-lasting effect on the medium; e) economy, from a cost/benefit viewpoint; f) technical feasibility of its use; and g) acceptance by producers and society in general. Therefore, the use of biopesticides offers an opportunity to stimulate the development and modernization of current agricultural practices, with the aim of contributing to food security under the scope of biosecurity.

### **Discussion and perspectives of biosecurity and biodiversity in the use of the *Bacillus* genus in agro-systems**

The species of the *Bacillus* genus have a great metabolic and functional diversity, promoting its wide use in agriculture. In this sense, the groups of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* are the most widely used. However, in terms of biosecurity, they should be studied broadly before being used as biological control agents in the field. The group of *Bacillus subtilis*, which includes important species for agriculture, such as *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. pumilus*, are not traditionally considered as pathogens for humans, and *B. subtilis* has even been granted the status of QPS (*Qualified Presumption of Safety*) by the European Food Security Authority (EFSA, 2015). However, there are some isolated cases of intoxications form digestive manifestations, such as the one reported by Pavic *et al.* (2005), pointing out *B. subtilis* and *B. licheniformis* as causal agents of the intoxication outbreak in a kindergarten caused by the consumption of powdered milk, which contained these bacterial species. On the other hand, in the group of *Bacillus cereus* made up of species such as *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* and



**Cuadro 1. *Bacillus* como ingrediente activo en formulaciones comerciales.**  
**Table 1. *Bacillus* as an active ingredient in commercial formulations.**

| Agente de Control Biológico                                           | Producto (Año)      | Patógeno                                                                                                                                             | Cultivos                                            | Empresa            |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|
| <i>B. pumilus</i> QST2808 <sup>a</sup>                                | Ballad Plus (2007)  | <i>Erysiphe</i> sp., <i>Puccinia</i> spp., <i>Pyricularia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Tilletia</i> sp., <i>Xanthomonas</i> spp, entre otros. | Gramíneas, oleaginosas, entre otros.                | AgraQuest          |
| <i>B. subtilis</i> QST713 <sup>r,s</sup>                              | Serenade ASO (2017) | <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Phytophthora</i> sp., entre otros.                                            | Frutales, hortalizas, entre otros.                  | Bayer CropScience  |
| <i>B. subtilis</i> 83 <sup>t</sup>                                    | Fungifree AB (2012) | <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Leveillula</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros                                                                   | Frutales, hortalizas                                | Agro & biotecnía   |
| <i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i> FZB24 <sup>u,v</sup> | Taegro 2 (2014)     | <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros.                                                   | Diversas frutas, plantas ornamentales, entre otros. | ISAGRO             |
| <i>B. licheniformis</i> SB3086 <sup>w,x</sup>                         | EcoGuard-GN (2013)  | <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Sclerotinia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., entre otros.                                                              | Plantas ornamentales, entre otros.                  | Novozymes          |
| <i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> <sup>y,z</sup>            | DiPel WG (2007)     | <i>Cydia</i> sp., <i>Otiorychus</i> sp., <i>Spodoptera</i> sp, entre otros.                                                                          | Frutales, hortalizas, entre otros.                  | Valent BioSciences |

(<sup>a</sup>AgraQuest, 2007; <sup>r</sup>Bayer CropScience, 2016; <sup>s</sup>EPA, 2004; <sup>t</sup>Galindo *et al.*, 2015; <sup>u</sup>ISAGRO, 2017; <sup>v</sup>EPA, 2014; <sup>w</sup>Novozymes, 2017; <sup>x</sup>EPA, 2013; <sup>y</sup>Valent BioSciences, 2017; <sup>z</sup>EPA, 2007) / (<sup>a</sup>AgraQuest, 2007; <sup>r</sup>Bayer CropScience, 2016; <sup>s</sup>EPA, 2004; <sup>t</sup>Galindo *et al.*, 2015; <sup>u</sup>ISAGRO, 2017; <sup>v</sup>EPA, 2014; <sup>w</sup>Novozymes, 2017; <sup>x</sup>EPA, 2013; <sup>y</sup>Valent BioSciences, 2017; <sup>z</sup>EPA, 2007).

anual, mientras que la producción de bioplaguicidas presenta un incremento anual del 20% (Cheng *et al.*, 2010). Existen varias razones para el interés creciente por los bioplaguicidas microbianos, las cuales incluyen el limitado desarrollo de resistencia por parte de los organismos patógenos a éstos, una disminución en la tasa de descubrimiento de nuevos insecticidas, una mayor percepción pública de los peligros asociados a los plaguicidas sintéticos, el mayor número de estudios sobre la especificidad de los bioplaguicidas microbianos, mejoras en la producción, la tecnología de formulación y divulgación, así como la interacción con productores e instancias de regulación. De esta manera, los bioplaguicidas representan una pequeña fracción del mercado global enfocados a la protección de cultivos, el 5% (valor aproximado de \$3 000.00

*B. weihenstephanensis*, some strains have been identified as pathogens for humans (Ceuppens *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Among these, *B. cereus* has been identified in a large diversity of foods (dairy products, fresh vegetables and others), causing important worldwide epidemiological crises, and in some cases, even death by emetic and diarrheal infections (Oh *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Glasset *et al.*, 2016). Also, *B. thuringiensis* strains have recently been related to intoxications caused by the ingestion of contaminated foods (Oh *et al.*, 2012).

The virulence of these species has been mainly related to the presence of two toxins, hemolysin BL (HBL) and the nonhemolytic enteric toxin (NHE), which form a protein complex (Kim *et al.*, 2016). Other toxins have also been identified in pathogenic

millones de USD). Sin embargo, se espera que para el 2023 los bioplaguicidas posean una tasa anual compuesta (CAGR) de, al menos, el 8.64%, estimando un valor de más de \$4 500 millones de USD (Olson *et al.*, 2013; Olson, 2015). Cabe mencionar que la transición e integración del uso de bioplaguicidas en las prácticas agrícolas actuales deberá cumplir con los siguientes requisitos: a) efectividad contra la plaga o enfermedad; b) compatibilidad con otros métodos de control; c) impacto ambiental bajo o nulo; d) efecto duradero en el medio; e) economía, desde el punto de vista costo/beneficio; f) factibilidad técnica de su empleo; y g) aceptación por los productores y sociedad en general. Por lo tanto, el uso de bioplaguicidas ofrece una oportunidad para estimular el desarrollo y modernización de las prácticas agrícolas actuales con el objetivo de contribuir a la seguridad alimentaria bajo enfoques de bioseguridad.

### **Discusión y perspectivas de bioseguridad y biodiversidad en el uso del género *Bacillus* en los agro-sistemas**

Las especies del género *Bacillus* poseen gran diversidad metabólica y funcional, propiciando su amplio uso en la agricultura. En este sentido, los grupos de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* son los mayormente utilizados; sin embargo, en términos de bioseguridad éstos deben ser estudiados ampliamente antes de su utilización como agentes de control biológico en el campo. El grupo de *Bacillus subtilis* que incluye especies de gran importancia en la agricultura como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, tradicionalmente no son considerados como patógenos para humanos, incluso a *B. subtilis* se le ha otorgado el estado de QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2015). Sin embargo, existen algunos casos aislados de intoxicaciones por manifestaciones digestivas, es así el reportado

strains, including cytotoxin K (*cytK*), enterotoxin FM (*entFM*), enterotoxin S (*entS*) and enterotoxin T (*bceT*). In strains that produce the emetic toxin (toxin of high resistance to thermal treatments, extreme pH values and the activity of proteases), virulence has been related to the presence of the dodeca depsipeptide synthesized by non-ribosomal peptide synthases (NRPS) codified by genes *ces*, found in type pXO1 plasmids. Likewise, products of other genes, such as hemolysin A (*hlyA*), hemolysin II and III (*hlyI*, *hlyII*), cereolysin A and B (*cerA*, *cerB*), and the pleiotropic transcription factor (*pclR*) are involved in the pathogenicity of these strains (Ceuppens *et al.*, 2013).

Historically, the classification and differentiation of species in the *Bacillus cereus* group has been carried out using gene 16S RNAr and other characteristics such as i) virulence (*B. cereus*), ii) content of plasmids (*B. anthracis* and *B. thuringiensis*), iii) growth conditions (*B. cytotoxicus* and *B. weihenstephanensis*) and iv) morphological characteristics (*B. mycoides* and *B. pseudomycoides*). However, in widely related species such as *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*, the differentiation using virulence factors and contents of plasmids is limited, due to its loss and transference during the evolutionary history of these species (Hoffmaster *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Recent comparative studies with complete genomes using dDDH (digital DNA: DNA hybridization) showed the distribution of *cry* genes and type pXO plasmids in members of this group, showing the low correlation between the phylogenetic position and the presence or absence of these plasmids (Liu *et al.*, 2015). The above study also showed the low resolution of the multilocus sequence typing (MLST) for the differentiation at the level of species.

In this way, due to the high metabolic versatility with agricultural application shown by members of the *B. Cereus* group, particularly *B. cereus* and

por Pavic *et al.* (2005), señalando a *B. subtilis* y *B. licheniformis* como agentes causantes del brote de intoxicación en un jardín de niños, ocasionado por la ingesta de leche en polvo, la cual contenía dichas especies bacterianas. Por otra parte, en el grupo de *Bacillus cereus* conformado por especies como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* y *B. weihenstephanensis*, algunas cepas se han identificado como patógenos para humanos (Ceuppens *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Entre éstos, *B. cereus* se ha identificado en una gran diversidad de alimentos (productos lácticos, vegetales frescos, entre otros), provocando crisis epidemiológicas importantes a nivel mundial, y en algunos casos hasta la muerte, debido a infecciones eméticas y diarreicas (Oh *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Glasset *et al.*, 2016). Además, recientemente, cepas de *B. thuringiensis* han sido asociados a intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Oh *et al.*, 2012).

La virulencia de estas especies se ha asociado principalmente a la presencia de dos toxinas, la hemolisina BL (HBL) y la toxina entérica no hemolítica (NHE), los cuales forman un complejo proteico (Kim *et al.*, 2016). Además, otras toxinas se han identificado en cepas patógenas, incluyendo la citotoxina K (*cytK*), enterotoxina FM (*entFM*), enterotoxina S (*entS*) y enterotoxina T (*bceT*). En cepas que producen la toxina emética (toxina de alta resistencia a los tratamientos térmicos, valores de pH extremos y la actividad de proteasas), la virulencia se ha relacionado con la presencia del dodeca depsipéptido sintetizado por sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS) codificadas por genes *ces*, encontrándose en plásmidos tipo pXO1. Asimismo, productos de otros genes, como la hemolisina A (*hlyA*), hemolisina II y III (*hlyI*, *hlyII*), cereolisina A y B (*cerA*, *cerB*), y el factor transcripción pleotrópico (*pclR*) están involucrados en la patogenicidad de estas cepas (Ceuppens *et al.*, 2013).

*B. thuringiensis*, the correct identification and the determination of its virulence for the human being is decisive for the selection and commercialization of biological control agents of these species. Although the study of comparative genomics using complete genomes is the only accurate alternative for the classification and determining its virulence, it is important to consider that they are costly tools for the discrimination of pathogenic strains during the primary process of selection of potential biological control agents.

On the other hand, in agro-systems, soil is a dynamic matrix that houses a large amount (~ $1 \times 10^9$  cells/gram of soil) and diversity ( $1 \times 10^4$  species/gram of soil) of microorganisms (Curtis *et al.*, 2002). This edaphic microbiota plays a very important ecological part, offering several ecosystemic services, such as i) social and ecological sustainability, ii) adaptation to, and mitigation of, climate change, iii) biotechnological resource for humanity, iv) cycling of water and nutrients, and v) food security, mainly by the cycling of nutrients (van der Heijden *et al.*, 2008), and the boosting of plant growth through the production of phytohormones, solubilization of nutrients (Hayat *et al.*, 2010) and avoiding the establishment of phytopathogenic agents (Compant *et al.*, 2005). In this way, the use of biopesticides has acquired great relevance in the agricultural sector, offering a sustainable alternative, focused on increasing crop production. This generally implies the application of large populations of the microorganism of interest with the aim of promoting its establishment and colonization. However, this practice may cause disturbances in the microbial communities of the agro-systems (Trabelsi *et al.*, 2013), particularly when inoculating biological control agents, since their biological activity is not specific or selective for the phytopathogenic agent in question, which may cause unpredictable changes in the microbial

Históricamente, la clasificación y diferenciación de especies en el grupo de *Bacillus cereus* se ha llevado a cabo utilizando el gen 16S RNAr y otras características como i) virulencia (*B. cereus*), ii) contenido de plásmidos (*B. anthracis* y *B. thuringiensis*), iii) condiciones de crecimiento (*B. cytotoxicus* y *B. weihenstephanensis*) y iv) características morfológicas (*B. mycoides* y *B. pseudomycoides*). Sin embargo, en especies estrechamente relacionadas como *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*, la diferenciación utilizando factores de virulencia y contenido de plásmidos es limitada, debido a su pérdida y transferencia durante la historia evolutiva de estas especies (Hoffmaster *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Recientemente, estudios comparativos con genomas completos mediante dDDH (digital DNA: DNA hybridization), evidenciaron la amplia distribución de genes *cry* y plásmidos tipo pXO en miembros de este grupo, demostrando la baja correlación que existe entre posición filogenética y la presencia o ausencia de estos plásmidos (Liu *et al.*, 2015). Además, el anterior estudio demostró la baja resolución del análisis multilocus (MLST) para la diferenciación a nivel de especies.

Así, debido a la gran versatilidad metabólica con aplicación agrícola que exhiben miembros del grupo de *B. cereus*, en especial *B. cereus* y *B. thuringiensis*, la correcta identificación y la determinación de su virulencia para el ser humano es determinante para la selección y comercialización de agentes de control biológico de estas especies. Siendo el estudio de genómica comparativa utilizando genomas completos, la única alternativa precisa de clasificar y determinar su virulencia, sin embargo, es importante considerar que son herramientas costosas para la discriminación de cepas patogénicas durante el proceso de selección primario de potenciales agentes de control biológico.

Por otra parte, en los agro-sistemas, el suelo es una matriz dinámica que alberga una gran canti-

structure of said agro-systems. It is therefore important to evaluate the impact of the inoculation of biological control agents on the structure and composition of the microbial communities in agro-systems, to guarantee the ecological balance, as well as the desired biological effect.

Different studies have shown the impact of the inoculation of strains with the ability for biological control on microbial communities in different crops. For example, Li *et al.* (2015) evaluated the effect of the *B. subtilis* strain B068150 on the microbial communities in the rhizosphere of cucumber plants using the DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) technique. The study was carried out using three different soil types, with no significant changes in the microbial diversity related to the cucumber rhizosphere, after the inoculation of strain B068150. On the other hand, You *et al.* (2016) reported that with the inoculation of *B. subtilis* Tpb55, not only was the *Phytophthora parasitica* infection reduced, but significant changes were also observed in the microbial community related to the rhizosphere of a tobacco plantation, with an ANDRA (Amplified ribosomal 16S rDNA restriction analysis), highlighting that the relative abundance of some communities was favored, essentially in those belonging to the dominant filia: Acidobacteria and Proteobacteria, in an increase of 2 and 10% respectively in regard to the control, yet reducing by at least 50% the relative abundance of the communities belonging to Planctomycetes, Nitrospirae, Bacteroidetes and Chloroflexi, which may be involved in an important activity for plant development. In this way, each BCA is a particular organism that performs its action in a specific manner, in which the studies of each microbial strain chosen must be explored in depth in order to acquire further knowledge on the way to strengthen its biological control with an effective formulation, considering aspects of ecological risk and biosafety for the agro-system.



dad ( $\sim 1 \times 10^9$  células/gramo de suelo) y diversidad ( $1 \times 10^4$  especies/gramo de suelo) de microorganismos (Curtis *et al.*, 2002). Esta microbiota edáfica tienen un papel ecológico muy importante ofreciendo diversos servicios eco-sistémicos, por ejemplo: i) la sostenibilidad social y ecológica, ii) adaptación y mitigación del cambio climático, iii) recurso biotecnológico para la humanidad, iv) ciclaje de agua y nutrientes, y v) seguridad alimentaria, principalmente por el ciclaje de nutrientes (van der Heijden *et al.*, 2008), y la promoción del crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes (Hayat *et al.*, 2010) y evitando el establecimiento de agentes fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). De esta manera, el uso de bioplaguicidas ha adquirido gran relevancia en el sector agrícola, ofreciendo una alternativa sostenible enfocada a incrementar la producción de los cultivos. Lo cual, generalmente implica la aplicación de altas poblaciones del microorganismo de interés con el objetivo de potenciar su establecimiento y colonización. Sin embargo, esta práctica puede causar perturbaciones en las comunidades microbianas de los agro-sistemas (Trabelsi *et al.*, 2013), aún más cuando se inoculan agentes de control biológico, ya que generalmente su actividad biológica no es específica o selectiva para el agente fitopatógeno en cuestión, lo cual puede generar cambios impredecibles en la estructura microbiana de dichos agro-sistemas. De esta manera, es importante evaluar el impacto de la inoculación de agentes de control biológico sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas en los agro-sistemas, con el objetivo de garantizar el equilibrio ecológico, además del efecto biológico buscado.

Diferentes estudios han demostrado el impacto de la inoculación de cepas con capacidad de control biológico, sobre comunidades microbianas en diferentes cultivos. Por ejemplo, Li *et al.* (2015)

## CONCLUSIONS

The negative impacts of chemical pesticides on the environment has been widely documented, include health damages, resistance to compounds by phytopathogens, soil and water pollution, and produce the need to develop sustainable alternatives to protect agricultural soils against pathogens, for example, biological control agents.

The *Bacillus* genus presents a large metabolic diversity involved in the biological control of phytopathogens; given this, the academic and industrial sectors have concentrated on generating commercial formulae for their use in the field, and in the description of the main action mechanisms involved in this effect (competition for space and nutrients, antibiosis, production of lytic enzymes, secretion of toxins, inducing host resistance). However, it is unusual for a single action mechanism to be used by said antagonist for the suppression of phytopathogens *in situ*. In this way, the knowledge of the mechanisms with which the antagonist exerts its action is decisive for both the guarantee of its effect and for the development of commercial formulations, the success of which lies in the creation of microenvironments that boost their biological activity without stimulating the growth of the pathogen. Currently, several commercial formulations consider strains of the *Bacillus* genus as an active ingredient, due to its ability to colonize, reproduce easily and its high persistence related to the formation of endospores, with the latter being a characteristic of interest, since it allows it to live under conditions of abiotic stress, making its production and long-term storage easier. On the other hand, after the inoculation of biopesticides, it is possible to observe a dual effect on crops due to the action of biological control agents, mitigating phytopathogens and indirectly promoting plant growth with the improvement

evaluaron el afecto de la cepa B068150 de *B. subtilis* sobre las comunidades microbianas en la rizósfera de plantas de pepino utilizando la técnica de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*). El estudio se llevó a cabo utilizando tres diferentes tipos de suelo, no encontrando cambios significativos en la diversidad microbiana asociada a la rizósfera de pepino, posterior a la inoculación de la cepa B068150. Por otra parte, You *et al.* (2016) reportaron que con la inoculación de *B. subtilis* Tpb55, además de reducir la infección de *Phytophthora parasítica*, también se observaron cambios significativos en la comunidad microbiana asociada a la rizósfera del cultivo de tabaco, mediante el análisis ANDRA (*Amplified ribosomal 16S rDNA restriction analysis*), destacando que la abundancia relativa de algunas comunidades fue favorecida, esencialmente en las pertenecientes a los filos dominantes: Acidobacterias y Proteobacterias, en un 2 y 10% de aumento respectivamente respecto al control, sin embargo, reduciendo en al menos un 50% la abundancia relativa de las comunidades correspondientes a Planctomycetes, Nitrospirae, Bacteroidetes y Chloroflexi, las cuales pudiesen estar involucradas en alguna actividad importante para el desarrollo de la planta. De esta manera, cada ACB es un organismo particular que efectúa su acción de forma específica, donde los estudios de cada cepa microbiana seleccionada se deben profundizar, con el objetivo de incrementar el conocimiento sobre la forma de potenciar su control biológico mediante una formulación efectiva, considerando aspectos de riesgo ecológico y la bioseguridad para el agro-sistema.

## CONCLUSIONES

El impacto negativo de los plaguicidas químicos en el ambiente se ha documentado amplia-

of the plant's health. However, it is necessary to carry out basic studies in depth, which integrate other MIPE strategies (cultural practices, chemical control), as well as in the correct identification of pathogenic strains for humans, such as *Bacillus cereus* NS *Bacillus anthracis*, which are even potentially effective strains for the control of phytopathogens. The potential risk of these species may be detected with taxonomy studies,  $\beta$ -hemolytic activity, detection with defined virulence molecular markers, guaranteeing the use of biologically safe strains for agriculture. In addition, studies on the ecological impact of the introduction of a BCA to agro-systems must be developed, since under certain circumstances, they can cause changes in the microbial communities with agro-ecologically unpredictable results. Finally, the success of the use of biopesticides will depend largely on the innovation, research, marketing strategies and dissemination of results amongst producers and the bodies in charge of making decisions related to regulation and the use of this type of technologies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank and acknowledge the support given by Dr. Angélica Herrera for her suggestions for the improvement of this manuscript. The authors also wish to thank the National Science and Technology Council for the funding of the project 253663 "Fortalecimiento de la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano del ITSON para la creación de COLMENA: Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria regional y nacional (Fortifying the Infrastructure of the ITSON Microbial Resource Biotechnology Laboratory for the creation of COLMENA: Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms, to contribute to the regional and national food security)" and project 257246 "Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con

mente, tales como: daños a la salud, resistencia a compuestos por los fitopatógenos, contaminación de suelos y mantos acuíferos, surgiendo así la necesidad de desarrollar alternativas sostenibles para proteger a los cultivos agrícolas contra organismos patógenos, por ejemplo, la utilización de agentes de control biológico.

El género *Bacillus* presenta gran diversidad metabólica involucrada para el control biológico de fitopatógenos, así el sector académico e industrial ha enfocado esfuerzos para la generación de formulaciones comerciales para su aplicación en campo, y en la descripción de los principales mecanismos de acción involucrados en dicho efecto (competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, producción de enzimas líticas, secreción de toxinas, induciendo la resistencia del hospedero); sin embargo, es inusual el hecho que un único mecanismo de acción sea utilizado por dicho antagonista para la supresión de fitopatógenos *in situ*. De esta manera, el conocimiento de los mecanismos por los cuales el antagonista ejerce su acción es determinante tanto para garantizar su efecto como para el desarrollo de formulaciones comerciales, cuyo éxito radica en la creación de microambientes que potencialice su actividad biológica sin estimular el desarrollo del patógeno. Actualmente, diversas formulaciones comerciales cuentan como ingrediente activo cepas del género *Bacillus*, debido a su capacidad de colonización, fácil reproducción y alta persistencia asociada a la formación de endosporas, siendo esta última una característica de especial interés ya que les permite sobrevivir bajo condiciones de estrés abiótico, facilitando su producción y almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Por otra parte, posterior a la inoculación del bioplaguicidas, es posible observar un efecto dual en los cultivos agrícolas por la acción de control biológico, mitigando a fitopatógenos e indirectamente promoviendo el crecimiento vegetal con la mejora de la salud

potencial agro-biotecnológico (Interaction Wheat x Plant Growth Promoting Microorganisms: Identifying Genes with Agro-biotechnological Potential)”.

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

de la planta. Sin embargo, es necesario profundizar en estudios básicos que integren otras estrategias de MIPE (prácticas culturales, control químico), así como en la correcta identificación de cepas patógenas para el ser humano, por ejemplo, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, que incluso son cepas potencialmente eficientes en el control de fitopatógenos. La detección del riesgo potencial de estas especies se puede llevar a cabo mediante estudios de taxonomía, actividad β -hemolítica, detección con marcadores moleculares de virulencia definidos, garantizando el uso de cepas bioseguras en la agricultura. Por otra parte, estudios sobre el impacto ecológico de la introducción de un ACB a los agro-sistemas deben ser desarrollados, ya que bajo ciertas condiciones pudiesen ocasionar cambios en las comunidades microbianas con resultados agroecológicamente impredecibles. Finalmente, el éxito del uso de bioplaguicidas dependerá en gran medida de la innovación, investigación, eficiencia, estrategias de marketing y divulgación de resultados entre los productores y las instancias encargadas de la toma de decisiones referentes a la regulación y uso de este tipo de tecnologías.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen y reconocen el apoyo recibido por la Dra. Angélica Herrera por sus sugerencias para la mejora del manuscrito. Además, los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto 253663 “Fortalecimiento de la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano del ITSON para la

creación de COLMENA: Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria regional y nacional”; y el proyecto 257246 “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agro-biotecnológico”.

LITERATURA CITADA

- AgraQuest. 2007. BALLAD PLUS, Biofungicide. Disponible en línea: [http://fs1.agrian.com/pdfs/Ballad_Plus_\(30_May_2007\)_Label.pdf](http://fs1.agrian.com/pdfs/Ballad_Plus_(30_May_2007)_Label.pdf)
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35:9-21. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000100004
- Akram W, Anjum T and Ali B. 2016. Phenylacetic Acid Is ISR Determinant Produced by *Bacillus fortis* IAGS162, Which Involves Extensive Re-modulation in Metabolomics of Tomato to Protect against *Fusarium* Wilt. *Frontiers in Plant Science*. 7:1-12. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.0049Aktuganov_GE_Galimzyanova_NF_Melent'ev_AI_and_Kuz'mina_L.2007.Extracellular_hydrolyses_of_strain_Bacillus_sp._739_and_their_involvement_in_the_lysis_of_micromycete_cell_walls.Microbiology.76:413-120
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L and Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*. 11:332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Aranda FJ, Teruel JA and Ortiz A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1713:51-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Arellano-Aguilar O y Rendón OJ. 2016. La huella de los plaguicidas en México. E. Martínez. Greenpeace México A. C. Las Flores 35 Col. Pueblo de Los Reyes, C.P. 04330, Coyoacán, México. 39 p. Disponible en línea: http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf
- Badii MH, Tejada LO, Flores AE, Lopez CE y Quiróz H. 2000. Historia, fundamentos e importancia. Pp: 3-17. In: Badii MH, Flores AE y Galán LJ (eds.). *Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico*. UANL, Monterrey.
- Bais HP, Fall R and Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*. 134:307-319. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bayer AG. 2016. Serenade, Fungicida Biológico, Mejorando la Protección de Cultivos. Bayer Crop Science. Folleto Serenade. Santiago, Chile. 5p.
- Bayer CropScience. 2016. Serenade ASO. Disponible en línea : http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/SERENADE_ASO_20170517.pdf
- Boller T and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*. 60:379-406. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bowman SM and Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>
- CALS, College of Agriculture and Life Sciences. 2016. Bacterial Endospores. Department of Microbiology. Cornell University. Ithaca, Nueva York 14850, EE. UU. Disponible en línea: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>
- Calvo P y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 9:31-39. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Cawoy H, Debois D, Franzil L, De Pauw E, Thonart P and Ongena M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*. 8:281-295. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Ceuppens S, Boon N and Uyttendaele M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*. 84:433-450. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
- Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, Davison G, Graves J and Grant WP. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 366:1987-1998. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Chen CY, Wang YH and Huang CJ. 2004. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* chiA gene. *Canadian Journal of Microbiology*. 50:451-454. <http://dx.doi.org/10.1139/w04-027>
- Chen YY, Chen PC, Tsay TT. 2016. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsica*. *Biological Control*. 98:34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Cheng XL, Liu CJ and Yao JW. 2010. The Current Status, Development Trend and Strategy of the Bio-pesticide Industry in China. *Hubei Agricultural Sciences*. 49:2287-2290. Disponible en línea: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBHY201009086.htm
- Chien-Jui H, Tang-Kai W, Shu-Chung C and Chao-Ying C. 2004. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38:82-88. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.1.082>
- Choudhary DK and Johri BN. 2009. Interactions of *Bacillus spp.* and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164:493-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X and Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>

- Cohn F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. Beitrage zur Biologie Pflanz. 1:127-1224.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Curtis TP, Sloan WT and Scannel JW. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *PNAS USA*. 99:10494-10499. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.142680199>
- de Olivar CG, Castillo CCE, Cañizales BLM y Olivar R. 2008. Control Biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia Trujillo Venezuela*. 7:50-74. Disponible en línea: <http://revistas.saber.ula.ve/index.php/academia/article/view/6030/5831>
- de Souza R, Ambrosini A and Passaglia LMP. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 38:401-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Environmental protection agency, EPA. 2004. Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511C). Disponible en línea: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/070127-00012-20140207.pdf
- Environmental protection agency, EPA. 2004. United States environmental protection agency. Disponible en línea: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/069592-00012-20040902.pdf
- Environmental protection agency, EPA. 2007. Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7611C). Disponible en línea: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000004-00252-20070112.pdf
- Environmental protection agency, EPA. 2013. Office of chemical safety and pollution prevention. Disponible en línea: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/070127-00003-20130906.pdf
- Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 1:117-126. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro750>
- European Food Safety Authority, EFSA. 2015. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015. *EFSA Journal*. 13:4138. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4138>
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L and Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39:869-878. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. FAO. Viale delle Terme di Caracalla 00153 Roma, Italia. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i4040s.pdf>
- Faraldo-Gómez JD and Sansom MS. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:105-116. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1015>
- Fgaier H and Eberl HJ. 2011. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of Theoretical Biology*. 273:103-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.12.034>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Balderas-Ruiz KA, Muñoz-Celaya AL, Mezo-Villalobos M y Arroyo-Colín J. 2015. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18:52-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.005>
- Glasset B, Herbin S, Guillier L, Vignaud M, Grout J, Pairaud S and Ramarao N. 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance*. 21:1-11. <https://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.48.30413>
- Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y and Cheng JQ. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 *in vitro* and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38:233-240. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- Hayat R, Ali S, and Amara U. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60:579-598. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De B K, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT and Jackson PJ. 2006. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*. ca44:3352-3360. <https://dx.doi.org/10.1128/jcm.00561-06>
- Höfte H and Whiteley H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53:242-255. Disponible en línea: <http://mmb.asm.org/content/53/2/242.long>
- ISAGRO. 2017. Isagro, TAEGRO 2, biofungicide – Product Training. Disponible en línea: <http://www.isagro-usa.com/assets/taegro-2-training-presentation-usa-final-2017-05-02.pdf>
- Jaaffar AKM, Parejko JA, Paulitz TC, Weller DM and Thomashow LS. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* Isolates to Phenazine-1-Carboxylic Acid and Biological Control by Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 107:692-703. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-16-0257-R>
- Kim JS, Lee J, Lee CH, Woo SY, Kamg H, Seo SG and Kim SH. 2015. Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *Plant Pathology Journal*. 31:195-201. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2014.0122>
- Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI and Kim KS. 2016. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:872-879. <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1502.02003>

- Kim Y, Kim H, Kim K, Chon J, Kim D and Seo K. 2016. High Occurrence Rate and Contamination Level of *Bacillus cereus* in Organic Vegetables on Sale in Retail Markets. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13:656-660. <https://dx.doi.org/10.1089/fpd.2016.2163>
- Kinsinger RF, Shirk MC and Fall R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*. 185:5627-5631. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/185/18/5627.long>
- Kishore GK, Pande S and Podile AR. 2005. Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology*. 95:1157-1165. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157>
- Kumar A, Prakash A and Johri BN. 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. 37-59. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66:279-290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales LC y Sánchez LC. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>
- Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q and Zhang R. 2014. Response of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*. 5:636. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>
- Li L, Ma J, Ibekwe AM, Wang Q and Yang C. 2016. Cucumber Rhizosphere Microbial Community Response to Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* B068150. *Agriculture*. 6:1-15. <https://dx.doi.org/10.3390/agriculture6010002>
- Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q and Wang Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>
- Liu D, Cai J, Xie C, Liu C and Chen Y. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microbial Technology*. 46:252-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.10.007>
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-kolthoff JP, Wang M, Sun Y and Shao Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*. 5:1-11. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14082>
- López-Fernández S, Compat S, Vrhovsek U, Bianchedi PL, Sessitsch A, Pertot I and Campisano A. 2016. Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant and Soil*. 405:155-175. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2631-1>
- LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2016. Genus *Bacillus*. Microbiology Society. Charles Darwin House, 12 Roger St, London WC1N 2JU, United Kingdom. <http://www.bacterio.net/bacillus.html> (consulta, mayo 2017)
- Martínez-Absalón S, Rojas-Solís D, Hernández-León R, Prieto-Barajas C, Orozco-Mosqueda MC, Peña-Cabriales JJ, Sakuda S, Valencia-Cantero E and Santoyo G. 2014. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the gray mold phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science Technology*. 24:1349-1362. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.940846>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- May JJ, Wendrich TM and Marahiel MA. 2001. The dhb operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry*. 276:7209-7217. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009140200>
- Mc Spadden GBB. 2004 Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*. 94:1252-1258. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>
- Meena KR and Kanwar SS. 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*. 2015:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/473050>
- Moebius N, Üzümlü Z, Dijksterhuis J, Lackner G and Hertweck C. 2014. Active invasion of bacteria into living fungal cells. *Microbiology and infectious disease*. 1:1-20. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03007>
- Mora I, Cabrefiga J and Montesinos E. 2015. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLoS One*. 10: e0127738. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 270:26723-26726. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Niedmann LL y Meza-Basso L. 2006. Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica*. 66:235-246. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072006000300002>
- Novozymes. 2017. EcoGuard-GN, BioFungicide. Disponible en línea: http://www.kellysolutions.com/ere-news/documentsubmit/KellyData%5CNC%5Cpesticide%5CProduct%20Label%5C70127%5C70127-3%5C70127-3_ROOTS_ECOGUARD_GN_BIOFUNGICIDE_12_9_2010_2_33_14_PM.pdf
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. 2009. Series on pesticides no. 44. Report of Workshop on the Regulation of Biopesticides: Registration and Communication Issues. Disponible en línea: [http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/ENV-JM-MONO\(2009\)19-ENG.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/ENV-JM-MONO(2009)19-ENG.pdf)
- Oh, M., Ham, J. and Cox, J. M. 2012. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 152:1-8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018>

- Olson S, Ranade A, Kurkijy N, Pang K and Hazekamp C. 2013. Green Dreams or Growth Opportunities: Assessing the Market Potential for "Greener" Agricultural Technologies. Lux Research Inc, Boston, MA, USA. Disponible en línea: <https://portal.luxresearchinc.com/research/tidbit/15753>
- Olson S. 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*. 26:203-206. http://dx.doi.org/10.1564/v26_oct_04
- Ongena M and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*. 16:115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Pal KK and Gardener BM. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1:1-25. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Pavic S, Brett M, Petric N, Lastre D, Smoljanovic M and Atkinson M. 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*. 56:20-22. Disponible en línea: <https://www.tib.eu/en/search/id/BLSE%3ARN163847095/An-outbreak-of-food-poisoning-in-a-kindergarten/>
- Pérez-García A, Romero D and de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:187-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Pérez-Montaño F, Alias-Villegas RA, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ and Cubo T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169:325-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Piechulla B, Lemfack MC and Kai M. 2017. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, Cell & Environment*. 40: 2042-2067. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13011>
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC and Bakker PA. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-375. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pieterse CMJ. 1998. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 10:1571-1580. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1571>
- Porcar M y Juárez V. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. Pp:69-100. In: Bravo A y Cerón J (eds). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A y López-Pazos SA. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 11:87-96. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.1031>
- Pretali L, Bernardo L, Butterfield TS, Trevisan M and Lucini L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*, 130:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>
- Raaijmakers JM and Mazzola M. 2012. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology*. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Reyes A, Ricón G, López L, Martínez ZE y Quiñones E. 2015. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM*. 16:2-15. Disponible en línea: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- Rudrappa T, Czymme KJ, Paré PW and Bais HP. 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*. 148:1547-1556. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Ryu C-M, Hu C-H, Reddy MS and Kloepper JW. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*. 160:413-20. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00883.x>
- Sainju UM, Lissens AW, Allen BL, Stevens WB and Jabro J. 2016. Nitrogen balance in response to dryland crop rotations and cultural practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 233:25-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.023>
- Sauka DH y Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología*. 40:124-140. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v40n2/v40n2a13.pdf>
- Scharf DH, Heinekamp T and Brakjage AA. 2014. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. *PLoS Pathogens*. 10(1):e1003859. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003859>
- Selim HMM, Gomaa NM and Essa AMM. 2016. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: Ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Science and Technology*. 27:81-95. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1258452>
- Shafi J, Tian H and Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31:446-459. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Singh UB, Malvivya D, Wasiullah, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, Rai JP, Singh RK, Sarma Bk, Sharma PK and Sharma AK. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*. 108:300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>
- Soberón M y Bravo A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 14:303-314. Disponible en línea: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf
- Tamez GP, Galán WLJ, Medrano RH, García GC, Rodríguez PC, Gómez FRA y Tamez GGRS. 2001. Bioinsecticidas:

- su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL. 4:143-152. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/402/40240205.pdf>
- Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42:131-138. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- Thyagarajan SI, Ramanathan G, Singaravelu S, Kandhasamy S, Perumal PT and Sivagnam UT. 2017. Microbial Siderophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application. Wound Medicine. 17:7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wndm.2016.12.002>
- Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiró A and Thonart P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology. 96: 1151-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Trabelsi D and Mhamdi R. 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. BioMed Research International. ID 863240:1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/863240>
- Valent BioSciences. 2017. DiPel WG (*Bacillus thuringiensis*). Disponible en línea: http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/Dipel_WG.pdf
- Van der Heijden M, Bardgett R and van Straalen N. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters. 11: 296-310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Vargas-Ayala R, Rodríguez-Kábana R, Morgan-Jones G, McInroy JA and Klopper JW. 2000. Shifts in Soil Microflora Induced by Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in Cropping Systems to Control Root-Knot Nematodes. Biological Control. 17:11-22. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0769>
- Vázquez-Ramírez MF, Rangel-Nnñez JC, Ibarra JE y del Rincón-Castro MC. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Interciencia. 40:397-402. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33938675006.pdf>
- Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology. 47:177-206 <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Wang W, Chen LN, Wu H, Zang H, Yang Y, Xie S and Gao X. 2013. Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology. 56(3):208-215. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12035>
- Wang X, Wang L, Wang J, Jin P, Liu H and Zheng Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. PLoS ONE. 9(11):e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K and Tsuji Y. 2016. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. Trends in Molecular Medicine. 22:1077-1090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Xu C, Wang BC, Yu Z and Sun M. 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry₁ Cyt and Parasporin Toxins. Toxins. 6:2732-2770. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q and Zhang R. 2013. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. Applied Environmental Microbiology. 79:808-815. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02645-12>
- Yan L, Jing T, Yujun Y, Bin L, Hui L and Chun L. 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. Chinese Journal Chemical Engineering. 19:128-134. [http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541\(09\)60188-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541(09)60188-9)
- You C, Zhang C, Kong F, Feng C and Wang J. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl – mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. Ecological Engineering. 91:119-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoeng.2016.02.011>
- Yu X, Ai C, Xin L and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology. 47:138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Zhang B, Qin Y, Han Y, Dong C, Li P and Shang Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. Biochimica Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics. 1864:1152-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.003>
- Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Ren Y, Zhang G, Zhou H and Yang H. 2012. Enhancing plant disease suppression by *Burkholderia vietnamiensis* through chromosomal integration of *Bacillus subtilis* chitinase gene *chi113*. Biotechnology Letters. 34:287-293. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-011-0760-z>

Variability and symptoms caused by *Iris yellow spot virus* in *Nicotiana benthamiana*

Variabilidad y síntomas causados por *Iris yellow spot virus* en *Nicotiana benthamiana*

Katya Ornelas-Ocampo, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Sergio Aranda-Ocampo, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Estado de México; **Sergio Ramírez-Rojas**, Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. Km. 0.5 carretera Zacatepec-Galeana, C.P. 62780, Colonia Centro Zacatepec, Morelos; **Hernán García-Ruíz**, Department of Plant Pathology and Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA. *Autor para correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 13 de Julio, 2017.

Aceptado: 05 de Octubre, 2017.

Ornelas-Ocampo K, Ochoa-Martínez DL, Aranda-Ocampo S, Ramírez-Rojas S, García-Ruíz H. 2017. Variability and symptoms caused by *Iris yellow spot virus* in *Nicotiana benthamiana*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 131-140.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-2

Primera publicación DOI: 18 de Octubre, 2017.

First DOI publication: October 18, 2017.

Resumen. En cultivos de cebolla *Allium cepa* del estado de Morelos, México, se observan síntomas típicos y severos asociados a *Iris yellow spot virus* (IYSV). En esta investigación se estudiaron las alteraciones que ocasionan los aislamientos de IYSV procedentes de síntomas típicos y severos en *Nicotiana benthamiana*, las diferencias en el gen N y su filogenia. Cuatro aislamientos típicos y

Abstract. In onion *Allium cepa* crops in the state of Morelos, Mexico, typical and severe symptoms associated with *Iris yellow spot virus* (IYSV) are observed. In this work the alterations caused by IYSV isolates from typical and severe symptoms in *Nicotiana benthamiana*, the differences in the N gene and their phylogeny were studied. Four typical and five severe isolates mechanically inoculated caused systemic infection. Severe isolates caused more severe symptoms in bioclimatic chamber. The N gene sequence of both isolates had 98-99% identity with the IYSV nucleoprotein and no changes in nucleotide sequence between them were observed. Both isolates were grouped with the IYSV_{BR} genotype and had greater similarity with those reported in Canada and the United States.

Key words: *Tospovirus*, phylogeny, genomic changes.

cinco severos inoculados mecánicamente causaron infección sistémica. En cámara bioclimática los aislamientos severos ocasionaron mayor severidad de síntomas. La secuencia del gen N de ambos aislamientos tuvo 98-99% de identidad con la nucleoproteína de IYSV y no se observaron cambios en la secuencia de nucleótidos entre ellos. Ambos aislamientos se agruparon con el genotipo IYSV_{BR} y tuvieron mayor similitud con los reportados en Canadá y Estados Unidos.

Palabras clave: *Tospovirus*, filogenia, cambios genómicos.

La enfermedad viral más importante del cultivo de cebolla *Allium cepa* es la mancha amarilla causada por *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Bunyaviridae:Tospovirus) (Kritzman *et al.*, 2001) ya que ocasiona una importante disminución del tamaño del bulbo (Gent *et al.*, 2004). En hojas y tallos florales de cebolla el IYSV ocasiona manchas cloróticas de forma alargada o de diamante, color pajizo y aspecto seco, con ausencia o presencia de islas verdes en el centro de las lesiones (Gent *et al.*, 2006). El genoma de IYSV consiste de tres segmentos de ARN monocatenario de sentido negativo denominados grande (L), mediano (M) y pequeño (S) (Bag *et al.*, 2009; Bag *et al.*, 2010). El segmento S contiene al gen N que codifica para la nucleoproteína de la cápside comúnmente utilizado para la identificación y clasificación de tospovirus debido a su grado de divergencia (Pappu *et al.*, 2006), además de estudios de distribución geográfica y diversidad genética (Iftikhar *et al.*, 2014). Este virus se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial (Gent *et al.*, 2006) y en México ha sido reportado desde 2012 en cultivos de cebolla del estado de Morelos causando la enfermedad conocida como “mancha amarilla” con una

The most important viral disease that affects onion crops (*Allium cepa*) is yellow spot caused by the *Iris yellow spot virus* (IYSV) (Bunyaviridae:Tospovirus) (Kritzman *et al.*, 2001), because it leads to major reductions in bulb size (Gent *et al.*, 2004). Symptoms of IYSV on onion leaves and flower stems appear as elongated or diamond-shaped straw colored and dry-looking chlorotic spots, with or without green areas in the middle of the lesions (Gent *et al.*, 2006). The IYSV genome consists of three negative-sense, single-strand RNA segments defined as large (L), medium (M) and small (S) (Bag *et al.*, 2009, 2010). The S segment contains the N gene that encodes for capsid nucleoprotein that is commonly used to identify and classify tospoviruses, because of its degree of divergence (Pappu *et al.*, 2006), as well as to study geographic distribution and genetic diversity (Iftikhar *et al.*, 2014). IYSV is widely distributed worldwide (Gent *et al.*, 2006) but in Mexico it has been reported since 2012 on onion crops in the state of Morelos, where it causes a disease known as “yellow spot” with 100% incidence and more than 90% severity (Ramírez *et al.*, 2016). In Morelos, two types of symptoms associated with IYSV have been observed and, for this reason, the objective of this research was to describe the symptoms caused by both isolates on *Nicotiana benthamiana*, and to find out if there are differences in the N segment of the genome and its phylogenetic relation with other isolates. In the 2014-2015 cycle, onion plants showing symptoms of “yellow spot” associated with IYSV were collected in the municipalities of Ayala, Axochiapan, Emiliano Zapata, Jojutla, Puente de Ixtla, Tlaquiltenango, Xochitepec and Zacatepec in the state of Morelos, Mexico. Onion leaf tissue was classified based on the severity of the symptoms observed, frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C. *Nicotiana benthamiana* plants were mechanically inoculated (Mandal *et al.*,

incidencia de 100% y severidad superior al 90% (Ramírez *et al.*, 2016). En esta entidad se han observado dos tipos de síntomas asociados a IYSV por lo que la presente investigación tuvo como objetivo describir los síntomas que ocasionan ambos aislamientos en *Nicotiana benthamiana*, conocer si hay diferencias en el segmento N del genoma y su relación filogenética con otros aislamientos. En el ciclo 2014-2015 se colectaron plantas de cebolla en los municipios de Ayala, Axochiapan, Emiliano Zapata, Jojutla, Puente de Ixtla, Tlaquiltenango, Xochitepec y Zacatepec en el estado de Morelos, México, con síntomas de “mancha amarilla” asociados a IYSV. El tejido foliar de cebolla se clasificó de acuerdo con la severidad de los síntomas observados, se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Se inocularon mecánicamente (Mandal *et al.*, 2006) plantas de *N. benthamiana* con tejido foliar de cebolla positivo para *Iris yellow spot virus* por RT-PCR que mostraron síntomas típicos o severos. Como control negativo se utilizaron dos plantas de *N. benthamiana* frotadas únicamente con el amortiguador y el carborundum. Un grupo de cinco plantas inoculadas con cada uno de los aislamientos típicos o severos se mantuvieron en cámara bioclimática (temperatura media de 25 °C, 91% de humedad relativa (HR) promedio, 77% de HR mínima y 99% de HR máxima; con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad) y otro grupo de plantas en invernadero (temperatura promedio de 25 °C, mínima y máxima de 13 y 39 °C, respectivamente; 50% de HR promedio, 27 y 71%, mínima y máxima, respectivamente). Las plantas se observaron cada tercer día durante tres semanas para registrar el período de incubación y tipo de síntomas. Se extrajo ARN total a partir 0.1 g de tejido foliar de plantas de cebolla colectadas en campo que presentaban síntomas asociados a IYSV y a partir de 0.25 g de hojas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente, en este último

2006) with onion leaf tissue that tested positive for *Iris yellow spot virus* using RT-PCR and showed typical or severe symptoms. Two *N. benthamiana* plants were used as negative controls, but they were only rubbed with a buffer and carborundum (silicon carbide). A group of five plants were inoculated with each of the typical or severe isolates and kept in a bioclimatic chamber at 25 °C average temperature and 91% average relative humidity (RH), 77% minimum RH and 99% maximum RH, and a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness. Another group of plants was kept in the greenhouse at 25 °C average temperature (13 °C and 39 °C minimum and maximum temperature, respectively) and 50% average RH (27% and 71%, minimum and maximum HR, respectively). The plants were observed every other day for three weeks to record the incubation period and type of symptoms. Total RNA was extracted from 0.1 g of leaf tissue of onions plants collected in the field that showed symptoms associated with IYSV, and from 0.25 g of mechanically inoculated *N. benthamiana* leaves; RNA was extracted from the latter 10, 15 and 20 days post inoculation (dpi) with TriReagent® (Ambion®), following the manufacturer's protocol. The concentration and quality of the RNA was determined using a Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc), and its integrity through electrophoresis on 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). The cDNA synthesis was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®), according to the manufacturer's instructions. Primers IYSV917L and IYSV56U were selected to detect IYSV on onion because they amplify a segment of 896 bp corresponding to the N gene (Robène *et al.*, 2006). A region of ribosomal gene 18S was amplified as control for the PCR reaction (Zamboni *et al.*, 2008). To determine whether there were differences in the nucleotide sequence between the two IYSV isolates

caso, a los 10, 15 y 20 días post-inoculación (dpi) con TriReagent® (Ambion®) siguiendo el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración y calidad del ARN en un Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Inc) y su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La síntesis de cDNA se realizó con M-MLV Reverse Transcriptase (Promega®) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La detección de IYSV en cebolla se realizó con los iniciadores IYSV917L e IYSV56U que amplifican un segmento de 896 pb correspondiente al gen N (Robène *et al.*, 2006). Como control de la reacción de PCR se amplificó una región del gen ribosomal 18S (Zamboni *et al.*, 2008). Con el propósito de determinar si existían diferencias en la secuencia de nucleótidos entre ambos aislamientos de IYSV inoculados en *N. benthamiana*, se diseñaron los iniciadores IYSV-KO4 (5'-CTTAACACACAAATACTG-3') e IYSV-KO6 (5'-AGAGCAATCGAGGTATAAAAC-3') para amplificar el gen N con el programa Vector NTI™ Suite 8.0 con base en la secuencia AF001387 de IYSV depositada en el GenBank. Las secuencias obtenidas fueron editadas con los programas Chromas Lite 2.0 y Vector NTI™ Suite 8.0 y depositadas en la base de datos del GenBank (KX434621-434623, KX443600-443604, KX443598 y KX443599). El alineamiento múltiple se llevó a cabo con ClustalW y el análisis filogenético se realizó por el método Neighbor-joining (2000 repeticiones) con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Se colectaron 78 plantas de cebolla que mostraron síntomas de “mancha amarilla” asociados a IYSV en 14 localidades de los ocho municipios muestreados. Las plantas colectadas fueron de seis variedades de cebolla: Stratus (33.3%), Carta Blanca (24.4%), Florentina (10.2%), Cirrus (6.4%), Cal 214 (6.4%) y Joya (2.6%); el 16.7% restante de las muestras no fue posible identificar la variedad. Las plantas se

inoculated into *N. benthamiana*, primers IYSV-KO4 (5'-CTTAACACACAAATACTG-3') and IYSV-KO6 (5'-AGAGCAATCGAGGTATAAAAC-3') were designed to amplify the N gene using the Vector NTI™ Suite 8.0 program and based on the AF001387 sequence of IYSV stored in the GenBank. The obtained sequences were edited with the Chromas Lite 2.0 and Vector NTI™ Suite 8.0 programs and deposited in the GenBank database (KX434621-434623, KX443600-443604, KX443598 and KX443599). Multiple alignment was performed with the ClustalW program, and the phylogenetic analysis following the Neighbor-joining method (2000 replications) by using the MEGA6 program (Tamura *et al.*, 2013). Seventy-eight onion plants showing “yellow spot” symptoms associated with IYSV were collected at 14 sites of the eight sampled municipalities. The collected plants belonged to six onion varieties: Stratus (33.3%), Carta Blanca (24.4%), Florentina (10.2%), Cirrus (6.4%), Cal 214 (6.4%) and Joya (2.6%); it was not possible to identify the variety of the remaining 16.7% of samples. The plants were divided into two groups according to the symptoms they showed: a) typical symptoms in the form of elongated yellow-to-whitish dry spots with a chlorotic halo (Figura 1B), and b) severe symptoms consisting of white to yellow elongated and dry-looking spots with or without a necrotic halo, that in most cases covered the leaf (Figura 1C). Four typical isolates and five severe isolates were selected for analysis.

Primers IYSV917L and IYSV56U amplified the expected fragment of ~ 900 bp in all the typical isolates, while in the case of severe isolates the amplicon was ~500 bp (Figure 1D). However, both shared 99% identity with the capsid nucleoprotein of the N segment of IYSV reported in the GenBank. These results show that the 900 and 500 bp amplicons are associated with typical

dividieron en dos grupos con base en los síntomas que mostraban: a) síntomas típicos, consistentes en manchas secas amarillas a blanquecinas con halo clorótico y forma alargada (Figura 1B) y b) síntomas severos, en los cuales se observaban manchas blancas con o sin halo clorótico, alargadas, de aspecto seco que en muchos casos cubrían la lámina foliar (Figura 1C). Se seleccionaron cuatro aislamientos típicos y cinco aislamientos severos para su análisis.

Los iniciadores IYSV917L e IYSV56U amplificaron el fragmento esperado de ~ 900 pb en todos los aislamientos típicos, mientras que en el caso de los aislamientos severos se tuvo un amplicón de ~500 pb (Figura 1D) y ambos tuvieron 99% de identidad con la nucleoproteína de la cápside del segmento N de IYSV reportadas en el GenBank. Estos resultados muestran que los amplicones de 900 y 500 pb están asociados a aislamientos típicos o severos de IYSV, respectivamente. La severidad de los síntomas ocasionados por los aislamientos típicos y severos de IYSV en *N. benthamiana* fue diferente según la condición ambiental en la que se mantuvieron las plantas después de la inoculación

or severe IYSV isolates, respectively. The severity of the symptoms induced by typical and severe IYSV isolates on *N. benthamiana* was different depending on the environmental conditions under which the plants were kept after inoculation, regardless of the inoculum source. When kept in a bioclimatic chamber, at 7 dpi the symptoms induced by four of the five severe isolates were systemic and consisted of necrotic leaf venation, petiole constriction, necrotic leaf lesions surrounded by a dark brown halo, chlorosis and wilting. At 22 dpi, severe wilting was observed similar to that reported by Bag *et al.* (2012) (Figure 2B). In the case of the typical isolates, one produced chlorotic and necrotic lesions with necrotic veins and petioles; two more produced chlorotic and necrotic lesions but did not affect veins and petioles; the fourth isolate did not induce symptoms. On the other hand, when kept in the greenhouse, four severe and two typical isolates produced systemic infection at 10 dpi in the form of chlorosis and leaf wrinkling. One typical and one severe isolate caused more necrotic lesions on the leaves (Figure 2B). The fact that not all the typical or severe isolates caused the same symptoms (or

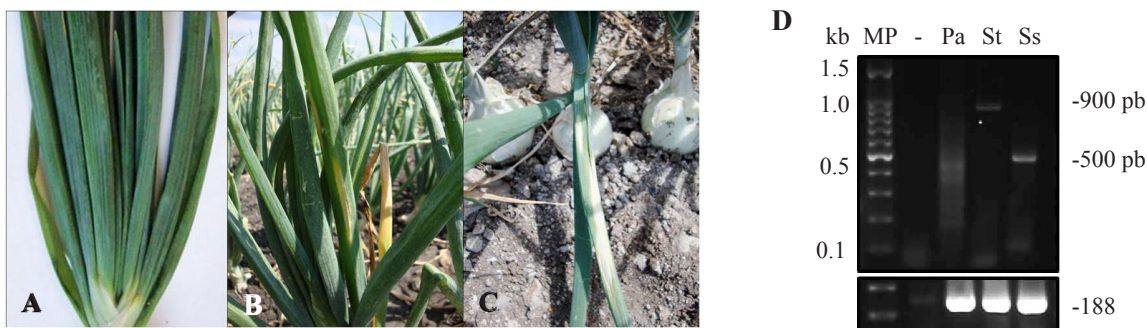


Figura 1. Síntomas asociados a *Iris yellow spot virus* en cebolla. A. Planta asintomática (Pa). B. Síntoma típico (St). C. Síntoma severo (Ss). D. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores IYSV917L e IYSV56U que amplifican un segmento del gen N de IYSV. -: control negativo. MP: Marcador de peso molecular 100 pb.

Figure 1. Symptoms associated with *Iris yellow spot virus* in onion. A. Asymptomatic plant (Pa). B. Typical symptom (St). C. Severe symptom (Ss). D. PCR products obtained using the IYSV917L and IYSV56U primers that amplify a segment of the N gen of IYSV. -: negative control. MP: 100 pb molecular weight marker.

independientemente de la fuente de inóculo. En cámara bioclimática, a los 7 dpi los síntomas ocasionados por cuatro de los cinco aislamientos severos fueron sistémicos, consistentes en necrosis de nervaduras, constricción de peciolas, lesiones necróticas foliares rodeadas por un halo café oscuro, clorosis y marchitamiento. A los 22 dpi se observó una marchitez severa similar a la reportada por Bag *et al.* (2012) (Figura 2B). En el caso de los

that some did not even cause visible alterations) during that evaluation period can be attributed to the mechanical inoculation process, because it is known that the mechanical transmission of IYSV is difficult (Bag and Pappu, 2009). In spite of the inconsistency of the first symptoms observed, in the greenhouse all the inoculated plants showed wilting at 30-35 dpi regardless of the isolate. On the other hand, in a study using *Tobacco mosaic virus* strains

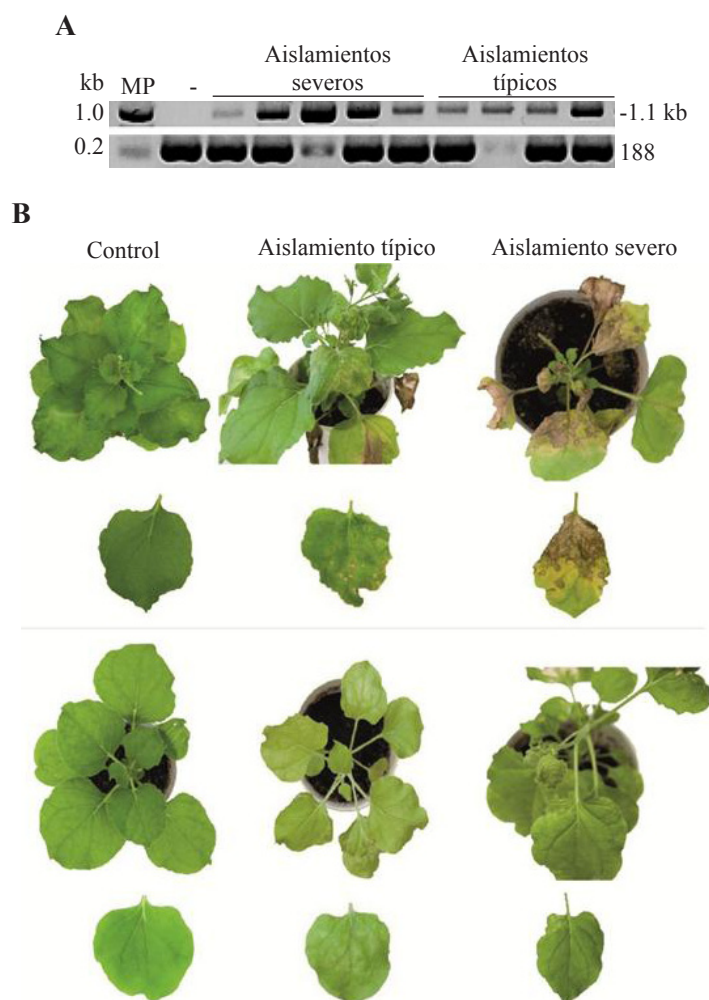


Figura 2. A. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 que amplifican el gen N + UTR5' provenientes de aislamientos típicos y severos de IYSV. MP: Marcador de peso molecular 1 kb (Promega), -: control negativo planta asintomática. B. Síntomas en plantas y hojas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con dos aislamientos de *Iris yellow spot virus* mantenidas en dos condiciones ambientales.

Figure 2. Figure 2. A. PCR products obtained using the IYSV-KO4 and IYSV-KO6 primers that amplify the N + UTR5' gen from typical and severe IYSV isolates. MP: Molecular weight marker 1 kb (Promega), -: negative control asymptomatic plant. B. Symptoms in *N. benthamiana* plants and leaves mechanically inoculated with two *Iris yellow spot virus* isolates kept under two environmental conditions.

asilamientos típicos, uno ocasionó lesiones cloróticas y necróticas con necrosis de venas y peciolo, dos más causaron lesiones cloróticas y necróticas sin la afectación de venas y peciolo; el cuarto aislamiento no ocasionó síntomas. Por otro lado, en invernadero cuatro aislamientos severos y dos típicos ocasionaron una infección sistémica a los 10 dpi consistente en clorosis y arrugamiento de hojas. Un aislamiento típico y uno severo causaron más lesiones cloróticas en las hojas (Figura 2B). El hecho de que no todos los aislamientos típicos o severos produjeran los mismos síntomas (o incluso que alguno no causara alteraciones visibles) en esta fecha de evaluación puede atribuirse al proceso de inoculación mecánica pues se sabe que existen problemas para la transmisión mecánica de IYSV (Bag y Pappu, 2009). A pesar de la inconsistencia en los síntomas iniciales observados, en invernadero todas las plantas inoculadas mostraron marchitez a los 30-35 dpi independientemente del aislamiento. Por otro lado, en un estudio realizado con variantes de *Tobacco mosaic virus* inoculadas en *Nicotiana tabacum* se encontraron diferencias en síntomas asociadas a la temperatura (Scholthof, 2008). Se sabe que de manera natural el ambiente puede contribuir al incremento o disminución de la frecuencia de poblaciones de virus (García *et al.*, 2001). En el caso de IYSV no se precisan condiciones ambientales que determinen variación en síntomas. No obstante, se ha relacionado la divergencia genética entre aislamientos, la gama de hospedantes y la respuesta de éstos a una adaptación ambiental (Pozzer *et al.*, 1999).

En todos los aislamientos típicos y severos analizados en la presente investigación mediante RT-PCR usando los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6, se obtuvo el fragmento esperado de 1,100 pb que incluye el gen N + UTR5' (Figura 2A). La comparación de las secuencias obtenidas en ambos aislamientos no mostró diferencias entre

inoculated in *Nicotiana tabacum*, differences in symptoms associated with temperature were observed (Scholthof, 2008). It is known that the environment can naturally contribute to increasing or decreasing the frequency of virus populations (García *et al.*, 2001). In the case of IYSV, no specific environmental conditions account for symptom variations. However, the genetic divergence among isolates, the host range and host response has been attributed to environmental adaptation (Pozzer *et al.*, 1999).

In all the typical and severe isolates analyzed in this research using RT-PCR and primers IYSV-KO4 and IYSV-KO6, the expected fragment of 1,100 bp was found that includes the N + UTR5' gene (Figure 2A). A comparison of the sequences obtained from both isolates showed no differences between them; these results are similar to those reported by Bag *et al.* (2012). According to García *et al.* (2001), viral strains are groups of isolates with similar properties such as host range, transmission capacity and similar nucleotide sequences, among others. In Mexico, TSWV is the only tospovirus that has been biological and molecularly characterized. González (2014) studied three Mexican isolates of TSWV and found that the difference in severity may be associated with changes in the amino acids in the Nsm and NSs proteins, as well as those in the intergenic regions (IGR). This may be due to the fact that the tospovirus NSs protein acts a gene silencing suppressor (Ocampo *et al.*, 2016), and, for this reason, it would be necessary to analyze other genes in molecular characterization studies. The sequences obtained with the IYSV-KO4 and IYSV-KO6 primers of the typical and severe isolates tested (Figure 2B) had 98 to 99% identity with the nucleoprotein of the capsid of IYSV gene N. The *in silico* analysis of the sequences obtained (data not shown) using the IYSV-KO4 and IYSV-KO6 primers of both isolates through RFLP with

ellas, resultados similares reportados por Bag *et al.* (2012). De acuerdo con García *et al.*, (2001) las cepas virales se consideran como un conjunto de aislamientos que mantienen propiedades similares como son el rango de hospedantes, capacidad de transmisión y similitud de secuencias de nucleótidos, entre otras. En México el TSWV es el único tospovirus caracterizado biológica y molecularmente. González (2014) estudió tres aislamientos mexicanos de TSWV y encontró que la diferencia en la severidad podría estar asociada a cambios en los aminoácidos de las proteínas NSm, NSs y de las regiones intergénicas (IGR). Esto podría explicarse debido a que la proteína NSs de tospovirus actúa como un supresor del silenciamiento génico (Ocampo *et al.*, 2016) por lo que sería necesario analizar otros genes en estudios de caracterización molecular. Las secuencias obtenidas con los iniciadores IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de los aislamientos típicos y severos analizados (Figura 2B) tuvieron de 98 a 99% de identidad con la nucleoproteína de la cápside del gen N de IYSV. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas (Datos no mostrados) con IYSV-KO4 e IYSV-KO6 de ambos aislamientos mediante RFLP con *HinfI*, mostró un patrón de restricción que incluye un fragmento mayor de 308 pb correspondiente con el genotipo IYSV_{BR} asociado con aislamientos de Asia (Iftikhar *et al.*, 2014). Por otro lado, se encontró que aislamientos de IYSV del estado de Zacatecas correspondieron al genotipo IYSV_{NL} relacionado con aislamientos de Norteamérica (Velásquez-Valle *et al.*, 2016). Asimismo, en Zacatecas y Michoacán se ha reportado la presencia de lesiones cloróticas en hojas con pequeñas islas verdes en el centro (Velásquez-Valle *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017), mientras que en Morelos no se tiene registro de este tipo de síntoma (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren la existencia de variantes de IYSV en México que difieren biológica y molecularmente. Con

HinfI showed a restriction pattern that includes a fragment larger than 308 bp which corresponds to the IYSV_{BR} genotype associated with isolates from Asia (Iftikhar *et al.*, 2014). On the other hand, it was found that IYSV isolates from the state of Zacatecas corresponded to the IYSV_{NL} genotype associated with isolates from North America (Velásquez-Valle *et al.*, 2016). The presence of chlorotic lesions on leaves with small green islands in the middle has also been reported in Zacatecas and Michoacán (Velásquez-Valle *et al.*, 2016; Ávila *et al.*, 2017), while in Morelos there is no record of this type of symptom (Ramírez-Rojas *et al.*, 2016). These results suggest that there are IYSV variants in Mexico that are biological and molecularly different. Regarding the phylogenetic analysis, isolates from Morelos were found to be more similar to those reported in Canada, United States and New Zealand and not to those from Asia, where the IYSV_{BR} genotype is mainly concentrated. Iftikhar *et al.* (2014) mentioned in their study that there are exceptions where the IYSV_{BR} genotypes are grouped with IYSV_{NL}, and vice versa; however, those results may provide information on how the virus spreads across countries (Smith *et al.*, 2006). Also, typical and severe isolates are concentrated in a clade that is divided into three groups: group I consists mainly of severe isolates, while groups II and III consist of moderate isolates (data not shown). Abad *et al.* (2003) and Bag *et al.* (2012) studied isolates from different states of western United States. In the first study, greater genetic diversity was found among isolates that were grouped with other isolates from different countries, while in the second study, the isolates were grouped in the same clade. Based on these results, the fact that different groups of IYSV isolates have developed in Zacatecas and Morelos suggests that there is greater genetic diversity of the virus in Mexico (Smith *et al.*, 2006). Such diversity may affect the

respecto al análisis filogenético, los aislamientos de Morelos mostraron mayor similitud con los reportados en Canadá, Estados Unidos y Nueva Zelanda y no con los asiáticos donde se concentra principalmente el genotipo IYSV_{BR}. Iftikhar *et al.* (2014) mencionan en su estudio que existen excepciones donde los genotipos IYSV_{BR} se agrupan con los IYSV_{NL} y viceversa; sin embargo, tales resultados podrían proporcionar información sobre el movimiento del virus entre países (Smith *et al.*, 2006). A su vez, los aislamientos típicos y severos se concentran en un clado que se divide en tres grupos: grupo I formado principalmente con aislamientos severos, mientras que el II y III por aislamientos moderados (Datos no mostrados). Por su parte, Abad *et al.* (2003) y Bag *et al.* (2012) estudiaron aislamientos procedentes de distintos estados del oeste de Estados Unidos; en el primer caso se encontró mayor diversidad genética entre aislamientos agrupándose con otros procedentes de diversos países, mientras que en el segundo estudio los aislamientos se agruparon dentro en un mismo clado. Con base en lo anterior, la formación de distintos grupos de aislamientos de IYSV que se generan de Zacatecas y Morelos sugiere una mayor diversidad genética de este virus en el país (Smith *et al.*, 2006). Esta diversidad puede influir en la eficiencia de transmisión del virus por trips vectores, gama de malezas hospedantes, severidad e incidencia de plantas con síntomas y, en general, en el progreso espacio-temporal de la enfermedad en ambas entidades (Ávila *et al.*, 2017).

En conclusión se tiene que los aislamientos típicos y severos de *Iris yellow spot virus* analizados en el presente estudio tuvieron la capacidad de infectar *N. benthamiana* y desarrollar síntomas similares con diferente severidad en dos condiciones ambientales. En el análisis del gen N no se encontraron cambios de secuencia de nucleótidos entre ambos aislamientos.

efficiency of virus transmission by vector thrips, the range of host weed species, the severity and incidence of plants with symptoms and, in general, the spatio-temporal disease progress in both states (Ávila *et al.*, 2017).

In conclusion, the typical and severe *Iris yellow spot virus* isolates analyzed in the present research infected *N. benthamiana* and caused similar symptoms at different severity levels under two environmental conditions. The analysis of the N gene did not show changes in the sequence of nucleotides between both isolates.

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

## LITERATURA CITADA

- Abad JA, Speck J, Mohan SK and Moyer JW. 2003. Diversity of the *Iris yellow spot virus* N gene in the USA. *Phytopathology* 93: S1. Disponible en línea: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2003.93.6.S1>
- Ávila-Alistac N, Ramírez-Rojas S, Lozoya-Saldaña H, Reboilar-Alviter A, Guzmán-Plazola RA. 2017. Alternate hosts of *Iris yellow spot virus* and trips on onion crops in Morelos and Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fito patología* 35: 242-262. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1701-1>
- Bag S, Druffel KL and Pappu HR. 2010. Structure and genome organization of the large RNA of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology* 155:275-279. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0568-5>
- Bag S, Druffel KL, Salewsky T and Pappu HR. 2009. Nucleotide sequence and genome organization of the medium RNA of *Iris yellow spot virus* from the United States. *Archives of Virology* 154:715-718. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0349-1>
- Bag S, Schwartz HF and Pappu HR. 2012. Identification and characterization of biologically distinct isolates of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*), a serious pathogen of onion. *European Journal of Plant Pathology* 134: 97-104. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0026-1>
- Bag S and Pappu HR. 2009. Symptomatology of *Iris yellow spot virus* in selected indicator hosts. Online. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0824-01-BR>
- García-Arenal F, Fraile A and Malpica JM. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual*

- Review of Phytopathology 39: 157-86. Disponible en línea: <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90: 1468-1480. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1468>
- Gent DH, Schwartz HF and Khosla R. 2004. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. *Plant Disease* 88: 446-452. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.446>
- González PBE. 2014. Caracterización biológica y molecular del *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en aislamientos mexicanos. Tesis Doctoral. Instituto de Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Disponible en línea: <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/2271>
- Iftikhar R, Bag S, Ashfaq M and Pappu HR. 2014. First report of *Iris yellow spot virus* infecting onion in Pakistan. *Plant Disease* 97: 1517. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0502-PDN>
- Kritzman A, Lampel M, Raccah B and Gera A. 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease* 85: 838-842. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.838>
- Mandal B, Pappu HR, Csinos AS and Culbreath AK. 2006. Response of peanut, pepper, tobacco, and tomato cultivars to two biologically distinct isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease* 90: 1150-1155. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-1150>
- Ocampo OT, Gabriel PSM, Bacheller N, Uiterwaal S, Knapp A, Hennen A, Ochoa-Martínez DL and García-Ruiz H. 2016. Antiviral RNA silencing suppression activity of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein. *Genetics and Molecular Research* 15(2): gmr.15028625. DOI: 10.4238/gmr.15028625
- Pappu HR, duToit LJ, Schwartz HF and Mohan SK. 2006. Sequence diversity of the nucleoprotein gene of *Iris yellow spot virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*) isolates from the western region of the United States. *Archives of Virology* 151: 1015-1023. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0681-z>
- Pozzer L, Bezerra IC, Kormelink R, Prins M, Peters D, Resende RO and de Ávila AC. 1999. Characterization of a tospovirus isolate of *Iris yellow spot virus* associated with a disease in onion fields in Brazil. *Plant Disease* 83: 345-350. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.4.345>
- Ramírez-Rojas S, Ornelas-Ocampo K, Osuna-Canizalez FJ, Bartolo-Reyes JC, Varela-Loza V, Hernández-Romano J y Ochoa-Martínez DL. 2016. Detection of *Iris yellow spot virus* in onion plants from Tepalcingo, Morelos state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34: 309-315. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1604-1>
- Robène-Soustrade I, Hostachy B, Roux-Cuvelier M, Minatchy J, Hédont M, Pallas R, Couteau A, Cassam N and Wuster G. 2006. First report of *Iris yellow spot virus* in onion bulb- and seed-production fields in Réunion Island. *Plant Pathology* 55: 288. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01262.x>
- Scholthof KBG. 2008. *Tobacco Mosaic Virus*: The Beginning of Plant Pathology. Online. APSnet Features. DOI:10.1094/APSnetFeatures-2008-0408
- Smith TN, Jones RAC and Wylie SJ. 2006. Genetic diversity of the nucleocapsid gene of *Iris yellow spot virus*. *Australian Plant Pathology* 35: 359. <http://dx.doi.org/10.1071/AP06031>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Salas-Muñoz S, Mauricio-Castillo JA and Pappu HR. 2016. First confirmed report of *Iris yellow spot virus* in onion nurseries in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 100: 1509. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0061-PDN>
- Zamboni A, Pierantoni L and De Franceschi P. 2008. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody plants. *iForest-Biogeosciences and Forestry* 1: 122-125. <http://dx.doi.org/10.3832/ifer0465-0010122>

# Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals

## Efecto de aceites naturales contra *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones *in vitro* y detección de fitoquímicos activos

**Eduardo Gutiérrez-Jiménez**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230, Chapingo, Estado de México; **Aurelio Pedroza-Sandoval\***, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas, Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez Km 40, CP. 35230, Bermejillo, Durango; **Luciano Martínez-Bolaños**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Sur Sureste, Km 7 Carretera Teapa - Vicente Guerrero, CP. 86800, Teapa, Tabasco; **José Alfredo Samaniego-Gaxiola**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Blvd. José Santos Valdéz No. 1200, Centro, CP. 27440, Matamoros, Coahuila; **Fabián García-González**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional de Zonas Áridas. Km 40 Carretera Gómez Palacio - Ciudad Juárez, CP. 35230, Bermejillo, Durango. \*Autor para correspondencia: apedroza@chapingo.uruz.edu.mx.

Recibido: 25 de Julio, 2017.

Aceptado: 19 de Octubre, 2017.

Gutiérrez-Jiménez E, Pedroza-Sandoval A, Martínez-Bolaños L, Samaniego-Gaxiola JA, García-González F. 2017. Effect of natural oils against *Mycosphaerella fijiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 141-150.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-4

Primera publicación DOI: 04 de Noviembre, 2017.

First DOI publication: November 04, 2017.

**Resumen.** El control químico de la sigatoka negra en banano *Mycosphaerella fijiensis* ha incrementado la presión de selección en el patógeno, con el consecuente impacto en el ambiente. El objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de los aceites esenciales de *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*,

**Abstract.** Chemical control of black sigatoka in banana *Mycosphaerella fijiensis* has increased the selection pressure on the pathogen, a fact which in turn creates an environmental impact. The objective of this study was to evaluate the effect of essential *Pimenta dioica*, *Piper auritum*, *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana*, and *Origanum majorana* oils on *M. fijiensis* growth under *in vitro* conditions, and to identify their active metabolites. The oils were obtained by hydrodistillation. *M. fijiensis* was isolated and developed on PDA culture medium. Thin layer chromatography (TLC) and column chromatography (CC) were used to identify the metabolites of each essential oil. Five concentrations: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm of each oil were used. *P. dioica*, *C. zeylanicum* and *O. vulgare* oils had a significant effect with lower *M. fijiensis* mycelial growth at a concentration of

*Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana* y *Origanum majorana*, en el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* e identificar sus metabolitos activos. Los aceites se obtuvieron mediante el método de hidrodestilación. El patógeno se aisló y desarrolló en medio de cultivo PDA. Se usaron cinco concentraciones: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm de cada aceite. Para identificar los metabolitos de cada uno de los aceites esenciales, se usó cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC). Los aceites de *P. dioica*, *C. zeylanicum*, *O. vulgare* presentaron menor crecimiento micelial de *M. fijiensis* a una concentración de 500 ppm; mientras que *O. majorana* y *A. ludoviciana* a 1000 ppm. El aldehído cinámico fue el principal metabolito detectado en la especie *C. zeylanicum*; el eugenol y carvacrol, en las especies *P. dioica* y *O. vulgare*.

**Palabras clave:** extractos vegetales, metabolitos secundarios, inhibición fúngica, control biológico.

El uso de plaguicidas en la agricultura, es una herramienta que permite alcanzar los objetivos de productividad y sustentabilidad si se combina con tecnologías adecuadas de manejo (Wheeler, 2002). Esto es necesario porque la mayoría de los microorganismo fitopatógenos han generado resistencia a los ingredientes activos de los fungicidas químicos (Chávez-Solís *et al.*, 2014). Una alternativa eficiente y económica para el control de enfermedades es el uso de extractos de plantas que tengan propiedades fungicidas (Guerrero *et al.*, 2007). Los extractos vegetales y aceites esenciales, son biodegradables con un impacto negativo menor en el ambiente (Bravo *et al.*, 2000). Con base en lo anterior, se ha incrementado el interés por el uso de aceites esenciales de especias y otras plantas como antimicrobianos naturales en alimentos y cultivos agrícolas (Celis *et al.*, 2012). Lambert *et al.* (2001),

500 ppm, whereas the effect on *O. majorana* and *A. ludoviciana* was observed at a concentration of 1000 ppm. Cinnamic aldehyde was the main metabolite detected in *C. zeylanicum* species, and eugenol and carvacrol in *P. dioica* y *O. vulgare* species.

**Key words:** plants extract, secondary metabolites, fungi inhibition, biological control.

The use of chemicals to control crop pests is a useful tool to fulfill productivity and sustainability objectives, provided that such tool is combined with proper management technologies (Wheeler, 2002). This is necessary because most of the phytopathogen microorganisms have become resistant to active ingredients of chemical fungicides (Chávez-Solís *et al.*, 2014). An efficient and inexpensive alternative for controlling diseases is the use of plant extracts with fungicidal properties (Guerrero *et al.*, 2007). Plant extracts and essential oils are biodegradable and have a limited environmental impact (Bravo *et al.*, 2000). Based on this, there is an increased interest in using essential spice and other plants oils as natural antimicrobials in food and agricultural crops (Celis *et al.*, 2012). Lambert *et al.* (2001) state that nowadays there is an increasing demand to precisely obtain the values of the inhibitory minimum concentration (CMI) of diverse essential oils so as to achieve a balance between sensory acceptance and antimicrobial effectiveness, which can be attained by conducting *in vitro* and *in vivo* studies.

In Mexico, the most used fungicides against *M. fijiensis* are: mancozeb and chlorothalonil, as well as systemic ingredients from the groups of benzimidazoles, triazoles, strobirulins and anilopyrimidines (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012). Chemical management of black sigatoka requires



señalan que existe actualmente una demanda creciente por obtener en forma precisa los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos aceites esenciales, con la finalidad de obtener un balance entre la aceptación sensorial y la eficacia antimicrobiana, lo cual puede lograrse mediante estudios *in vitro* e *in vivo*.

En México, los fungicidas más usados contra *M. fijiensis* son: mancozeb y clorotalonil e ingredientes sistémicos de los grupos benzimidazoles, triazoles, estrobirulinas, y anilopirimidinas (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012). El manejo químico de la sigatoka negra requiere de 10 a 45 aplicaciones de fungicidas por año, principalmente de mancozeb, propiconazol y tridemorf, con el consecuente riesgo de desarrollo de resistencia del patógeno a estos fungicidas (Mena-Espino y Couoh-Uicab, 2015). El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad biológica de diferentes aceites esenciales extraídos de plantas nativas, sobre el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* y la identificación de los principales compuestos químicos activos.

Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de hojas de momo (*Piper auritum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), orégano (*Origanum vulgare*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), mejorana (*Origanum majorana*), y frutos de pimienta (*Pimenta dioica*) y clavo (*Syzygium aromaticum*). Las muestras vegetales fueron colectadas en los Municipios de Teapa, Tabasco y Pichucalco, Chiapas, México. El material se secó bajo sombra y se trituró en molino manual. El polvo resultante se sometió a un proceso de hidrodestilación por dos horas en una proporción de 30 g en 500 ml de agua (Domínguez, 1979) y el aceite fue capturado mediante uso de un aparato tipo Clevenger (Muñoz *et al.*, 2001). El aceite se conservó en frascos color ámbar bajo refrigeración.

*Mycosphaerella fijiensis* fue aislado directamente de tejido infectado a partir de plantas enfer-

from 10 to 45 fungicide applications per year (mainly mancozeb, propiconazole and tridemorph), but there is the risk that the pathogen may develop resistance to those fungicides (Mena-Espino and Couoh-Uicab, 2015). The objective of this study was to evaluate the biological effectiveness of different essential oils extracted from native plants on *M. fijiensis* mycelial growth under *in vitro* conditions, and identify their main active chemical compounds.

Essential oils were obtained from momo (*Piper auritum*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), oregano (*Origanum vulgare*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), marjoram (*Origanum majorana*) leaves, and pepper (*Pimenta dioica*) and clove (*Syzygium aromaticum*) fruits. Plant samples were collected in the municipalities of Teapa, Tabasco, and Pichucalco, Chiapas, Mexico. The samples were dried under shade and grinded using a manual mill. The obtained powder was subjected to hydrodistillation for two hours in a proportion of 30 g in 500 ml of water (Domínguez, 1979), and the oil was collected using a Clevenger-type equipment (Muñoz *et al.*, 2001). The oil was poured in amber jars and kept in refrigeration.

*Mycosphaerella fijiensis* was directly isolated from infected tissue from infected banana plants collected at the producing zones of the municipalities of Teapa, Tabasco. Bits of around 1 cm<sup>2</sup> from diseased-plant tissue were cut and stuck to filter paper discs. The infected tissue was superficially disinfected in a 3% hypochlorite solution and then washed three times with distilled water. The discs were placed on Petri dish covers that contained solid culture medium (agar-water). Three days after the fungus started to grow, it was transferred to PDA culture medium for development (Stover, 1963).

Different concentrations of each oil were prepared in assay tubes with 10 mL of sterile

mas de banano colectadas en las zonas productoras del Municipio de Teapa, Tabasco. Se cortaron trozos de tejido vegetal enfermo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se pegaron a discos de papel filtro. El material enfermo se desinfectó superficialmente en una solución de hipoclorito al 3% y posteriormente se lavó por triplicado con agua destilada. Los discos se colocaron en la tapa de placas Petri con medio de cultivo sólido (Agar-Agua). A los tres días de crecimiento del hongo, éste se transfirió a medio de cultivo PDA para su desarrollo (Stover, 1963).

Se prepararon las diferentes concentraciones de cada aceite vegetal: 50, 100, 500, 1000 y 5000 ppm, en tubos de ensaye con 10 mL de agua destilada estéril. El contenido de cada tubo se mezcló en matraces con medio PDA (30 mL) y a continuación el contenido de cada matraz se distribuyó en cuatro placas Petri (10 mL). Como testigo se utilizaron placas PDA sin tratamiento. Los aceites esenciales extraídos de siete especies vegetales fueron evaluados en las cinco concentraciones, excepto *S. aromaticum*, el cual no fue evaluado a la concentración de 50 ppm. Para la inoculación, a partir del medio de cultivo con la cepa de *M. fijiensis*, se cortaron pequeños discos de 0.4 mm<sup>2</sup> aproximadamente y se colocaron al centro de cada placa Petri.

Se usó un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones, donde los tratamientos fueron las cinco concentraciones de cada aceite vegetal, más un testigo absoluto (PDA).

Las variables medidas fueron el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y el propio crecimiento de *M. fijiensis*. Para evaluar la eficacia de los tratamientos, se midió el desarrollo de la colonia fúngica (mm) hasta que las cajas Petri del testigo estuvieron completamente cubiertas con micelio. El PICR se calculó con la fórmula:

$$PICR(\%) = \left( \frac{RC - RT}{RC} \right) 100$$

distilled water: 50, 100, 500, 1000 and 5000 ppm. The content of each tube was mixed in flasks containing PDA medium (30 mL) and then the content of each flask was distributed among four Petri dishes (10 mL). PDA plates without treatment were used as control. Essential oils extracted from seven plant species were evaluated at the five concentrations (50, 100, 500, 1000 and 5000 ppm), except for *S. aromaticum* that was not evaluated at the concentration of 50 ppm. For inoculation, small discs of around 0.4 mm<sup>2</sup> from the culture medium containing the *M. fijiensis* isolate were cut and placed in the middle of each Petri dish.

In this study, a completely randomized design with four replications was used, where the treatments were the five concentrations of each plant oil plus an absolute control (PDA).

The measured variables were the percentage of radial growth inhibition (PICR) as well as that of *M. fijiensis* own growth. To evaluate the efficacy of the treatments, the fungal colony development was measured (in mm) until the Petri dishes containing the control were completely covered with mycelium. The PICR was calculated according to the following formula:

$$PICR(\%) = \left( \frac{RC - RT}{RC} \right) 100$$

where *RC*= mycelium radius in the control, and *RT*= mycelium radius in the treatments.

Data were analyzed using the SAS version 9.0 software. To determine the effect of the treatment, a variance analysis and Tukey's multiple range test of means were carried out.

After the antifungal activity of the plant oils ended, those showing the highest biological activity were selected to know their approximate chemical composition using the thin-layer

donde  $RC$  = radio del micelio en el testigo y  $RT$  = radio del micelio en los tratamientos.

Los datos fueron analizados con el programa SAS, versión 9.0. Se realizó un análisis de varianza y prueba de rango múltiple de medias Tukey, para identificar el efecto de tratamiento.

Después de determinar la actividad antifúngica de los aceites vegetales, se eligieron aquéllos que mostraron la mayor actividad biológica, para conocer su composición química aproximada, aplicando las técnicas cromatografía en capa fina (CCF) (Randerath, 1970) y cromatografía en columna (CC) (Abbot y Andrews, 1970). Previo a la cromatografía, se revisó la literatura para tener referencia del tipo de metabolitos presentes en los extractos crudos obtenidos y su actividad biológica, con lo cual se efectuó la relación correspondiente con los resultados de fitoquímicos identificados en este estudio.

De acuerdo al porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) y el crecimiento del micelio de *M. fijiensis*, los aceites de mejor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis*, fueron los extraídos de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* y *P. dioica*, con efecto inhibitorio a partir de la dosis de 100 ppm, con valores de 90.5, 71.5 y 58%, de inhibición, respectivamente; a una concentración de 500 ppm, la inhibición fue del 100 %. Los otros aceites registraron valores menores: *S. aromaticum* 10.5%, *P. auritum* 22.5%, *A. ludoviciana* 38% y *O. majorana* 45.9%. Los aceites de *A. ludoviciana* y *O. majorana*, mostraron efecto inhibitorio significativo a una concentración de 1000 y 5000 ppm. *S. aromaticum* no mostró ningún efecto inhibitorio sobre el hongo (Cuadro 1).

El primer día de exposición, los aceites de *C. zeylanicum*, *O. vulgare* y *P. dioica* a una dosis de 100 ppm, registraron un 100% PICR, con nulo crecimiento de *M. fijiensis* y este mismo efecto se

chromatography (CCF) (Randerath, 1970) and column chromatography (CC) techniques (Abbot and Andrews, 1970). Before using chromatography, the literature was reviewed to know what type of metabolites were present in the raw extracts obtained, as well as their biological activity, and then the corresponding relation was established with the phytochemical results achieved in this study.

According to the percentage of *M. fijiensis* radial growth inhibition (RGI) and mycelial growth, the oils with the best inhibitory effect on *Mycosphaerella fijiensis* development were those extracted from *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica*, whose inhibitory effect was observed at a dose of 100 ppm, with inhibition values of 90.5, 71.5 and 58%, respectively. When the oils were used at a concentration of 500 ppm, 100% inhibition was achieved. The other oils showed lower values: *S. aromaticum*: 10.5%, *P. auritum*: 22.5%, *A. ludoviciana*: 38% and *O. majorana*: 45.9%. *A. ludoviciana* and *O. majorana* oils had a significant inhibitory effect at a concentration of 1000 and 5000 ppm. *S. aromaticum* did not show any inhibitory effect on the fungus (Table 1).

On the first day of exposure, *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica* oils at a dose of 100 ppm showed 100% PICR with no *M. fijiensis* growth. The same effect lasted up to three days when essential *C. zeylanicum* oil was used. On day five of exposure, the same oils showed minimum *M. fijiensis* mycelial growth, with values from 2 to 9 mm (Figure 1A), but when the three oils were used at a concentration of 500 ppm, fungal growth inhibition was 100% (Figure 1B).

The antifungal capacity of the essential *C. zeylanicum* oil partially coincides with that reported by Barrera and García (2008), who found a growth inhibitory effect of 70% in *Fusarium* spp isolated from papaya at a concentration of

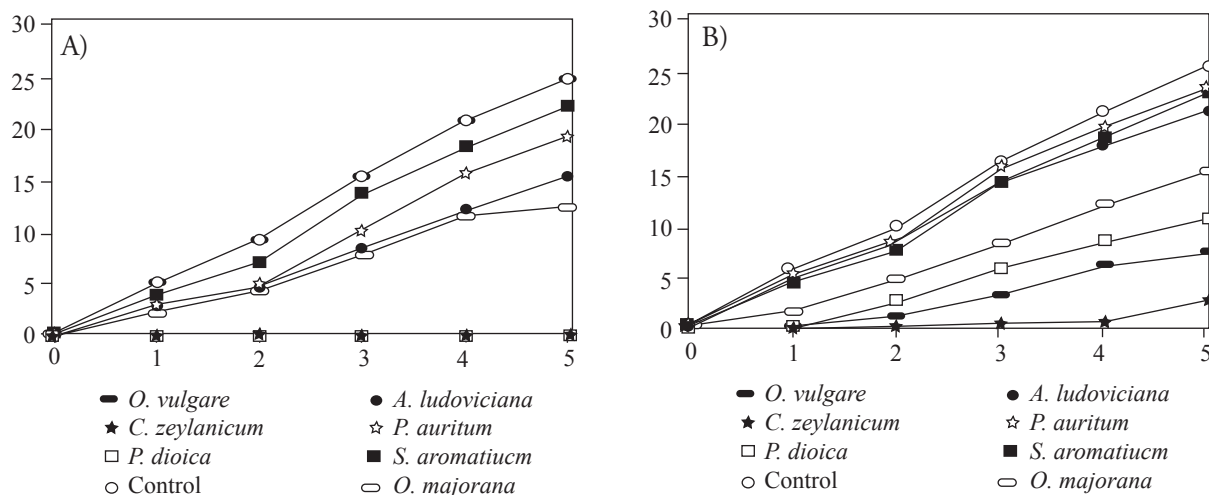
**Cuadro 1. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) de *Mycosphaerella fijiensis* por efecto de los aceites esenciales, cinco días después de la inoculación.**  
**Table 1. Percentage of radial growth inhibition (PRGI) of *Mycosphaerella fijiensis* by the effect of essential oils five days after inoculation.**

| Especie                      | Concentración (ppm) |           |           |            |          |          |
|------------------------------|---------------------|-----------|-----------|------------|----------|----------|
|                              | Control             | 50        | 100       | 500        | 1000     | 5000     |
| <i>Origanum vulgare</i>      | 0 D                 | 23 C b    | 71.5 B b  | 100 A a    | 100 A a  | 100 A a  |
| <i>Artemisia ludoviciana</i> | 0 D                 | 13.5 C c  | 17 C e    | 38 B cd    | 100 A a  | 100 A a  |
| <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | 0 D                 | 32.5 C a  | 90.5 B a  | 100 A a    | 100 A a  | 100 A a  |
| <i>Piper auritum</i>         | 0 D                 | 9.5 D cd  | 8.5 D ef  | 22.5 C def | 49.5 B c | 90.0 A a |
| <i>Pimenta dioica</i>        | 0 D                 | 14.5 C bc | 58 B c    | 100 A a    | 100 A a  | 100 A a  |
| <i>Syzygium aromaticum</i>   | 0 A                 | 3.5 A de  | 10.5 A ef | 10.5 A efg | 10 A de  | 10.5 A c |
| <i>Origanum majorana</i>     | 0 D                 | -----     | 36.9 C d  | 45.9 B c   | 94.7 A a | 98.0 A a |
| Control                      | ----                | 0 f       | 0 f       | 0 g        | 0 e      | 0 d      |

Cifras con la misma letra en las filas no son estadísticamente diferentes (Pruebas de agrupamiento Tukey,  $p \leq 0.01$ ). Letras mayúsculas: agrupamiento entre concentraciones por cada aceite (fila). Letras minúsculas: agrupamiento entre concentraciones entre aceites (columna) / Figures with the same letter in the rows are not statistically different (Tukey's grouping test,  $p \leq 0.01$ ). Capital letters: grouping among concentration of each oil (row). Lowercase letters: grouping among oil concentrations (column).

prolongó hasta los tres días con el aceite esencial de *C. zeylanicum*. A los cinco días de exposición, estos mismos aceites registraron un mínimo desarrollo micelial de *M. fijiensis* con valores de 2 a 9 mm (Figura 1A); mientras que, con la concentración de

150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the case of *O. vulgare* oil, Soylu *et al.* (2006) found *Phytophthora infestans* total growth inhibition at concentrations from 0.3 to 6.4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Cáceres *et al.* (2013) reported that an *O. vulgare* extract at a concentration of 200 ppm caused



**Figura 1. Crecimiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (mm) en los aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes especies de plantas. a) 100 ppm y b) 500 ppm. DDI= días después de la inoculación.**

**Figure 1. *Mycosphaerella fijiensis* growth (in mm) in essential oils obtained from different plant species. a) at 100 ppm and b) at 500 ppm. DAI= days after inoculation.**



500 ppm en los tres aceites, la inhibición del crecimiento del hongo fue del 100% (Figura 1B).

La capacidad antifúngica del aceite esencial de *C. zeylanicum* coincide parcialmente con lo reportado por Barrera y García (2008), quienes encontraron que este aceite tuvo un efecto inhibitorio del 70% en el crecimiento de *Fusarium* spp aislado de papaya a una concentración de 150 µg mL<sup>-1</sup>. Con respecto al aceite de *O. vulgare*, Soylu *et al.* (2006) encontraron inhibición completa del crecimiento de *Phytophthora infestans* a partir de 0.3 y 6.4 µg mL<sup>-1</sup>. Cáceres *et al.* (2013) reportaron que el extracto de *O. vulgare* a una concentración de 200 ppm, causó inhibición total de *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger*; en tanto que para *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. y *Penicillium digitatum* la inhibición fue a partir de 0.25 µL mL<sup>-1</sup>. Ramírez *et al.* (2011) reportaron que el mismo aceite obtenido como hidrolato por destilación al 50% (volumen-volumen) inhibió completamente el desarrollo de *Moniliophthora roreri* en medio de cultivo. También Ramírez *et al.* (2016), concluyen que los hidrodestilados y aceites de *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* y *P. dioica* obtenidos por microondas, son eficientes en inhibir el desarrollo de *A. solani* y *C. gloesporioides*.

El aceite de *O. majorana* mostró efecto inhibitorio del 95% a la concentración de 1000 ppm. El efecto fungistático de esta especie fue reportado por Gamboa *et al.* (2003), quienes encontraron que el extracto metanólico de mejorana inhibió el 100% del crecimiento micelial de *P. infestans* a partir de 8000 ppm y 59 a 80% de inhibición de *Rhizoctonia solani* a 2000 y 4000 ppm, respectivamente. Damian *et al.* (2010), observaron que el principio activo del extracto de *A. ludoviciana* fue el diclorometanol-metanol (1:2 v/v), el cual inhibió el 100% del crecimiento micelial de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. mirabilis*, así como un 60% de *P. infestans*, a una concentración de 100 ppm. En estudio, el aceite de *A. ludoviciana*

total growth inhibition of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger*, whereas in the case of *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp. and *Penicillium digitatum*, growth inhibition started at a concentration of 0.25 µL mL<sup>-1</sup>. Ramírez *et al.* (2011) reported that *Moniliophthora roreri* development in culture medium was totally inhibited by the same oil obtained as a hydrolate by distillation at 50% (volume-volume). Also, Ramírez *et al.* (2016) state that hydrodistillates and *C. zeylanicum*, *S. aromaticum* and *P. dioica* oils obtained by microwaving can efficiently inhibit *A. solani* and *C. gloesporioides* development.

*Origanum majorana* oil had a 95% inhibition effect at a concentration of 1000 ppm. The fungistatic effect of this species was reported by Gamboa *et al.* (2003), who found that the methanol extract of marjoram inhibited 100% of *P. infestans* mycelial growth at 8000 ppm, and from 59-80% *Rhizoctonia solani* growth at 2000 and 4000 ppm, respectively. Damian *et al.* (2010) observed that the active principle of the extract of *A. ludoviciana* was dichloromethanol-methanol (1:2 v/v), which inhibited 100% of *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* and *P. mirabilis* growth, and 60% of *P. infestans* growth, at a concentration of 100 ppm. In this study, *A. ludoviciana* oil inhibited 100% of *M. fijiensis* mycelial development at a concentration of 1000 ppm.

The main active chemical components identified were cinnamic aldehyde and eugenol in essential *C. zeylanicum* oils (50 and 10%, respectively); *P. dioica* and *O. vulgare*. *P. dioica* and *O. vulgare* had the highest concentration of eugenol (72.6 and 76.3%), followed by caryophyllene and limonene. The other components were reported in lower concentrations; for example, safrole was present only in *C. zeylanicum* oil; myrcene and O-cimene were present only in *P. dioica* oil; and limonene and carvacrol were present only in *O. vulgare* oil (Table 2).

inhibió el 100% del desarrollo micelial de *M. fijiensis* a una concentración de 1000 ppm.

Los componentes químicos principales activos identificados fueron el aldehído cinámico y el eugenol en los aceites esenciales de *C. zeylanicum* (50 y 10%, respectivamente), *P. dioica* y *O. vulgare*. El eugenol, es el de mayor concentración en *P. dioica* y *O. vulgare*, con 72.6 y 76.3%, respectivamente, seguido del cariofileno y limoneno. El resto de los compuestos se reportaron en concentraciones menores, de los cuales el safrol solo se presenta en el aceite de *C. zeylanicum*, mientras que el mirceno y el O-cimeno solo están en el aceite de *P. dioica*; el limoneno y el carvacrol, solo están presentes en el aceite de *O. vulgare* (Cuadro 2).

Barrera y García (2008), reportaron que el aldehído cinámico y el carvacrol inhibieron completamente el crecimiento del micelio del hongo *Fusarium* spp. a partir de 100 µg mL<sup>-1</sup>. Wang *et al.* (2010) reportaron que *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora beticola*, *Mycogone perniciosa*, *Macrophoma kawatsukai*, *Thanatephorus cucumeris*, *Alternaria alternata* y *Botrytis cinerea*, fueron altamente sensibles a la aplicación de eugenol, de los cuales *B. cinerea* y *S. sclerotiorum* fueron los más sensibles a este principio activo, con valores de CE<sub>50</sub> de 38.6 y 39.9 ug mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Gill y Holley (2006) evaluaron el eugenol, carvacrol y cinamaldehído sobre los cambios de ATP y viabilidad celular de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus sakei*. Los resultados indican que el mecanismo de acción del eugenol y carvacrol es la disrupción de la actividad citoplasmática de la membrana, lo que aumenta su permeabilidad no específica. La ausencia de un aumento en el ATP extracelular de células tratadas con cinamaldehído, sugiere que eugenol y carvacrol poseen actividad inhibidora de la ATPasa que carece de cinamaldehído. Ante estas evidencias, se

**Cuadro 2. Principales compuestos químicos activos como constituyentes de los aceites esenciales de tres especies de plantas.**

**Table 2. Main active chemical compounds as ingredients of essential oils from three plant species.**

| Compuestos        | Concentración (%)            |                       |                         |
|-------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------|
|                   | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> | <i>Pimenta dioica</i> | <i>Origanum vulgare</i> |
| Mirceno           |                              | 4.17                  |                         |
| Felandreno        |                              | 1.11                  | 0.06                    |
| Limoneno          |                              |                       | 6.19                    |
| O-cimeno          |                              | 0.98                  |                         |
| Carvacrol         |                              |                       | 1.06                    |
| Safrol            | 8                            |                       |                         |
| Eucaliptol        |                              | 3.4                   | 0.24                    |
| Aldehído cinámico | 50                           | 0.82                  | 0.39                    |
| Terpineno         |                              | 0.47                  | 0.06                    |
| Terpinoleno       |                              | 1.39                  | 2.20                    |
| Alpha-terpineol   |                              | 1.07                  | 2.20                    |
| Eugenol           | 10                           | 72.6                  | 76.31                   |
| Cariofileno       |                              | 6.13                  | 0.21                    |

Barrera and García (2008) reported that cinnamic aldehyde and carvacrol inhibited completely *Fusarium* spp fungal mycelial growth at 100 µg mL<sup>-1</sup>. Wang *et al.* (2010) reported that *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora beticola*, *Mycogone perniciosa*, *Macrophoma kawatsukai*, *Thanatephorus cucumeris*, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* were highly sensible to eugenol applications, and from these *B. cinerea* and *S. sclerotiorum* were the most sensible to such active principle, with values of CE<sub>50</sub> of 38.6 and 39.9 ug mL<sup>-1</sup>, respectively.

Gill and Holley (2006) evaluated eugenol, carvacrol and cinnamic aldehyde to observe ATP changes and cell variability in *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. Their results show that eugenol and carvacrol action mechanism is a disruption of the membrane

relaciona que el efecto de los aceites de *C. zeylanicum*, *P. dioica* y *O. vulgare*, inhibieron el crecimiento del micelio de *M. fijiensis*, por la presencia de eugenol y aldehído cinámico; así como el carvacrol en el aceite de *O. vulgare*.

## CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de *C. zeylanicum* y *O. vulgare* y *P. dioica* fueron los de mejor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* a una concentración de 100 ppm, con una inhibición del 100% a partir de 500 ppm. Los aceites de *A. ludoviciana*, y *O. majorana*, presentaron efecto inhibitorio a concentraciones de 1000 ppm; *P. auritum* a 5000 ppm y *S. aromaticum*, no presentó efecto inhibitorio. El aldehído cinámico fue el principal compuesto químico detectado en *C. zeylanicum*; el eugenol en *P. dioica* y *O. vulgare*, ésta última también con pequeñas concentraciones de carvacrol.

## LITERATURA CITADA

- Abbott D, and Andrews RS. 1970. Introducción a la Cromatografía, 3ª ed. Alhambra, Madrid. 122p.
- Barrera NLL, y García BL. J. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista científica UDO Agrícola 8(1):33-41. Disponible en línea: [www.bioline.org.br/pdf/cg08005](http://www.bioline.org.br/pdf/cg08005)
- Bravo LL, Bermudez TK and Montes BR. 2000. Inhibition of *Fusarium moniliforme* by plant powders and some of their chemical constituents. Manejo Integrado de Plagas (CA-TIE) 57:29-34. Disponible en línea: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=073431> (consulta, mayo 2014)
- Cáceres-Rueda de León I, Colorado-Vargas R, Salas-Muñoz E, Muñoz-Castellanos LN y Hernández-Ochoa L. 2013. Actividad Antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología 31(2):105-112. Disponible en línea: [www.rmfmf.org.mx/Vol3122013/Integrado/VOLUMEN3122013.pdf](http://www.rmfmf.org.mx/Vol3122013/Integrado/VOLUMEN3122013.pdf)

cytoplasmic activity, which increases their non-specific permeability. The absence of extracellular ATP of cells treated with cinnamic aldehyde suggests that eugenol and carvacrol have inhibitory activity from ATPase, which contains no cinnamic aldehyde. These results suggest that the effect of *C. zeylanicum*, *P. dioica* and *O. vulgare* oils inhibited *M. fijiensis* mycelial growth because of the presence of eugenol and cinnamic aldehyde, as well of carvacrol in *O. vulgare* oil.

## CONCLUSIONS

Essential *C. zeylanicum*, *O. vulgare* and *P. dioica* oils had the best inhibitory effect on *M. fijiensis* mycelial growth under *in vitro* conditions at a concentration of 100 ppm, with 100% inhibition at 500 ppm. *A. ludoviciana* and *O. majorana* oils showed an inhibitory effect at concentrations of 1000 ppm; *P. auritum* at 5000 ppm; *S. aromaticum* did not show any inhibitory effect. Cinnamic aldehyde was the main chemical compound principle detected in *C. zeylanicum*; eugenol in *P. dioica* and *O. vulgare*. The latter also showed small concentration of carvacrol.

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

- Celis FA, Mendoza FC, Pachón SE. 2012. Plantas aromáticas silvestres promisorias por su contenido de aceites esenciales. Universidad de Cundinamarca, Editorial Produmedios. Bogotá DC. Colombia. 56 p.
- Chávez-Solís AL, Pedroza SA, Nava DC, Cano RP y Castro FR. 2014. Control de la cenicilla del melón (*Podosphaera xanthii*) mediante el uso de extracto de *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (L.). Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 2:103-113. DOI:10.5154/r.chsza.2012.08.038
- Damian BLM, Martínez MRE, Salgado GR and Martínez PMM. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 9(2):136-142. Disponible en línea: www.re-dalyc.org/html/856/85612475009/

- Domínguez XA. 1979. Método de investigación fitoquímica. Ed Limusa. Mexico, D. F. 281p.
- Gamboa AR, Hernández CFD, Guerrero RE, Sánchez AA y Lira SSH. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont (De Barry) con extractos vegetales metanólicos de hojaseñ (*Flourensia cernua* D.C.), mejorana (*Origanum majorana* L.) y trompetilla [*Bouvatdia ternifolia* (Ca.) Schlecht.]. Revista Mexicana de Fitopatología 21:13-18. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221102>
- Gill A and Holley RA. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. International Journal of Food Microbiology 108(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009>
- Guerrero E, Solís S, Hernández F, Flores A, Sandoval V y D Jasso. 2007. Actividad biológica in vitro de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25:48-53. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225107>
- Lambert RJW, Skandאים PN, Coote PJ and Nychas GJ. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91:453-462. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556910>
- Mena-Espino X y Couoh-Uicab Y. 2015. Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la salud pública. Tecnociencia Chihuahua 9(2): 91-98. Disponible en línea: http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v9n2/data/Efectos_de_los_plaguicidas_utilizados_para_el_control_de_la_Sigatoka_negra_en_plantaciones_bananeras.pdf
- Muñoz L, Montes M y Wilkomirsky T. 2001. Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. 330p.
- Martínez-Bolaños L, Téliz-Ortiz D, Rodríguez-Maciél JC, Mora-Aguilera JA, Nieto-Ángel D, Cortés-Flores JI, Mejía-Sánchez D, Nava-Díaz C y Silva-Aguayo G. 2012. Fungicides resistance on *Mycosphaerella fijiensis* populations of southeastern Mexico. Agrociencia 46: 707-717. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a6.pdf>
- Ramírez GSI, López BO, Espinosa ZS y Wong VA. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Noviembre-Diciembre, 1879-1891. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149505008>
- Ramírez GS, López BO, Guzmán HT, Munguía US y Espinosa ZS. 2011. Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). Tecnología en Marcha 24(2):3-17. Disponible en línea: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4835560.pdf>
- Randerath K. 1970. Cromatografía de capa fina. Ediciones Urmo, S.A. Bilbao 3.
- Soylu EM, S Soyly and S. Kurt. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathology 161(2):119-128. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0206-z>
- Stover RH. 1963. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: Associated ascomycetous fungi. Canadian Journal of Botany 41(10):1481-1485. <https://doi.org/10.1139/b63-128>
- Wheeler WB. 2002. Pesticides in Agriculture and the Environment. Ed. Dekker. New York. 337p.
- Wang C, Zhang J, Chen H, Fan Y, & Shi Z. 2010. Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea*. Tropical Plant Pathology 35(3):137-143. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762010000300001>

Differential gene expression of avocado defense genes in response to avocado sunblotch viroid infection

Expresión diferencial de genes de defensa en aguacate en respuesta a la infección del viroide de la mancha de sol del aguacate

Luis Alberto López-Rivera, Iván Ramírez-Ramírez, Víctor Arturo González-Hernández, Nicacio Cruz-Huerta*, Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; Daniel Téliz-Ortiz, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. *Autor para correspondencia: nacruz@colpos.mx.

Recibido: 29 de Julio, 2017.

Aceptado: 09 de Octubre, 2017.

López-Rivera LA, Ramírez-Ramírez I, González-Hernández VA, Cruz-Huerta N, Téliz-Ortiz D. 2017. Differential gene expression of avocado defense genes in response to avocado sunblotch viroid infection. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 151-161.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1707-5

Primera publicación DOI: 22 de Noviembre, 2017.

First DOI publication: November 22, 2017.

Resumen. En aguacate se ha demostrado la participación de proteínas relacionadas con patogénesis en la defensa contra algunos de sus patógenos más importantes. Sin embargo, en la enfermedad de la mancha de sol del aguacate causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) aún quedan algunos componentes de la respuesta de defensa por aclarar. En particular, la infección por ASBVd puede ser asintomática o causar síntomas, lo cual genera incógnitas sobre el mecanismo de defensa de la planta. En esta investigación se analiza la expresión de genes codificantes de proteínas de defensa,

Abstract. Involvement of pathogenesis related proteins in defense against some of the most important avocado pathogens has been shown. However, infections caused by *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) require further research to elucidate the response components. Avocado response to ASBVd infections can be either asymptomatic or symptomatic, which further raises questions about plant defense mechanisms. This research analyzed the expression of genes *PanPRI*, *EREBP*, *PR-5* and *PR-6*, which encode defense proteins, in symptomatic and asymptomatic avocado leaves and fruits infected with ASBVd. Data analysis shows that ASBVd infections modify the expression of *PR-5* and *PR-6*, while the expression of *PanPRI* and *EREBP* does not change. Expression differences on fruit were more evident with *PR-5* on fruit from asymptomatic trees; *PR-6* had higher expression on infected fruits but there were no differences between symptomatic and asymptomatic fruits. The coordinated expression of both genes on fruit suggest the activation of a synergistic defense mechanism in response to ASBVd infection.

PaNPR1, *EREBP*, *PR-5* y *PR-6* en hojas y frutos de aguacate infectado por ASBVd, en condición sintomática y asintomática. El análisis de datos muestra que la infección de ASBVd modifica la expresión de los genes *PR-5* y *PR-6*, mientras que la de *PaNPR1* y *EREBP* no se modifica. Se encontraron diferencias en la expresión en frutos, siendo notable con *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos; a su vez, *PR-6* se expresa más en frutos infectados pero sin diferencias entre sintomático y asintomático. La expresión coordinada de ambos genes en frutos sugiere la activación de un mecanismo sinérgico de respuesta de defensa a la infección de ASBVd.

Palabras clave: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, genes *PR*.

La enfermedad de la mancha de sol causada por el *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) es una de las infecciones más persistentes en el aguacate producido en México (Vallejo-Pérez *et al.*, 2017). Esta enfermedad causa efectos citopáticos y cambios fisiológicos (Di Serio *et al.*, 2013; Saucedo-Carabez *et al.*, 2014; Vallejo-Pérez *et al.*, 2014; Saucedo-Carabez *et al.*, 2015; Vallejo-Pérez *et al.*, 2015), que finalmente resultan en frutos de menor tamaño y calidad externa e interna, y con menor rendimiento de fruto. En los frutos, los daños severos incluyen heridas deprimidas en su superficie que varían desde un color amarillo hasta manchas necróticas (Desjardins, 1987). A pesar de su severidad, el ASBVd tiene la particularidad de causar infecciones asintomáticas en los árboles (Semancik y Szychowski, 1994), y con ello un mayor riesgo de diseminación no intencionada, por material vegetal o por semilla. La primera estrategia de control de la enfermedad es la identificación de árboles infectados y esta se puede complementar con la

Key words: *Avocado sunblotch viroid*, *Persea americana*, *PR* genes.

Avocado sunblotch is a disease caused by *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd), one of the most persistent infections that affects avocado production in Mexico (Vallejo-Pérez *et al.*, 2017). Avocado sunblotch causes cytopathic effects and physiological changes (Di Serio *et al.*, 2013; Saucedo-Carabez *et al.*, 2014; Vallejo-Pérez *et al.*, 2014; Saucedo-Carabez *et al.*, 2015; Vallejo-Pérez *et al.*, 2015) that result in smaller fruit, low external and internal quality and reduced yield. Severe damages on fruit include depressed wounds on the surface with yellow to necrotic spots (Desjardins, 1987). In spite of its severity, a particular feature of ASBVd is that it causes asymptomatic infections in trees (Semancik and Szychowski, 1994), a fact that poses a high risk of non-intentional dispersion by plant material or seed. The first strategy to control this disease is the identification of infected trees, followed by identification of the defense mechanisms that allow a tree to show no symptoms.

Genes regulated during the defense response to pathogens in avocado have been found in gene expression profiles and have shown the molecular basis of the plant-pathogen interaction. These studies have mainly focused on infections by *Colletotrichum gloeosporioides* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2012) and *Phytophthora cinnamomi* (Mahomed and Van Den Berg, 2011). *PR* genes in avocado are particularly important because they favor an induced immune mechanism known as systemic acquired resistance. This study initiated with the hypothesis that the gene expression cascade in the avocado defense response to ASBVd (responsible for avocado sunblotch infection) is different between asymptomatic and symptomatic trees, possibly due to differential defensive capacity

identificación de los mecanismos de defensa que le permiten a un árbol no manifestar los síntomas de la enfermedad.

En la búsqueda de destacar genes regulados durante las respuestas de defensa a patógenos en aguacate se han elaborado estudios de perfiles de expresión que han revelado las bases moleculares de la interacción planta-patógeno, enfocadas principalmente en infecciones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2012) y *Phytophthora cinnamomi* (Mahomed y Van Den Berg, 2011). En aguacate han destacado los genes *PR* por favorecer un mecanismo inmune inducido de defensa de la planta conocido como resistencia sistémica adquirida. En este trabajo se partió de la hipótesis que la cascada de expresión en respuesta de defensa del aguacate al ASBVd, causante de la enfermedad de la mancha de sol, es diferente en árboles asintomáticos de aquellos que presentan síntomas, posiblemente indicando una capacidad de defenderse del ataque de esta enfermedad. El objetivo de este estudio fue describir los cambios en niveles de expresión de los genes de defensa seleccionados en plantas infectadas con síntomas y asintomáticas de la infección de ASBVd.

Se colectaron hojas maduras y frutos inmaduros de nueve árboles de aguacate (*Persea americana* Mill.) cv. Hass de un huerto comercial (19°26'6"N 101°52'28"O, 1610 m de elevación). Los árboles fueron previamente identificados como árboles sanos, árboles positivos a ASBVd con síntomas visibles y árboles positivos asintomáticos (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015) y sin síntomas de otra enfermedad. Se muestrearon tres hojas y tres frutos por árbol en tres árboles de cada grupo.

Se eligieron cuatro genes relacionados con defensa a patógenos en aguacate: *PaNPRI* (Backer *et al.*, 2015), *PR-5*, *PR-6* y *EREBP* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013). El gen de actina (Reeksting *et al.*, 2014) se usó como gen de referencia. Las secuencias de los

against the disease. Thus, this study described changes in the level of expression of defense genes selected in symptomatic and asymptomatic ASBVd-infected plants.

Mature leaves and unripe fruit from nine avocado trees (*Persea americana* Mill.) cv. Hass were collected in a commercial orchard (19°26'6" N 101°52'28" O, 1610 m altitude). Trees were previously classified as healthy, positive for ASBVd with visible symptoms, and positive for ASBVd without symptoms (Vallejo-Pérez *et al.*, 2015), and with no visible symptoms from another disease. Three leaves and three fruits from three trees of each group were sampled.

Four genes associated with pathogen defense in avocado were selected: *PaNPRI* (Backer *et al.*, 2015), *PR-5*, *PR-6* and *EREBP* (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013). The actin gene (Reeksting *et al.*, 2014) was used as a reference gene. Sequences of the primers were taken from the mentioned references. ASBVd detection required primers designed by Schnell *et al.* (1997).

Total RNA extraction involved tandem use of PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen) and Direct-zol® RNA MiniPrep (Zymo Research) as per manufacturer's directions to deal with high phenol and polysaccharides content in sample tissue. RNA concentration and quality were measured in a Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, USA), and the integrity of each sample was verified on a denaturing gel, according to the protocol by Aranda *et al.* (2012).

A mixture (10 µL final volume per reaction) containing the following substances was prepared to perform reverse transcription and amplification: 1X of Reaction Mix buffer (0.2 mM of each dNTP and 1.6 mM of MgSO₄), 0.2 µM of sense primer, 0.2 mM of antisense primer, 0.4 µL of Super Script® III RT/Platinum® TaqMix (Invitrogen), and 100 ng of total RNA; the volume was completed by

iniciadores se tomaron de las referencias mencionadas. Para la detección del ASBVd se emplearon los iniciadores diseñados por Schnell *et al.* (1997).

Para la extracción de RNA total, se usaron en forma conjunta los métodos PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen) y Direct-zol® RNA MiniPrep (Zymo Research), de acuerdo con los manuales de cada kit, debido al alto contenido de fenoles y polisacáridos en el tejido. La concentración y calidad del RNA se midieron en un Nanodrop 8000 (Thermo Scientific, EUA), y la integridad de cada muestra se verificó en gel desnaturante de acuerdo con el protocolo de Aranda *et al.* (2012).

Para la retrotranscripción y amplificación, en un volumen final de 10 µL por reacción se mezclaron: 1X de Reaction Mix buffer (0.2 mM de cada dNTP y 1.6 mM de MgSO₄), 0.2 µM de iniciador sentido, 0.2 mM de iniciador antisentido, 0.4 µL de SuperScript® III RT/Platinum® TaqMix (Invitrogen), 100 ng de RNA total, y se completó el volumen con agua tratada con DEPC. Las reacciones se corrieron en un termociclador (Applied Biosystems 2720, EUA) con las siguientes condiciones: síntesis de cDNA 1 ciclo de 32 min a 50 °C; 1 ciclo de 2 min a 94 °C; seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s con la temperatura de alineamiento calculada (TA) para cada iniciador (Cuadro 1), 15 s a 68 °C. Por último, se programó un paso de elongación final por 5 min a 68 °C. Los productos obtenidos de la RT-PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%/TAE a 80 V por 60 min. Los geles fueron expuestos a luz UV en el fotodocumentador (Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX, Francia) para obtener imágenes de los productos finales. La prueba de detección del patógeno se ejecutó con RT-PCR dúplex en un solo paso empleando los iniciadores del ASBVd y de actina. La mezcla utilizada para un volumen final de 10 µL de reacción fue: 1X Reaction Mix buffer, 0.2 µM de ambos iniciadores, sentido y antisentido; 0.4 µL de SuperScript® III

adding DEPC-treated water. PCR reactions were conducted in a thermocycler (Applied Biosystems 2720, EUA) under the following conditions: cDNA synthesis 1 cycle of 32 min at 50 °C; 1 cycle of 2 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 94 °C, 15 s using the calculated annealing temperature (TA) for each primer (Table 1), and 15 s at 68 °C. Finally, a 5 min elongation step at 68 °C was added. RT-PCR products were separated by electrophoresis in 2%/TAE agarose gel at 80 V for 60 min. Gels were exposed to UV light in a UV-transilluminator (Vilber Lourmat Infinity-1000/26MX, France) to capture images of the final products. Pathogen detection tests were carried out using single-step duplex RT-PCR, ASBVd and actin primers. The mixture used for a 10 µL final volume of reaction contained 1X Reaction Mix buffer, 0.2 µM of both primers (sense and antisense), 0.4 µL of SuperScript® III RT/Platinum® TaqMix, and 100 ng of total RNA; the volume was completed by adding DEPC-treated water. Amplification conditions were similar to those described previously. Defense genes and ASBVd viroid were detected in three samples of mature leaves and three samples of

Cuadro 1. Temperaturas de alineamiento calculadas (TA) para ejecutar la RT-PCR de un solo paso y tamaño de los productos esperados en pares de bases (pb).

Table 1. Calculated annealing temperature (TA) for one-step RT-PCR, and size of the expected products in base pairs (pb).

| Iniciador | TA (°C) | Tamaño del producto (pb) |
|---------------|---------|--------------------------|
| ASBVd | 52.0* | 250 |
| <i>Actina</i> | 57.1 | 103 |
| <i>PaNPR1</i> | 56.3 | 119 |
| <i>PR-5</i> | 55.6 | 171 |
| <i>PR-6</i> | 52.0 | 158 |
| <i>EREBP</i> | 61.6 | 96 |

*Temperatura de alineamiento para la prueba de detección del ASBVd por RT-PCR dúplex / *Annealing temperature to detect ASBVd through duplex RT-PCR.

RT/Platinum® TaqMix; 100 ng de RNA total, y se completó el volumen con agua tratada con DEPC. Las condiciones en el termociclador son iguales a las ya mencionadas. En los análisis de los genes de defensa y detección de ASBVd, se analizaron tres muestras de hoja madura y tres muestras de fruto inmaduro por grupo de árboles sanos, con síntomas y asintomáticos. Nueve bandas del viroide obtenidas de tejido de hoja, cuatro de árboles con síntomas y cinco de árboles asintomáticos, fueron secuenciadas (Macrogen Inc, Seoul, Corea) y comparadas con BLASTn del NCBI.

Con el programa de análisis de imágenes ImageJ® se comparó la densidad de bandas en gel de agarosa (Schneider *et al.*, 2012). Los valores de densidades de las bandas fueron normalizados por transformación de datos $\sqrt{(x+1)}$ y comparados con los valores de densidad de actina y después graficados. Las gráficas resultantes indican un perfil de intensidad relativa media, tomada de una región de interés constante. Las diferencias entre los tejidos y los árboles se analizaron por la prueba t de Student. La significancia estadística se consideró con $p \leq 0.05$.

La prueba de detección del ASBVd indica que el tejido de árboles infectados amplificó una banda de aproximadamente 250 pb, que coincide con el tamaño esperado del patógeno en cuestión, banda que no se presenta en árboles sanos (Figura 1). La amplificación del gen de actina indica que la reacción se llevó a cabo en todas las muestras analizadas. Las secuencias analizadas mostraron alta coincidencia con tres aislamientos del ASBVd (KF562705.1, KF562706.1 y KF562704.1, Identidad >92%; valor $E < 7 \times 10^{-67}$, datos no mostrados) reportados en las zonas productoras de aguacate (Beltrán *et al.*, 2014).

Los productos de la amplificación separados por electroforesis se presentan en la Figura 2. Los tejidos de árboles sanos muestran expresión basal de los genes evaluados, por lo que las comparaciones

unripe fruit per group from healthy, symptomatic and asymptomatic trees. Nine viroid bands from leaf tissue, four from symptomatic trees and five from asymptomatic trees were sequenced (Macrogen Inc, Seoul, Corea) and compared using BLASTn from the NCBI.

Band density was compared using image processing with ImageJ® (Schneider *et al.*, 2012). Band density values were normalized by data transformation $\sqrt{(x+1)}$, compared with the actin density values and then plotted. The resulting graphs display a profile of the average relative intensity taken from a constant region of interest. Differences between tissue and trees were analyzed using Student's t-test. Statistical significance was considered as $p \leq 0.05$.

The detection test for ASBVd on tissue from infected trees amplified a band of approximately 250 pb, which coincides with the expected size of the studied pathogen; this band is not present in healthy trees (Figure 1). Amplification of the actin gene shows that a reaction occurred in all the analyzed samples. Sequencing of the bands highly matched three ASBVd isolates (KF562705.1, KF562706.1 and KF562704.1, greater than 92% identity, and E-value less than 7×10^{-67} , data not shown) found in avocado production areas (Beltrán *et al.*, 2014).

Amplified products separated by electrophoresis are shown in Figure 2. Healthy tree samples show basal expression of the tested genes and serve as expression reference to ASBVd infection between infected trees (symptomatic and asymptomatic) and healthy trees. Surface and percentage data calculated by ImageJ® were used to calculate relative density of each band; this relative density was adjusted to the level of expression of the actin gene reference (Figure 3).

The *PaNPR1* and *EREBP* genes did not show significant differences in differential expressions

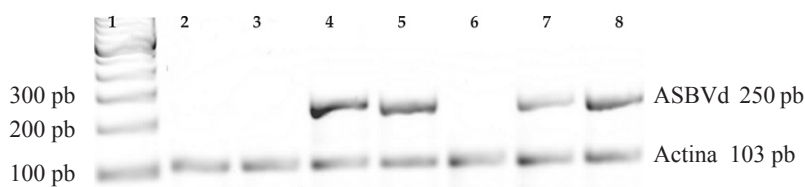


Figura 1. Detección del *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) en aguacate. Productos amplificados por RT-PCR dúplex de un solo paso. Los tejidos positivos para la infección con ASBVd muestran dos productos, el que pertenece al viroide de 250 pb y el de la amplificación del gen de actina de 103 pb. Carril 1: marcador de 100 pb; Carriles 2 y 3: tejido foliar, y Carril 6 fruto de árboles sanos; Carriles 4 y 7: hoja y fruto de árboles asintomáticos; Carriles 5 y 8: hoja y fruto de árboles con síntomas visibles. La banda correspondiente al viroide se expresa sólo en árboles infectados.
Figure 1. Detection of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) in avocado. Amplified products using duplex one-step RT-PCR. Tissues that tested positive for ASBVd show two products, one that belongs to the 250 bp viroid, and one from the amplification of the 103 bp actin gene. Lane 1, 100 bp marker; Lanes 2 and 3, healthy leaf samples; Lane 4 and 7, leaf and fruit samples from asymptomatic trees; Lane 6, fruit sample from healthy tree; Lanes 5 and 8, leaf and fruit samples from trees with visible symptoms. The band corresponding to the viroid is expressed only in infected trees.

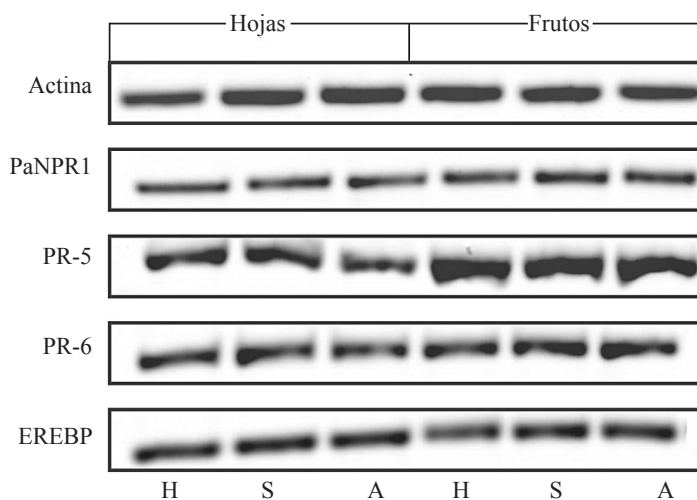


Figura 2. Productos de la amplificación de genes de defensa. Los primeros tres carriles corresponden a tejido foliar, los tres restantes a tejido de frutos. H, sano; S, sintomático; A, asintomático.
Figure 2. Amplification products from defense genes. The first three lanes correspond to leaf tissues, and the other three to fruit tissue. H, healthy; S, symptomatic; A, asymptomatic.

del efecto de la infección del ASBVd se realizaron entre árboles con síntomas y árboles asintomáticos, con respecto al sano. Los datos de área y porcentaje calculados por ImageJ® se usaron para obtener densidades relativas de cada banda y se ajustó al nivel de expresión del gen de actina usado como referencia (Figura 3).

among infected, symptomatic or asymptomatic trees, nor regarding their basal expression on healthy tissue (Figures 3A and 3B). *PR-5* expression on asymptomatic trees is over-expressed and significantly different from expression of symptomatic trees and basal expression, while fruits from symptomatic trees did not show any

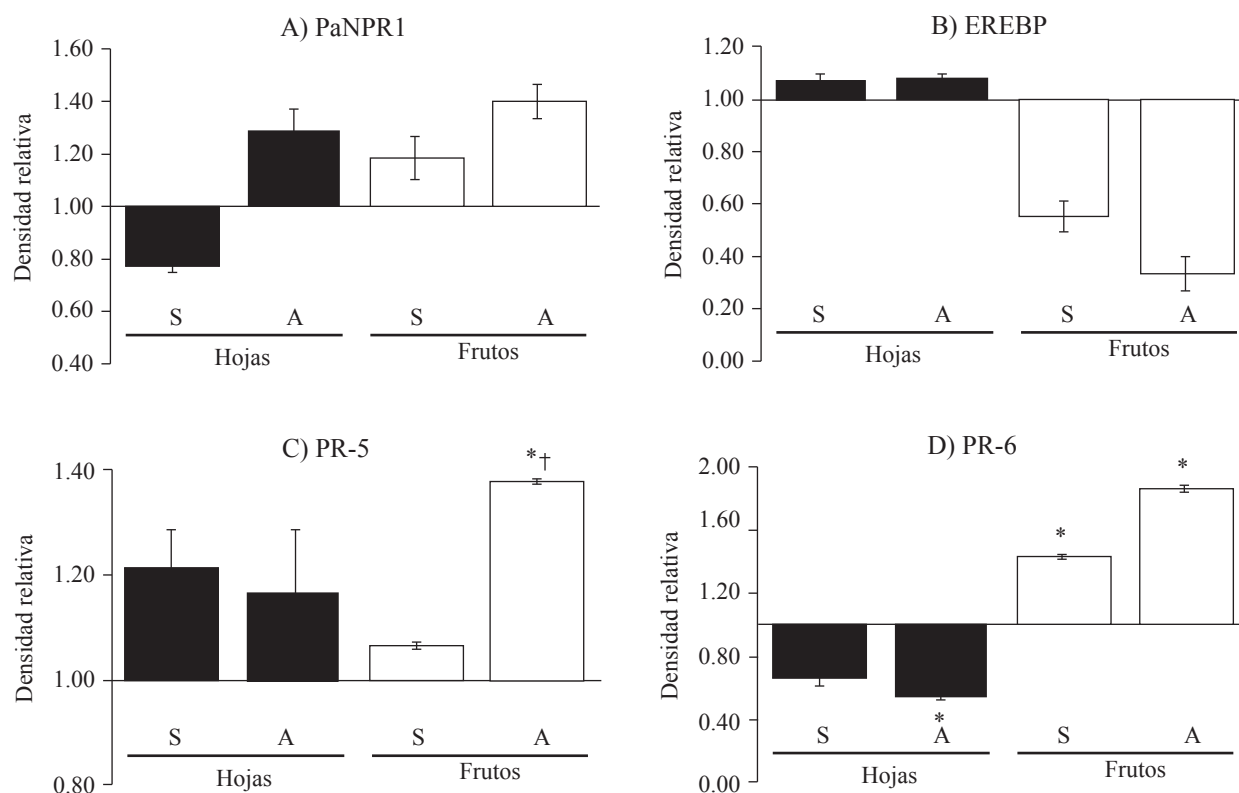


Figura 3. Análisis cuantitativo de las intensidades de los productos de la RT-PCR de los genes relacionados con defensa. Se muestran los promedios de las densidades relativas ajustadas, los cambios en la intensidad son negativos o positivos a partir del valor de la expresión basal asignada como 1. La línea vertical sobre cada barra representa el error estándar (n=3). S, tejido de árbol con síntomas; A, tejido de árbol sin síntomas; *, diferencia significativa con respecto al tejido sano; †, diferencia significativa entre sintomático y asintomático.

Figure 3. Quantitative analysis of band intensity from RT-PCR bands for defense-related genes. The average of the adjusted relative densities is shown; changes in intensity are negative or positive depending on the value of the basal expression assigned as 1. Vertical lines on each bar represent the standard error (n=3). S, tissue of trees with symptoms; A, tissue of asymptomatic trees; *, significant difference in relation to healthy tissue; †, significant difference between symptomatic and asymptomatic.

Los genes *PaNPR1* y *EREBP* no mostraron diferencias significativas en la expresión diferencial entre los árboles infectados, con síntomas y asintomáticos, ni con respecto a la expresión basal en los tejidos sanos (Figuras 3A y 3B). La expresión de *PR-5* en el fruto de árbol asintomático está sobre-regulada y es significativamente diferente a la de fruto de árbol con síntomas y a la expresión basal, mientras que en los frutos de árbol con síntomas no se encontraron diferencias con la expresión basal (Figura 3C). En las hojas no se encontraron diferencias en la

difference from basal expression (Figure 3C). No expression differences were found in leaves from symptomatic and asymptomatic trees, nor in the basal expression. The expression of *PR-6* on fruit infected by ASBVd was up-regulated and, although it increased in asymptomatic fruits, no difference was observed on fruits from symptomatic trees (Figure 3D). As for leaf tissue, a significant down-regulation was observed on asymptomatic trees.

It is documented that changes in *NPR1* gene expression induce changes in *PR-5* expression

expresión entre árboles sintomáticos y asintomáticos, ni con respecto a la expresión basal. La expresión de *PR-6* en frutos infectados con ASBVd tuvo regulación positiva, y, a pesar de su incremento en frutos asintomáticos, no se observó diferencia con los frutos de árboles con síntomas (Figura 3D). En el caso del tejido foliar se observó una regulación negativa significativa en los árboles asintomáticos.

La expresión de genes *NPR1* pueden inducir la expresión de *PR-5* (Shah *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados sugieren que los cambios de expresión de *PR-5* en tejidos infectados por ASBVd no fueron inducidos por *PaNPR1*, debido a que los niveles de expresión de éste no muestran diferencias significativas con respecto a la expresión basal. Backer *et al.* (2015) reportaron que la expresión constitutiva basal de *PaNPR1* fue más alta en hojas que en frutos inmaduros; además, y a diferencia del conocimiento que se tiene donde el ácido salicílico es activador de *NPR1*, los autores encontraron una regulación negativa de *PaNPR1* en el tratamiento con ácido salicílico a las 12h después de la aplicación, lo que sugiere una función alternativa en las respuestas de defensa.

Por otro lado, se sabe que los viroides pueden inactivar algunos factores de transcripción, incluyendo *EREBP*, generalmente al suprimir las vías de regulación de los mRNA asociados a ellos (Matoušek *et al.*, 2015; Katsarou *et al.*, 2016). En esta investigación no hubo diferencias en la expresión de *EREBP*. A pesar de que el etileno es una hormona muy común que puede simular el ataque de patógenos y promover la expresión de algunas proteínas PR, éste tiene limitada participación en el desarrollo de síntomas inducido por viroides (Hu *et al.*, 2011), lo cual es consistente con los resultados obtenidos.

Con respecto a la inducción de los genes *PR-5* y *PR-6*, los resultados obtenidos permiten suponer que el mecanismo que activa la expresión de genes

(Shah *et al.*, 2001). However, results in this research suggest that changes in *PR-5* expression on tissue infected by ASBVd were not produced by changes in *PaNPR1* expression because it did not change significantly from basal. Backer *et al.* (2015) reported that *PaNPR1* constitutive expression was higher on leaves than on unripe fruits. Additionally, and contrary to documented reports on *NPR1* activation by salicylic acid, they found *PaNPR1* down-regulation 12 h after salicylic acid treatment; this behavior suggests an alternative function for defense responses.

On the other hand, it is known that viroids can inactivate some transcription factors, including *EREBP*, usually by suppressing regulation ways of mRNA associated with them (Matoušek *et al.*, 2015; Katsarou *et al.*, 2016). In this research, no differences were found in *EREBP* expression. Although ethylene is a common hormone that can simulate a pathogens attack and favor the expression of some PR proteins, it has a limited involvement in the development of symptoms induced by viroids (Hu *et al.*, 2011), a fact that is consistent with the obtained results.

As for induction by *PR-5* and *PR-6* genes, the results in this research suggest that the mechanism that activates *PR* genes expression acts as a non-specific coordinated set of genes that varies in magnitude and can stop the primary infection (Fister *et al.*, 2016). The expression of *PR-5* on fruit from asymptomatic trees was high compared with that on other tissues, which suggest that this organ has a more active defense mechanism. The expression of *PR-5* genes may occur by the action of abscisic acid, ethylene, salicylate, methyl jasmonate or any other elicitor (Velazhahan *et al.*, 1999). Therefore, *PR-5* induction in fruits from asymptomatic trees may have resulted from the activation of another signaling messenger different from ethylene, which would also explain why the *EREBP* transcription

PR funciona como un conjunto de genes coordinado, no específico, que varía en magnitud y puede llegar a detener la infección primaria (Fister *et al.*, 2016). La expresión de *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos fue elevada en comparación con la de los otros tejidos, lo cual sugiere una respuesta de defensa más activa en este órgano. La expresión de los genes *PR-5* puede ocurrir por la acción de ácido abscísico, etileno, salicilato, metil jasmonato o algunos otros elicitores (Velazhahan *et al.*, 1999). Consecuentemente, es posible que la inducción de *PR-5* en frutos de árboles asintomáticos se deba a la activación por la señalización de otro mensajero diferente al etileno, lo cual explicaría también por qué el factor de transcripción *EREBP* no cambió sus niveles de expresión (Figura 3B). Sin embargo, la expresión de *PR-5* depende del tipo de patógeno, ya que la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* no modificó su nivel de expresión (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013).

La expresión de *PR-6* tuvo una regulación positiva en los frutos, similar a lo que ocurrió con *PR-5*. Las proteínas *PR-6* pertenecen al grupo de inhibidores de proteasas reportadas en una gran variedad de plantas respondiendo a diversos estímulos externos incluyendo heridas, alimentación por insectos e infecciones microbiales (Habib y Fazili, 2007; Turra y Lorito, 2011). La expresión de *PR-6* puede ser regulada por etileno y activada en hojas durante la maduración de frutos (Margossian *et al.*, 1988); también puede ser inducida por aplicaciones exógenas de metil jasmonato y ácido abscísico (Wang *et al.*, 2003). Debido a la escasa expresión de *EREBP* en los frutos de árboles asintomáticos, la expresión de *PR-6* en éstos parece relacionada con la inducción por ácido jasmónico o a través de una ruta alterna (Koiwa *et al.*, 1997).

Este estudio establece las bases para plantear diversas rutas de defensa del aguacate que son inducidas por la infección del ASBVd. Los cuatro genes

factor did not change its expression level (Figure 3B). However, the expression of *PR-5* depends on the type of pathogen, since *Colletotrichum gloeosporioides* infection did not modify its expression level (Djami-Tchatchou *et al.*, 2013).

PR-6 expression was up-regulated on fruits like *PR-5*. *PR-6* proteins belong to the group of protease inhibitors reported to be present in an extensive range of plants that respond to diverse external stimuli, including wounds, insect-feed and microbial infections (Habib and Fazili, 2007; Turra and Lorito, 2011). The expression of *PR-6* can be regulated by ethylene and activated in leaves during fruit ripening (Margossian *et al.*, 1988); it can also be induced by exogenous applications of methyl jasmonate and abscisic acid (Wang *et al.*, 2003). Given the poor *EREBP* expression on fruits from asymptomatic trees, the expression of *PR-6* on them seems to be associated with induction by jasmonic acid or through an alternate route (Koiwa *et al.*, 1997).

This study sets the basis to further explore diverse defense routes in avocado that are induced by ASBVd infection. The four studied genes showed differential expression, both in leaf tissue and fruit tissue from healthy trees and infected with ASBVd. The more significant changes in expression were recorded in fruits from asymptomatic trees with *PR-5* and *PR-6*. In contrast, in leaf tissue from asymptomatic trees only the *PR-6* basal expression was modified.

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

estudiados presentaron expresión diferencial, tanto en tejido foliar como en tejido de fruto de árboles sanos como infectados con ASBVd. Los cambios más significativos en la expresión se dieron en frutos

de árboles asintomáticos en los genes *PR-5* y *PR-6*. En cambio, en tejido foliar únicamente se modificó la expresión basal de *PR-6* en árboles asintomáticos.

## LITERATURA CITADA

- Aranda PS, LaJoie DM and Jorcyk CL. 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33: 366–369. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Backer R, Mahomed W, Reeksting BJ, Engelbrecht J, Ibarra-Laclette E and van den Berg NN. 2015. Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Frontiers in Plant Science* 6: 300. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00300>
- Beltrán-Peña H, Soria-Ruiz J, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Martínez DL, Nava-Díaz C y Ochoa-Ascencio S. 2014. Detección satelital y molecular del viroide de la mancha de sol del aguacate (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd). *Revista Fitotecnia Mexicana* 37: 21–29. Disponible en línea: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/37-1/2a.pdf>
- Desjardins P. 1987. *Avocado sunblotch*. Pp. 299–313. In: Diener TO (eds.). *The Viroids*. Springer. Boston, MA., USA. 344p. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2\\_18](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2_18)
- Di Serio F, De Stradis A, Delgado S, Flores R and Navarro B. 2013. Cytopathic effects incited by viroid RNAs and putative underlying mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 3: 288. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00288>
- Djami-Tchatchou AT, Straker CJ and Allie F. 2012. 454 sequencing for the identification of genes differentially expressed in avocado fruit (cv. Fuerte) infected by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Phytopathology* 160: 449–460. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01925.x>
- Djami-Tchatchou AT, Allie F and Straker CJ. 2013. Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Journal of Botany* 86: 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.166>
- Fister AS, Mejia LC, Zhang Y, Herre EA, Maximova SN and Gultinan MJ. 2016. *Theobroma cacao* L. pathogenesis-related gene tandem array members show diverse expression dynamics in response to pathogen colonization. *BMC Genomics* 17: 363. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2693-3>
- Habib H and Fazili KM. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68–85. Disponible en línea: <http://www.academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/8EB195410993>
- Hu XX, Nie XZ, Song Y, Xiong XY and Tai H. 2011. Ethylene is involved but plays a limited role in tomato Chlorotic dwarf viroid-induced symptom development in tomato. *Agricultural Sciences in China* 10: 544–552. [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60035-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60035-7)
- Katsarou K, Wu Y, Zhang R, Bonar N, Morris J, Hedley PE, Bryan GJ, Kalantidis K and Hornyik C. 2016. Insight on genes affecting tuber development in potato upon Potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection. *PLoS ONE* 11: e0150711. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150711>
- Koiwa H, Bressan RA and Hasegawa PM. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2: 379–384. [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)90052-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(97)90052-2)
- Mahomed W and Van den Berg N. 2011. EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biology* 11: 167. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-167>
- Margossian LJ, Federman AD, Giovannoni JJ and Fischer RL. 1988. Ethylene-regulated expression of a tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at the reactive site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 8012–8016. Disponible en línea: <http://www.pnas.org/content/85/21/8012.full.pdf>
- Matoušek J, Piernikarczyk RJ, Týcová A, Duraisamy GS, Kocábek T and Steger G. 2015. Expression of SANT/HTH Myb mRNA, a plant morphogenesis-regulating transcription factor, changes due to viroid infection. *Journal of Plant Physiology* 183: 85–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.001>
- Reeksting BJ, Coetzer N, Mahomed W, Engelbrecht J and Van Den Berg N. 2014. De novo sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. *PLoS ONE* 9: e86399. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086399>
- Saucedo-Carabez JR, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Ascencio S, Ochoa-Martínez D, Vallejo-Pérez MR and Beltrán-Peña H. 2014. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on avocado yield in Michoacan, Mexico. *European Journal of Plant Pathology* 138: 799–805. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0354-9>
- Saucedo-Carabez JR, Téliz-Ortiz D, Ochoa-Ascencio S, Ochoa-Martínez D, Vallejo-Pérez MR and Beltrán-Peña H. 2015. Effect of *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) on the postharvest quality of avocado fruits from Mexico. *Journal of Agricultural Science* 7: 85–92. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v7n9p85>
- Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schnell R, Kuhn D, Ronning CM and Harkins D. 1997. Application of RT-PCR for indexing *Avocado sunblotch viroid*. *Plant Disease* 81: 1023–1026. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1023>
- Semancik JS and Szychowski JA. 1994. *Avocado sunblotch disease*: a persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *Journal of General Virology* 75: 1543–1549. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-75-7-1543>
- Shah J, Kachroo P, Nandi A and Klessig DF. 2001. A recessive mutation in the *Arabidopsis* SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance

- against bacterial and oomycete pathogens. *The Plant Journal* 25: 563–574. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00992.x>
- Turra D and Lorito M. 2011. Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Current Protein and Peptide Science* 12: 374–85. <http://dx.doi.org/10.2174/138920311796391151>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, Colinas-León MT, De La Torre-Almaraz R, Valdovinos-Ponce G, Nieto-Ángel D and Ochoa-Martínez DL. 2015. Alterations induced by Avocado sunblotch viroid in the postharvest physiology and quality of avocado “Hass” fruit. *Phytoparasitica* 43: 355–364. <http://dx.doi.org/10.1007/s12600-015-0469-y>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, De La Torre-Almaraz R, Valdovinos-Ponce G, Colinas-León MT, Nieto-Ángel D and Ochoa-Martínez DL. 2014. Histopathology of avocado fruit infected by Avocado sunblotch viroid. *Journal of Agricultural Science* 6: 158–65. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v6n9p158>
- Vallejo-Pérez MR, Téliz-Ortiz D, De La Torre-Almaraz R, López-Martínez JO, Nieto-Ángel D. 2017. Avocado sunblotch viroid: pest risk and potential impact to Mexico. *Crop Protection* 99:118-127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.015>
- Velazhahan R, Datta SK and Muthukrishnan S. 1999. The PR-5 Family: Thaumatin-like Proteins. Pp107-129 In: Datta SK and Muthukrishnan S (eds.). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL., USA. 291p. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420049299.ch5>
- Wang HY, Huang YC, Chen SF and Yeh KW. 2003. Molecular cloning, characterization and gene expression of a water deficiency and chilling induced proteinase inhibitor I gene family from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) leaves. *Plant Science* 165: 191–203. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00158-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00158-4)

# ***In vitro* antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima***

## **Actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima***

**María Dolores Muy-Rangel, Jesús Rosario Osuna-Valle, Raymundo Saúl García-Estrada**, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, unidad Culiacán, Carretera Eldorado Km 5.5, Colonia Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP 80110, México; **Cesar San Martín-Hernández, Eber Addí Quintana-Obregón\***, CONACYT-CIAD, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán, Carretera a Eldorado Km 5.5, Colonia Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, CP 80110 México. \*Autor para correspondencia: eber.quintana@ciad.mx.

**Recibido:** 12 de Agosto, 2017.

**Aceptado:** 06 de Octubre, 2017.

Muy-Rangel MD, Osuna-Valle JR, García-Estrada RS, San Martín-Hernández C, Quintana-Obregón EA. 2017. *In vitro* antifungal activity of garlic essential oil (*Allium sativum* L.) against *Alternaria tenuissima*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 162-171.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1708-3

Primera publicación DOI: 06 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 06, 2017.

**Resumen.** Los problemas ambientales generados por el control químico de hongos fitopatógenos, requiere de la búsqueda de alternativas amigables con el medio ambiente para su control, como el aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) para el control de *Alternaria tenuissima*. El objetivo del estudio fue caracterizar los volátiles del aceite esencial de ajo por cromatografía de gases acoplado a masas y evaluar el crecimiento radial y biomasa *in vitro* de *A. tenuissima* en presencia del aceite esencial. Se identificaron el dialil disulfuro y dialil sulfuro

**Abstract.** Due to the environmental problems generated by the chemical control of phytopathogenic fungi, it is necessary to look for alternatives for their control. The essential oil of garlic may be a viable alternative for the control of *A. tenuissima*. In this study, the volatile compounds of garlic essential oil were analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Radial growth *in vitro* and biomass of *A. tenuissima* in presence of the garlic essential oil. Diallyl disulphide and diallyl sulphide were identified in 23.64 and 20.33%, respectively, among other compounds in a smaller proportion. At a concentration of 1000 ppm, the radial growth and biomass production were inhibited 100 and 86.20%, respectively, it compared with control PDA-Tween® 80 without oil. The medium and minimum inhibitory concentrations obtained for *A. tenuissima* were 229 and 1, 023 ppm, respectively. The spore germination of the fungus was inhibited 88.89% with medium minimum concentration and 94.17% with minimum inhibitory concentration. Garlic essential oil showed antifungal capacity



en un 23.64 y 20.33%, respectivamente, entre otros compuestos en menor proporción. Con la concentración de 1,000 ppm se inhibió el crecimiento radial y producción de biomasa en 100 y 86.20%, respectivamente, comparado con el testigo PDA-Tween® 80 sin aceite. Las concentraciones media y mínima inhibitorias obtenidas para *A. tenuissima* fueron 229 y 1,023 ppm, respectivamente. Se inhibió la germinación de esporas del hongo en 88.89 y 94.17% con las concentraciones media y mínima inhibitorias, respectivamente. El aceite esencial de ajo mostró capacidad antifúngica contra *A. tenuissima* inhibiendo la germinación de esporas, crecimiento radial y la producción de biomasa.

**Palabras clave:** control, germinación de esporas, biomasa fúngica.

*Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wilshire es un hongo que causa pérdidas en la producción de cultivos como en manzano (*Malus x domestica* Borkh.), peral (*Pyrus communis* L.), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), entre otros, agudizándose el problema por la producción de toxinas (Jones y Aldwinckle, 2002; Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Agamy *et al.*, 2013). *Alternaria* es un género ampliamente distribuido en zonas agrícolas y cuenta con especies saprofitas, endofíticas y fitopatógenas. Asimismo, como producto de su actividad, se han identificado alrededor de 70 metabolitos secundarios tóxicos para las plantas y algunos pueden afectar la salud humana relacionándose en casos de alergias y cáncer de esófago (Pavón-Moreno *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, para prevenir y controlar la invasión de los hongos fitopatógenos en la agricultura se han utilizado fungicidas sintéticos (Campbell y López-Ortíz, 2014). Los más utilizados contra *Alternaria* son el azoxystrobin, difenoconazol,

against *A. tenuissima*, inhibiting spore germination, radial growth and biomass production.

**Key words:** control, spore germination, fungal biomass.

*Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wilshire is a fungus that causes losses in the production of crops such as apple (*Malus x domestica* Borkh.) and pear trees (*Pyrus communis* L.), broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), and others. The problem becomes more important due to the production of toxins (Jones and Aldwinckle, 2002; Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Agamy *et al.*, 2013). *Alternaria* is a widely distributed genus in agricultural areas and it has saprophytic, endophytic, and phytopathogenic species. Likewise, as a product of its activity, about 70 secondary metabolites have been identified, all toxic to plants, and some may affect human health, relating to cases of allergies and esophagus cancer (Pavón-Moreno *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2015).

Traditionally, to prevent and control of the invasion of phytopathogenic fungi in agriculture, synthetic fungicides have been used (Campbell and López-Ortíz, 2014). The most widely used against *Alternaria* are azoxystrobin, difenoconazole, mancozeb, tebuconazole, and others (Malandrakis *et al.*, 2015; Savitha and Ajithkumar, 2016). However, these fungicides have adverse effects on the environment and human health. It is therefore necessary to search for environmentally friendly alternatives for the control of phytopathogenic fungi (Blair *et al.*, 2015).

Some compounds from botanical sources have the potential to be used for the control of plant pathogens in crops of agricultural interest. Considering that about 374,000 plant species have been described, there is a wide window of

mancozeb, tebuconazole, entre otros (Malandrakis *et al.*, 2015; Savitha y Ajithkumar, 2016). Sin embargo, estos fungicidas causan efectos adversos al ambiente y a la salud humana. Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas amigables con el entorno para el control de hongos fitopatógenos (Blair *et al.*, 2015).

Algunos compuestos de fuentes botánicas tienen potencial de ser usados para el control de fitopatógenos en cultivos de interés agrícola. Considerando que se han descrito alrededor de 374,000 especies de plantas, existe un amplio campo de oportunidad para el desarrollo de antifúngicos a partir de extractos de estas plantas (Cowan, 1999; Christenhusz y Byng, 2016). Entre los compuestos de las plantas con capacidad antifúngica destacan los aceites esenciales (Isman *et al.*, 2011). Algunos de los cuales han mostrado capacidad antifúngica tales como los extractos a base de té de limón (*Cymbopogon citratus* (D.S.) Stapf.), eucalipto (*Eucalyptus* spp.), canela (*Cinnamomum verum* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L.), entre otros (Calo *et al.*, 2015). El ajo (*Allium sativum* L.) contiene aceite esencial compuesto por aromáticos como el dialil disulfuro, dialil trisulfuro y otros compuestos azufrados con actividad antimicrobiana con potencial para ser utilizados en el control de hongos (Casella *et al.*, 2013; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012). El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de ajo contra de *A. tenuissima*.

El estudio se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC unidad Culiacán. La cepa de *A. tenuissima* fue proporcionada por el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora, previamente identificada por Quintana-Obregón *et al.* (2013), se reactivó y creció en medio papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad por siete días. Posteriormente, suspensiones de esporas con una solución de

oportunidad for the development of antifungal substances from the extracts of these plants (Cowan, 1999; Christenhusz and Byng, 2016). Among the compounds of plants with antifungal capabilities, a few that stand out are essential oils (Isman *et al.*, 2011), some of which have proven antifungal capabilities, such as those based on lemon (*Cymbopogon citratus* (D.S.) Stapf.), eucalyptus (*Eucalyptus* spp.), cinnamon (*Cinnamomum verum* L.), clove teas (*Syzygium aromaticum* L.), and others (Calo *et al.*, 2015). Garlic (*Allium sativum* L.) contains an essential oil composed of aromatics such as diallyl disulfide, diallyl trisulfate and other sulfurous compounds with antimicrobial activity with a potential to be used in fungal control (Casella *et al.*, 2013; Kocić-Tanackov *et al.*, 2012). The aim of this study was to evaluate the antifungal activity *in vitro* of garlic essential oil against *A. tenuissima*.

The study was conducted in the laboratories of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, AC (Food and Development Research Center), Culiacán unit. The *A. tenuissima* strain was provided by the Department of Food Research and Postgraduate Studies of the University of Sonora, previously identified by Quintana-Obregón *et al.* (2013). It was reactivated and grown in a potato-dextrose-agar (PDA) medium at 25 °C with light periods of 12 h light-darkness for seven days. Later, spore suspensions were prepared with a Tween® 20 at 0.1% (v/v), and finally, the concentration was determined using a hematology camera, BRAND® Germany).

The garlic essential oil used was of an analytical grade (Sigma-Aldrich® lot MKBB8390V). Oil volatiles were identified using a GC-7890B (Agilent Technology®, USA) gas chromatographer linked to an Agilent 240 (CG-MS) selective mass detector with an electric ionization system of 70 eV. The capillary column used was DB-5 (50 m\*0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies®,

Tween® 20 al 0.1% (v/v) fueron preparadas y finalmente se determinó la concentración mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer, BRAND® Alemania).

El aceite esencial de ajo utilizado fue grado analítico (Sigma-Aldrich® lote MKBB8390V). La identificación de volátiles del aceite se realizó mediante un cromatógrafo de gases GC-7890B (Agilent Technology®, EUA), acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 240 (CG-MS) con un sistema de ionización eléctrico de 70 eV. La columna capilar utilizada fue DB-5 (50 m\*0.25 mm) (J&C Scientific, Agilent Technologies®, Pennsylvania, EUA) y se acondicionó a 60 °C por 10 min. La temperatura se incrementó (20 °C/min) hasta 180 °C por 2 min y finalmente (4 °C/min) hasta 250 °C por 4.5 min. Gas acarreador helio fue utilizado a un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup>. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 220 y 280 °C, respectivamente. Los constituyentes se identificaron por comparación de índices de retención lineales con base a una mezcla de n-alcános y tiempos de retención de los espectros obtenidos con la base de datos NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

**Crecimiento Radial.** El PDA con Tween® 80 (1% v/v) se esterilizó por 15 min a 15 psi, se enfrió a 45 °C y se mezcló con aceite esencial de ajo a diferentes concentraciones (0, 10, 100, 500, 1,000 y 10,000 ppm). Adicionalmente, se preparó PDA sin Tween® 80 bajo las mismas condiciones, pero sin mezclarlo con aceite esencial de ajo, cada mezcla se depositó a razón de 15 mL en cajas de Petri de 50 mm de diámetro. Posteriormente, con una pipeta Pasteur de vidrio esterilizada se realizó una perforación de 6 mm en el centro del medio de cultivo solidificado y se inoculó con 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) de *A. tenuissima*. Finalmente, los cultivos se incubaron a 25 °C con fotoperiodos de 12 h luz-oscuridad y se midió

Pennsylvania, USA) and it was conditioned at 60 °C for 10 min. The temperature was raised (20 °C/min) up to 180 °C for 2 min and finally (4 °C/min) up to 250 °C for 4.5 min. Helium carrier gas was used at a flow of 2 mL min<sup>-1</sup>. The temperatures of the ionization chamber and of the line of transfer were 220 and 280 °C, respectively. The constituents were identified by comparing linear retention indices based on a mixture of n-alkanes and times of retention of the spectra obtained using database NIST 98 (National Institute of Standard and Technology, Maryland, EUA).

**Radial Growth.** The PDA with Tween® 80 (1% v/v) was sterilized for 15 min at 15 psi, then cooled at 45 °C and mixed with garlic essential oil at different concentrations (0, 10, 100, 500, 1,000 and 10,000 ppm). In addition, PDA was prepared without Tween® 80 under the same conditions, and without mixing it with garlic essential oil, each mixture was placed, 15 mL at a time, in Petri dishes with diameter of 50 mm. Later, using a sterilized glass Pasteur pipette, a 6 mm perforation was made in the center of the solidified culture medium and it was inoculated with 25 µL of the *A. tenuissima* spore solution (10<sup>5</sup> spores). Finally, the cultures were incubated at 25 °C with photoperiods of 12 h light-darkness and the radius of the fungal colony was measured every 24 h until it covered 95% of the control (PDA without Tween® 80) taken as a reference. The minimum inhibiting (CMI) and average inhibiting (CI<sub>50</sub>) conditions were determined at 120 h post-inoculation of the fungus with a Probit analysis with the statistical program NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, USA).

**Production of Biomass.** The Petri dishes with oil concentrations described above were inoculated with 25 µL of the *A. tenuissima* spore suspension (10<sup>5</sup> spores) in the central section, spreading them by surface diffusion and kept in the same

el radio de la colonia fúngica cada 24 h hasta que cubrió el 95% del testigo (PDA sin Tween® 80) tomado como referencia. Las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) y media inhibitoria (CI<sub>50</sub>) se determinaron a las 120 h post-inoculación del hongo mediante análisis Probit con el programa estadístico NCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Systems, Utah, EUA).

**Producción de biomasa.** Las cajas de Petri con las concentraciones de aceite previamente descritas se inocularon con 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) de *A. tenuissima* en la parte central distribuyéndolas por medio de la técnica de difusión en superficie y se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. A las 120 h se cuantificó el peso seco de las colonias que crecieron en el medio de cultivo para lo cual el micelio se separó de la caja de Petri y se transfirió a un vaso de precipitado con 50 mL de agua destilada, se esterilizó y se separó el micelio con papel filtro Whatman® # 2. El papel filtro junto con el micelio se secó en una estufa de convección de aire a 105 °C por 2 h y se enfrió en un desecador. El peso seco se expresó en mg caja<sup>-1</sup> (Larralde-Corona *et al.*, 1997; López-Insunza *et al.*, 1997).

**Germinación de esporas.** Se evaluó el efecto de la CI<sub>50</sub> y CMI del aceite esencial obtenidas por análisis Probit contra las esporas de *A. tenuissima*. Para ello, se distribuyeron 25 µL de la suspensión de esporas (10<sup>5</sup> esporas) sobre la superficie del medio de cultivo en la caja de Petri en testigos y tratamientos con aceite esencial. Las cajas de Petri se incubaron a 25 °C con fotoperiodo de 12 h luz-oscuridad hasta un tiempo máximo de 24 h. Se tomaron muestras aleatorias cada 4 h y se contó el número de esporas germinadas y no germinadas de un total de 200 esporas bajo un microscopio óptico. Se consideró como una espора germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue de al menos el 50% de la longitud de la espора sin germinar (Dantigny *et al.*, 2006).

conditions as described above. After 120 h, the dry weight was taken of the cultures that grew in the culture medium, and for this, the mycelium was separated from the Petri dish and transferred to a precipitate beaker with 50 mL of distilled water; it was sterilized and the mycelium was separated with Whatman® # 2 filter paper. The filter paper, along with the mycelium, was dried in an air convection oven at 105 °C for 2 h and collected in a desiccator. The dry weight was expressed in mg dish<sup>-1</sup> (Larralde-Corona *et al.*, 1997; López-Insunza *et al.*, 1997).

**Spore Germination.** An evaluation was carried out on the effect of the CI<sub>50</sub> and CMI of the essential oil obtained with a Probit analysis against the *A. tenuissima* spores. For this, 25 µL of the spore suspension (10<sup>5</sup> spores) were distributed on the surface of the culture medium in the Petri dish in controls and treatments with essential oils. The Petri dishes were incubated at 25 °C with a photoperiod of 12 h light-darkness for up to 24 h. Random samples of each were taken every 4 h and the number of germinated and not germinated spores were counted, out of a total 200 spores, under a light microscope. The spore was considered germinated when the length of the germinative tube was at least 50% as long as the not germinated spore (Dantigny *et al.*, 2006).

**Experimental Design and Statistical Analysis.** A randomized design was used in the experiment, in which the treatments were: PDA, PDA-Tween® 80 (controls) and concentrations of garlic essential oils in PDA-Tween® 80 (10, 100, 250, 500 and 1,000 ppm). The seven treatments were evaluated against *A. tenuissima*, where the experimental unit was a Petri dish. The response variables were radial growth and production of biomass. CI<sub>50</sub> and CMI were evaluated in the spore germination stage. All experiments were carried out three times. Data were analyzed using the statistical program JMP version 5.0 (SAS, 2002) for the analysis of variance



Diseño experimental y análisis estadístico. En el experimento se utilizó un diseño completamente al azar donde los tratamientos fueron: PDA, PDA-Tween® 80 (testigos) y concentraciones de aceite esencial de ajo en PDA-Tween® 80 (10, 100, 250, 500 y 1,000 ppm). Los siete tratamientos se evaluaron contra *A. tenuissima* donde la unidad experimental fue una caja de Petri. Las variables respuesta fueron crecimiento radial y producción de biomasa. Las  $CI_{50}$  y CMI se evaluaron en la etapa de germinación de esporas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico JMP versión 5.0 (SAS, 2002) para el análisis de varianza (ANVA) y las medias de los tratamientos se separaron por la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En el Cuadro 1 se muestran los principales componentes volátiles tentativos del extracto de ajo obtenidos por CG-MS con proporciones relativas  $\geq 1\%$ . Predominan compuestos con azufre en su estructura, entre los que destacan el dialil sulfuro y dialil disulfuro, los cuales son derivados de la actividad de la enzima alinasa al ser liberada por rompimiento del tejido durante la extracción de aceite (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012).

(ANOVA) and the averages of the treatments were separated using a Tukey test ( $p \leq 0.05$ ).

Table 1 shows the tentative main volatile components of the garlic extracts obtained by CG-MS with relative proportions  $\geq 1\%$ . There is a predominance of compounds with sulfur in their structures, some of the most important of which are diallyl sulfate and diallyl disulfate, which derive from the activity of the enzyme allinase when released by rupture from the tissue during the oil extraction (Kocić-Tanackov *et al.*, 2012).

The radial growth of *A. tenuissima* in the treatment with PDA medium only covered 95% of the Petri dish after 120 h, reaching a radius of 22 mm. There were no significant differences in the radial growth in treatments PDA and PDA-Tween® 80 after 120 h. The essential oil achieved a significant reduction of the radial growth of *A. tenuissima* with concentrations equal to or greater than 250 ppm, achieving, at 1,000 ppm, an inhibition of 100% in regard to the control PDA-Tween® 80 (Table 2).

In the production of biomass, medium PDA-Tween® 80 with 10 ppm of essential oil showed a significant increase in regard to the PDA alone. However, when increasing the concentration of

**Cuadro 1. Principales compuestos del aceite esencial de ajo identificados por reconocimiento estructural mediante CG-MS<sup>x</sup>.**

**Table 1. Main components of essential garlic oil identified by structural recognition using CG-MS<sup>x</sup>.**

| Tiempo de Retención (min) | Identificación                                   | Cantidad Relativa (%) |
|---------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|
| 6.867                     | Dialil sulfuro                                   | 20.33                 |
| 8.885                     | 1,3-Ditiano                                      | 6.1                   |
| 11.205                    | Ciclopentano, 1-acetil-1,2-epoxi                 | 2.51                  |
| 12.144                    | [1,3] Ditiano-2-ona                              | 1.15                  |
| 13.784                    | Dialil disulfuro                                 | 23.64                 |
| 14.038                    | 2-etileden [1,3] ditiano                         | 3.54                  |
| 14.6893                   | Hidroxiperóxido, 1,4-dioxan-2-il                 | 6.89                  |
| 15.314                    | 3-Vinil-1, 2-dithiaciclohex-4-ene                | 2.02                  |
| 19.526                    | Ciclopenteno, 3-metil-3-(trimethylsilyl) acetil- | 1.94                  |

<sup>x</sup> Con proporciones relativas  $\geq 1\%$ . / <sup>x</sup> With relative proportions  $\geq 1\%$ .

El crecimiento radial de *A. tenuissima* en el tratamiento con medio PDA solo cubrió el 95% de la caja de Petri a las 120 h alcanzando un radio de 22 mm. Entre los tratamientos PDA y PDA-Tween® 80 no hubo diferencias significativas en su crecimiento radial a las 120 h. El aceite esencial logró una disminución significativa del crecimiento radial de *A. tenuissima* con concentraciones iguales o superiores a 250 ppm logrando a 1,000 ppm una inhibición del 100% con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2).

En la producción de biomasa, el medio PDA-Tween® 80 con 10 ppm de aceite esencial mostró un incremento significativo con respecto al PDA solo. Sin embargo, al incrementar la concentración de aceite esencial a 500 y 1,000 ppm hubo diferencias significativas con respecto a los testigos, evidenciándose inhibición sobre el crecimiento de *A. tenuissima* a estas concentraciones, siendo la inhibición de producción de biomasa de 86.20% a 1,000 ppm de aceite con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2). El incremento en biomasa en medio de cultivo con Tween® 80 a 10 ppm pudo deberse a la interacción entre el Tween® 80 y el aceite esencial. Se ha reportado que el Tween® 80 puede incrementar la permeabilidad celular favoreciendo la

essential oil to 500 and 1,000 ppm, there were significant differences with the controls, presenting inhibition on the growth of *A. tenuissima* at these concentrations, with the inhibition of biomass production being of 86.20% at 1,000 ppm of oil in regard to the control PDA-Tween® 80 (Table 2). The increase in biomass in a culture medium with Tween® 80 at 10 ppm could be due to the interaction between Tween® 80 and the essential oil. Reportedly, Tween® 80 can increase cell permeability, favoring nutrient absorption; in *Aspergillus fumigatus* it has been suggested that the compound is used as a source of carbon (Inouye *et al.*, 2001; Taoka *et al.*, 2011). Since the concentration of Tween® 80 is greater than the essential oil (10 ppm) the surface of mycelial contact is competed for by Tween® 80, reducing the antifungal activity of the oil on its own (Inouye *et al.*, 2001). When increasing the concentration of essential oil (500 and 1,000 ppm) the oil-mycelium interaction increases, favoring its bioactivity, shown by the significant reduction of biomass at 500 and 1,000 ppm in regard to the PDA-Tween® 80 control (Table 2).

The  $CI_{50}$  and CMI of 229 ppm and 1,023 ppm, respectively, were obtained from the radial growth. The kinetics of the germination of *A. tenuissima*

**Cuadro 2. Efecto antifúngico de aceite esencial de ajo a diferentes concentraciones sobre la producción de biomasa de *Alternaria tenuissima* a las 120 h.**

**Table 2. Anti-fungal effect of essential garlic oil at different concentrations on the production of biomass of *Alternaria tenuissima* after 120 h.**

| Aceite esencial de ajo (ppm) | Crecimiento radial (mm) ±DE | Biomasa (mg caja <sup>-1</sup> ) ±DE |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0 (PDA)                      | 22±0.0a <sup>x</sup>        | 161.13±11.60c <sup>x</sup>           |
| 0 (PDA-Tween® 80)            | 22±0.0a                     | 522.60±83.01b                        |
| 10                           | 22±0.0a                     | 692.35±16.47a                        |
| 100                          | 20±2.17a                    | 148.10±19.74cd                       |
| 250                          | 9.67±0.76b                  | 101.00±1.13cde                       |
| 500                          | 2.83±0.56c                  | 68.03±1.86e                          |
| 1000                         | 0±0.0d                      | 72.10±7.23de                         |

<sup>x</sup>Letras distintas entre columnas indican diferencias estadísticas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Valores promedio de al menos tres replicas / <sup>x</sup>Different letters between columns indicate statistical differences according to the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). Average values of at least three replicas.

absorción de nutrientes, en *Aspergillus fumigatus* se ha sugerido que el compuesto es utilizado como fuente de carbono (Inouye *et al.*, 2001; Taoka *et al.*, 2011). Al ser mayor la concentración de Tween® 80 con respecto al aceite esencial (10 ppm) la superficie de contacto del micelio es competida por el Tween® 80 disminuyendo la actividad antifúngica del aceite solo (Inouye *et al.*, 2001). Al incrementar la concentración de aceite esencial (500 y 1,000 ppm) la interacción de aceite-micelio se incrementa favoreciendo su bioactividad, evidenciado por la disminución significativa de biomasa a las 500 y 1,000 ppm con respecto al testigo PDA-Tween® 80 (Cuadro 2).

A partir del crecimiento radial se obtuvo la  $CI_{50}$  y CMI de 229 ppm y 1,023 ppm, respectivamente. La cinética de germinación de esporas de *A. tenuissima* expuestas a las  $CI_{50}$  y CMI de aceite esencial de ajo (Figura 1) mostró diferencias significativas con respecto a los medios testigo (PDA y PDA-Tween® 80) con inhibiciones de germinación de esporas del 88.89 y 94.17% para  $CI_{50}$  y CMI, respectivamente.

spores exposed to the  $CI_{50}$  and CMI of garlic essential oil (Figure 1) showed significant differences with those of the control averages (PDA and PDA-Tween® 80) with spore germination inhibitors of 88.89 and 94.17% for  $CI_{50}$  and CMI, respectively.

According to Inouye *et al.* (2001), the inhibiting capacity of the volatile compounds of essential oils stands out for having three stages of fungal development: spore germination, vegetative mycelia, and reproductive mycelia. This effect of garlic essential oil has been reported in growth stages of *Aspergillus versicolor* and *Penicillium funiculosum* (Kocić-Tanackov *et al.* 2012; Li *et al.*, 2014). When evaluating the CMI of the essential oil versus *A. tenuissima*, a fungistatic effect was observed. It is possible that garlic essential oil interacts with the cell membrane, and when its concentration is reduced in time by the volatility of its components, the interaction diminishes and the fungus normalizes its metabolism. Tian *et al.* (2012) found alterations in the cell membrane of *Aspergillus flavus*, particularly ergosterol,

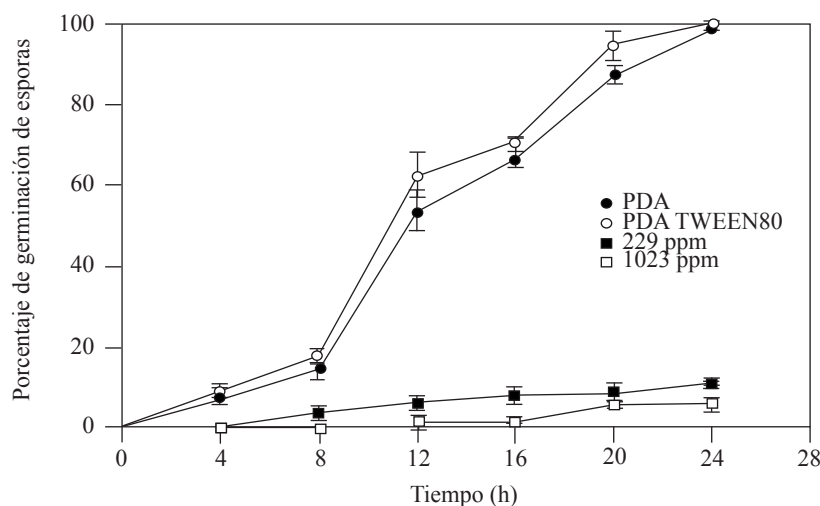


Figura 1. Cinética de germinación de esporas de *A. tenuissima* a 25 °C y fotoperiodos de 12 h en PDA, PDA-Tween® 80,  $CI_{50}$  y CMI de aceite esencial de ajo.

Figure 1. Kinetics of the germination of *A. tenuissima* spores at 25 °C and photoperiods of 12 h in PDA, PDA-Tween® 80,  $CI_{50}$  and CMI of essential garlic oil.

De acuerdo con Inouye *et al.* (2001) la capacidad inhibitoria de los compuestos volátiles de aceites esenciales se destaca por afectar tres etapas del desarrollo fúngico, la germinación de esporas, micelio vegetativo y micelio reproductor. Este efecto del aceite esencial de ajo ha sido reportado en etapas de crecimiento de *Aspergillus versicolor* y *Penicillium funiculosum* (Kocić-Tanackov *et al.* 2012; Li *et al.*, 2014). Al evaluar la CMI del aceite esencial contra *A. tenuissima* se observó un efecto fungistático. Es posible que el aceite esencial del ajo interactúe con la membrana celular y al disminuir su concentración a través del tiempo por la volatilidad de sus componentes la interacción disminuye y el hongo regulariza su metabolismo. Tian *et al.* (2012) encontraron alteraciones en la membrana celular de *Aspergillus flavus*, particularmente ergosterol al ser tratadas con eneldo (*Anethum graveolens*). El mecanismo de acción antimicrobiana de los compuestos azufrados se ha asociado la interacción con proteínas con grupos sulfhídricos de la célula y a los enlaces disulfuro que puedan formarse (El-Sayed *et al.*, 2017), es posible que la inhibición en *A. tenuissima* se deba a este tipo de interacciones químicas. No obstante, son necesarios estudios adicionales para elucidar mecanismos de interacción del aceite esencial de ajo sobre el crecimiento *in vitro* de *A. tenuissima*.

## CONCLUSIÓN

Los aceites esenciales de ajo contienen principalmente dialil sulfuro y dialil disulfuro, compuestos con capacidad antifúngica *in vitro* contra *A. tenuissima*. La  $CI_{50}$  de 229 ppm y CMI de 1,023 ppm pueden ser consideradas para evaluar su pertinencia en el control del hongo.

when treated with dill (*Anethum graveolens*). The antimicrobial action mechanism of sulfured compounds has been related the interaction with hydrogen sulfide groups of the cell and the disulfide bonds that may form (El-Sayed *et al.*, 2017); it is possible that the inhibition in *A. tenuissima* is due to this type of chemical interactions. However, additional studies are necessary to elucidate mechanisms of interaction of the garlic essential oil on the *in vitro* growth of *A. tenuissima*.

## CONCLUSIONS

Essential garlic oils contain mostly diallyl sulfide and diallyl disulfide, compounds with antifungal capacities *in vitro* against *A. tenuissima*. The  $CI_{50}$  of 229 ppm and CMI of 1,023 ppm can be considered to evaluate their pertinence in the control of the fungus.

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

LITERATURA CITADA

- Agamy R, Alamri S, Moustafa MFM and Hashem M. 2013. Management of tomato leaf spot caused by *Alternaria tenuissima* Wiltshire using salicylic acid and agrileen. International Journal of Agriculture and Biology 15: 266-272. Disponible en línea: https://www.researchgate.net/profile/M_Hashem/publication/286315953_Management_of_Tomato_Leaf_Spot_Caused_by_Alternaria_tenuissima_Wiltshire_using_Salicylic_Acid_and_Agrileen/links/570e369408aec783ddd1ba7b.pdf
- Blair A, Ritz B, Wesseling C and Freeman LB. 2015. Pesticides and human health. Occupational and Environmental Medicine 72:81-82. <http://dx.doi.org/10.1136/oemed-2014-102454>
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, and Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. Food Control 54: 111-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

- Campbell WB and López-Ortiz S. 2014. Sustainable Food Production Includes Human and Environmental Health, Issues in Agroecology –Present Status and Future Prospectus (vol.3). Springer Science and Business Media, New York London. 232p.
- Casella S, Leonardi M, Melai B, Fratini F and Pistelli L. 2013. The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytotherapy Research* 27: 380-383. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4725>
- Christenhusz MJ and Byng JW. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261: 201-217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582. Disponible en línea: <http://cmr.asm.org/content/12/4/564.long>
- Dantigny P, Bensoussan M, Vasseur V, Lebrihi A, Buchet C, Ismaili-Alaoui M. and Roussos S. 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108: 286-291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>
- El-Sayed HS, Chizzola R, Ramadan AA, and Edris AE. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-micro emulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry* 221: 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.052>
- Fraire-Cordero ML, Nieto-Ángel D, Cárdenas-Soriano E, Gutiérrez-Alonso G, Bujanos-Muñoz R.L. y Vaquera-Huerta H. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 25-33. Disponible en línea: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003
- Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K and Yamaguchi H. 2001. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiology and Immunology* 45: 201-208. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x>
- Isman MB, Miresmailli S and Machial C. 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews* 10: 197-204. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9170-4>
- Jones AL and Aldwinckle HS. 2002. Plagas y enfermedades del manzano y del peral. APS - Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 99 p.
- Kocić-Tanackov S, Dimić G, Lević J, Tanackov I, Tepić A, Vujičić B and Gvozdanović-Varga J. 2012. Effects of onion (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) essential oils on the *Aspergillus versicolor* growth and sterigmatocystin production. *Journal of Food Science* 77: M278-M284. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02662.x>
- Larralde-Corona C, López-Insunza F, and Viniegra-González G. 1997. Morphometric evaluation of the specific growth in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology Bioengineering* 56: 287-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971105\)56:3<287::AID-BIT6>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971105)56:3<287::AID-BIT6>3.0.CO;2-F)
- Li WR, Shi QS, Liang Q, Huang XM and Chen YB. 2014. Antifungal effect and mechanism of garlic oil on *Penicillium funiculosum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98: 8337-8346. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5919-9>
- López-Insunza F, Larralde-Corona CP, Viniegra-González G. 1997. Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. *Chemical Engineering Science* 52: 2629-2639. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00078-X)
- Malandrakis A, Apostolidou ZA, Markoglou A, and Flouri F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology* 142: 489-499. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0628-5>
- Pavón-Moreno MÁ, González-Alonso I, Martín-de Santos R. y García-Lacarra T. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria* 27: 1772-1781. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>
- Quintana-Obregón EA, Plascencia-Jatomea M, Burgos-Hernández A, Figueroa-López P and Cortez-Rocha MO. 2013. Isolation and identification of fungi from leaves infected with false mildew on safflower crops in the Yaqui Valley, Mexico. *Revista Mexicana de Micología* 37:19-27. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a4.pdf>
- SAS. 2002. JMP Scripting Guide V.5. SAS Institute Inc. North Carolina, USA. 456p.
- Savitha AS, and Ajithkumar K. 2016. Evaluation of Newer Combination of Azoxystrobin and Tebuconazole for the Management of Purple Blotch of Onion. *Madrás Agricultural Journal* 103: 233-236. Disponible en línea: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=a17e817e-fded-4696-801c-92182ad395fb%40sessionmgr4008>
- Taoka Y, Nagano N, Okita Y, Izumida H, Sugimoto S and Hayashi M. 2011. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 420-424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.010>
- Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y and Wang Y. 2012. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PloS One* 7: e30147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030147>
- Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ, de Vries M, Stielow JB, Thomma BPHJ and Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes?. *Studies in Mycology* 82: 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>

Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*)

Selección *in vitro* de micoparásitos con potencial de control biológico sobre roya del café (*Hemileia vastatrix*)

Irene Gómez-De La Cruz, Emiliano Pérez-Portilla, Esteban Escamilla-Prado, Centro Regional Universitario Oriente. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera Huatusco-Xalapa, Km 6, CP. 94100, Huatusco, Veracruz; Misael Martínez-Bolaños*, Campo Experimental Rosario Izapa. INIFAP. Carretera Tapachula-Cacahoatan, Km 18, CP. 30870, Tuxtla Chico, Chiapas; Gloria Luz L. Carrión-Villarnovo, Instituto de Ecología, A. C. Carretera antigua a Coatepec No. 351, El Haya, CP. 91070, Xalapa, Veracruz; Tania I. Hernández-Leal, Instituto Tecnológico Superior de Xalapa, Sección 5ª de la Reserva Territorial S/N, CP. 91060, Xalapa, Veracruz. *Autor para correspondencia: misael1480@hotmail.com.

Recibido: 02 de Agosto, 2017.

Aceptado: 11 de Diciembre, 2017.

Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villarnovo GLL, Hernández-Leal TI. 2017. Selection *in vitro* of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 172-183.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1708-1

Primera publicación DOI: 24 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 24, 2017.

Resumen. Con el objetivo de aislar e identificar micoparásitos de pústulas de *Hemileia vastatrix* y conocer su potencial de control de la roya de café, de diciembre del 2014 a enero del 2015 se muestrearon hojas de café arábico con pústulas de roya y presencia de posibles micoparásitos. Los hongos asociados a las pústulas se aislaron e identificaron morfométricamente a nivel de género. Se evaluó el porcentaje de micoparasitismo *in vitro* de tres de los aislamientos sobre pústulas de roya. Se obtuvieron

Abstract. In order to isolate and identify mycoparasites of *Hemileia vastatrix* and to know their potential as a biological control for Coffee Leaf Rust, from December 2014 to January 2015, samples of Arabica coffee with pustules and the presence of possible mycoparasites were sampled. The fungi associated with the pustules were isolated and identified morphometrically at the genus level. The percentage of mycoparasitism *in vitro* of three of the isolates on rust pustules was evaluated. We obtained 23 isolates of microorganisms associated with rust pustules: *Lecanicillium* spp. (7), *Calcarisporium* sp. (4), *Sporothrix* sp. (4) and *Simplicillium* spp. (8). All the isolates evaluated showed mycoparasitism in rust uredospores; however, 120 h after inoculation, the highest percentages ($P = 0.05$) were obtained with *Simplicillium* sp. (89%) and *Lecanicillium* sp. (68%).

Key words: *Lecanicillium*, *Calcarisporium*, *Sporothrix*, *Simplicillium*.

23 aislamientos de microorganismos asociados a pústulas de roya: *Lecanicillium* spp. (7), *Calcarisporium* sp. (4), *Sporothrix* sp. (4) y *Simplicillium* spp. (8). Todos los aislamientos evaluados mostraron micoparasitismo en las uredosporas de roya; sin embargo, 120 h después de la inoculación, los mayores porcentajes ($P=0.05$) se obtuvieron con *Simplicillium* sp. (89%) y *Lecanicillium* sp. (68%).

Palabras clave: *Lecanicillium*, *Calcarisporium*, *Sporothrix*, *Simplicillium*.

La roya del café es causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, un patógeno biotrófico que afecta hojas de *Coffea* y se considera la enfermedad más importante en el cultivo a nivel mundial. Este hongo causa defoliación y reduce el rendimiento de los cafetos (Avelino *et al.*, 2015). La severidad de las recientes epidemias de la roya en Centroamérica y México ha ocasionado pérdidas del 40 al 50% en el rendimiento del cultivo (Cressey, 2013). De acuerdo a la Organización Internacional del Café (OIC, 2015), los factores económicos (descapitalización de productores) y agronómicos (falta de manejo del cultivo) han contribuido a alcanzar dichas pérdidas.

En respuesta a la crisis cafetalera debida a la roya de café, en Centroamérica se implementaron acciones a corto plazo; sin embargo, las principales estrategias para su manejo se enfocan especialmente hacia el control químico y el uso de variedades resistentes (Zambolim *et al.*, 1997; Avelino *et al.*, 2015 y Escamilla, 2016).

El control químico se considera poco promisorio para la cafecultura mexicana, por tratarse de un cultivo de importancia social, además de considerar el sector de productores orgánicos. El control biológico representa una alternativa, potenciando el uso de microorganismos que provengan del mismo ambiente de acción del fitopatógeno.

Coffee Leaf Rust is caused by the fungus *Hemileia vastatrix*, a biotrophic pathogen that affects *Coffea* leaves, and is considered the most important disease on this crop worldwide. This fungus causes defoliation and reduces the yields of the coffee plants (Avelino *et al.*, 2015). The severity of the recent rust epidemics in Central America and Mexico has caused losses of 40 to 50% in the yield of the crop (Cressey, 2013). According to the International Coffee Organization (ICO, 2015), economic factors (decapitalization of farmers) and agronomic factors (lack of management of the crop) have contributed to reach these losses.

In response to the coffee crisis caused by Coffee Leaf Rust, short-term actions were implemented in Central America; however, the main strategies for their management focus particularly on chemical control and the use of resistant varieties (Zambolim *et al.*, 1997; Avelino *et al.*, 2015 and Escamilla, 2016).

Chemical control is considered scarcely promissory for Mexican coffee growing activities, since it is a socially important crop, as well as considering the organic farming sector. Biological control is an alternative, boosting the use of microorganisms that come from the same action environment as the plant pathogen.

Within the strategies for the biological control of plant pathogens, one of the options is the use of mycoparasites, fungi that are able to survive at the expense of another fungus (Boosalis, 1964), affecting the reproductive structures of the pathogen, which limits its development and spreading (Barros *et al.*, 1999).

Different mycoparasites have been reported on plant pathogens, including *Trichoderma* sp. and *Penicillium vermiculatum* on *Rhizoctonia solanii* (Rolz *et al.*, 2013); *Calcarisporium parasiticum*, as well as *Physalospora* spp., and *Trichoderma* spp. only *Armilaria mellea* (Boosalis, 1964) and other

Dentro de las estrategias de control biológico de los fitopatógenos, una de las opciones es el uso de micoparásitos, hongos que tienen la capacidad de sobrevivir a expensas de otro hongo (Boosalis, 1964) afectando las estructuras reproductivas del patógeno, lo cual limita su desarrollo y diseminación (Barros *et al.*, 1999).

Diferentes micoparásitos han sido reportados sobre fitopatógenos, entre ellos, *Trichoderma* sp. y *Penicillium vermiculatum* sobre *Rhizoctonia solani* (Rolz *et al.*, 2013); *Calcarisporium parasiticum*, así como *Physalospora* spp., y *Trichoderma* spp. sobre *Armilaria mellea* (Boosalis, 1964) y otros hongos como *Sclerotinia* spp. (Hoyos *et al.*, 2008), *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici* y *Pythium aphanidermatum*, sobre *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. (Sandoval y López, 2001). Dentro del grupo de las royas, las principales relaciones micoparasíticas reportadas son: *Cladosporium tenuissimum* sobre *Uromyces appendiculatus* (Assante *et al.*, 2004); *Cladosporium uredinicola* sobre *Puccinia puta* (Barros *et al.*, 1999); *Simplicillium lanosoniveum* afectando a *Phakopsora pachyrizi* (Gauthier *et al.*, 2014) y *Verticillium lecanii* en *Puccinia recóndita* (Spencer y Atkey, 1981).

Dada la importancia de la enfermedad de la roya de café, se han realizado diferentes estudios para determinar las especies con micoparasitismo asociados a *H. vastatrix* (Carrión, 1988; Carrión y Rico, 2002; Mahfud *et al.*, 2006; Rolz, 2013 y Haddad *et al.*, 2014); sin embargo, la mayoría de ellos sólo registró la presencia de micoparásitos de la roya del café y no su potencial como posibles agentes de control biológico de la enfermedad. Con base en los antecedentes descritos, en el presente trabajo se plantearon los objetivos de aislar e identificar micoparásitos de pústulas de *H. vastatrix*, así como evaluar su potencial de control de la enfermedad *in vitro*.

fungi such as *Sclerotinia* spp. (Hoyos *et al.*, 2008), *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora nicotianae*, *P. capsici* and *Pythium aphanidermatum*, on *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. (Sandoval and López, 2001). Within the group of rusts, the main mycoparasitic relations reported are: *Cladosporium tenuissimum* on *Uromyces appendiculatus* (Assante *et al.*, 2004); *Cladosporium uredinicola* on *Puccinia puta* (Barros *et al.*, 1999); *Simplicillium lanosoniveum* affecting *Phakopsora pachyrizi* (Gauthier *et al.*, 2014) y *Verticillium lecanii* en *Puccinia recóndita* (Spencer and Atkey, 1981).

Given the importance of the Coffee Leaf Rust disease, different Studies have been carried out to determine the species with mycoparasitism related to *H. vastatrix* (Carrión, 1988; Carrión and Rico, 2002; Mahfud *et al.*, 2006; Rolz, 2013 and Haddad *et al.*, 2014); however, most of them only recorded the presence of mycoparasites of Coffee Leaf Rust and not their potential as possible agents of biological control of the disease.

Based on these precedents, the aim of this investigation is to isolate and identify mycoparasites of *H. vastatrix* pustules, as well as to evaluate their potential to control the disease *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Collection sites. In an altitudinal profile in the state of Veracruz, three coffee-growing locations were chosen: Matlaluca, in the municipal area of Zentla (at an altitude of 650 masl, an average annual temperature of 22°C and 1300 mm of yearly rainfall); El Ocote (at an altitude of 1030 masl, an average annual temperature of 19.8°C and 1682 mm of yearly rainfall) and Tlavictépan (1250 masl, an average annual temperature of 17.2°C and 1967 mm of yearly rainfall), in the municipal area of (Table 1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de colecta. En un perfil altitudinal en el estado de Veracruz, se seleccionaron tres localidades productoras de café: Matlaluca, del municipio de Zentla (con altitud de 650 msnm, temperatura media anual de 22 °C y 1300 mm de precipitación anual); El Ocote (con altitud de 1030 msnm, temperatura media anual de 19.8 °C y 1682 mm de precipitación anual) y Tlavipectepan (1250 msnm, temperatura media anual de 17.2 °C y 1967 mm de precipitación anual), del municipio de Huatusco (Cuadro 1).

Muestreo de material vegetativo. En cada localidad se recorrieron cinco parcelas de una hectárea, en cada una se realizaron muestreos dirigidos a plantas con síntomas de roya y con signos de posibles micoparásitos en las pústulas. El periodo de colecta fue de diciembre de 2014 a enero de 2015 y en cada parcela se colectaron 40 hojas

Sampling of plant material. In each location, five plots, each with a surface area of one hectare, samples were taken of plants with symptoms of rust and with signs of possible mycoparasites in the pustules. The collection period was between December 2014 and January 2015, and in each plot, 40 leaves were taken from different coffee plants. The leaves were wrapped in sterile paper towels and placed inside properly labeled plastic bags. They were transferred to the Fungus Biodiversity and Systematics of the Environment Institute, A. C. Lab for their preparation and analysis.

Isolation of mycoparasites. In the lab, six rust pustules were taken from each leaf, with signs of possible mycoparasites. Under a stereoscopic microscope (Leica® Heerbrug, Suiza), and with the aid of a hypodermic needle, portions of fungal mycelia related to rust pustules were taken and placed in Petri dishes with oat agar culture medium with an antibiotic (Cloranfenicol® Toluca, México)

Cuadro 1. Descripción de los sitios de colecta de micoparásitos de roya del café.
Table 1. Description of the sites of collection of mycoparasites of the Coffee Leaf Rust.

| Localidad | Coordenadas | Altitud (msnm) | Temperatura media anual (°C) | Precipitación media anual (mm) | Sistema de producción | Variedad |
|---------------|--------------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Matlaluca | 19°07'56''
96°46'30'' | 650 | 22 | 1300 | Policultivo Tradicional | Typica, Bourbon |
| El Ocote | 19°07'56''
96°53'30'' | 1030 | 19.8 | 1682 | Policultivo comercial | Costa Rica, Colombia, Typica |
| Tlavipectepan | 19°09'40''
96°56'34'' | 1250 | 17.2 | 1967 | Policultivo comercial | Costa Rica, Colombia, Typica |

Nota. Según la clasificación de Nolasco y Toledo (1996), se define como sistema de Policultivo comercial al que utiliza diferentes combinaciones de árboles del bosque y frutales introducidas, incluyendo control de arvenses y poda selectiva de cafetos y sin manejo fitosanitario, mientras que el Policultivo comercial utiliza especies comerciales de sombra, realizando labores generales y particulares en los cultivos / Note. According to the classification by Nolasco and Toledo (1996), a commercial polyculture system is one which used different combinations of introduced forest and fruit trees, including weed control and the selective trimming of coffee plants and without phytosanitary management, whereas commercial polyculture uses commercial shade species, carrying out general and particular tasks in the crops.

Fuente: Servicio Meteorológico Nacional, 2000 / Source: Servicio Meteorológico Nacional, 2000.

en diferentes cafetos. Las hojas se envolvieron con papel absorbente estéril y se colocaron dentro de bolsas plásticas debidamente etiquetadas. Se trasladaron al laboratorio de Biodiversidad y Sistemática de Hongos del Instituto de Ecología, A. C. para su preparación y análisis.

Aislamiento de micoparásitos. En laboratorio, de cada hoja colectada se seleccionaron seis pústulas de roya con presencia de signos de posibles micoparásitos. Bajo un microscopio estereoscópico (Leica® Heerbrug, Suiza) y con la ayuda de una aguja hipodérmica se tomaron porciones de micelio de los hongos asociados a las pústulas de roya y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo agar avena con antibiótico (Cloranfenicol® Toluca, México) al 1%. Los cultivos se mantuvieron a $24\pm 1^\circ\text{C}$ por diez días y se purificaron por punta de hifa.

Identificación taxonómica. La caracterización morfológica de los aislamientos puros se realizó mediante la elaboración de preparaciones temporales y permanentes de los aislamientos, y su posterior observación en un microscopio compuesto (Leica, DM550®, Heerbrug, Suiza) y el software Leica Application Suite Educational Zoom (LAS EZ) versión 3.0. La identificación a género consideró la presencia y dimensiones de fialides y conidios ($n=30$), y se describieron con ayuda de las claves taxonómicas especializadas: Barranco (2004), Barnet and Lilly (1958), Domsch *et al.*, (1980), Hirose *et al.*, (2011), Hoog (1974), Zare *et al.* (2000), Zare y Gams, 2001.

Evaluación del potencial micoparasítico de microorganismos aislados. Tres aislamientos (*Lecanicillium* sp.-TlaP4, *Simplicillium* sp.-MaP2 y *Calcarisporium* sp.-Ocp2) se seleccionaron para evaluar su potencial como microorganismo micoparásito de

at 1%. The cultures were kept at $24\pm 1^\circ\text{C}$ for ten days and purified by hyphal tip isolation.

Taxonomic identification. The morphometric characterization of the pure isolations was carried out with the production of temporary and permanent preparations of the isolations, followed by their observation under a compound microscope (Leica, DM550®, Heerbrug, Switzerland) and the software Leica Application Suite Educational Zoom (LAS EZ) version 3.0. The genus identification considered the presence and dimensions of phialides and conidia ($n=30$), and they were described with the aid of specialized taxonomic keys: Barranco (2004), Barnet and Lilly (1958), Domsch *et al.*, (1980), Hirose *et al.*, (2011), Hoog (1974), Zare *et al.* (2000), Zare and Gams, 2001.

Evaluation of the mycoparasitic potential of isolated microorganisms. Three isolations (*Lecanicillium* sp.-TlaP4, *Simplicillium* sp.-MaP2 and *Calcarisporium* sp.-Ocp2) were selected for the evaluation of their potential as *H. vastatrix* mycoparasitic microorganisms; the criterion for selection was the growth rate of the isolations. The isolations were incubated in Potato Dextrose Agar (PDA) for 10 days, followed by the production of a spore suspension at a concentration of 5×10^6 spores ml^{-1} ; each suspension was added an aliquot of Tween 20® at 0.01%.

The test *in vitro* to evaluate the mycoparasitism was carried out according to the methodology proposed by Eskes *et al.* (1991), with adaptations. Leaves of *Coffea arabica* plants of the bourbon variety, with symptoms of Coffee Leaf Rust, were taken in the field and kept in polypaper bags for their analysis in the lab. Under a stereoscopic microscope, pustules were analyzed to select only those that presented no mycoparasitic microorganisms. Five leaf disks, each 1.5 cm in diameter, with the

H. vastatrix; el criterio de selección fue la tasa de crecimiento de los aislamientos. Los aislamientos se incubaron en Papa Dextrosa Agar (PDA) por 10 días, posteriormente se realizó una suspensión de esporas a una concentración de 5×10^6 esporas ml^{-1} , a cada suspensión se le adicionó una alícuota de Tween 20® al 0.01%.

La prueba *in vitro* para evaluar el micoparasitismo se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Eskes *et al.* (1991), con adaptaciones. Hojas de *Coffea arabica* de la variedad bourbón con síntomas y signos de roya anaranjada, se colectaron en campo y se conservaron en bolsas de polipapel para su análisis en laboratorio. Bajo microscopio estereoscópico se analizaron las pústulas para seleccionar sólo aquellas que no presentaron microorganismos micoparásitos. Cinco discos foliares de 1.5 cm de diámetro, con la presencia de al menos una pústula de roya, se colocaron en una placa Petri con agar agua; cada disco se consideró como una repetición de cinco. Se asperjó 1 ml de la suspensión de esporas previamente preparada con cada una de las cepas y al grupo testigo se le asperjó agua destilada estéril. Los tratamientos fueron establecidos bajo un diseño completamente al azar y se mantuvieron a fotoperiodos de 12 h luz y 12 h oscuridad, a 24 °C.

Para determinar el porcentaje de micoparasitismo en las pústulas de roya, de cada disco foliar se realizó un raspado de las lesiones esporulantes y se suspendió en 1 ml de agua destilada adicionándole 100 μl de Tween 80 al 0.01%. De la dilución obtenida se tomaron 100 μl y se observaron bajo microscopio para contabilizar el número de uredosporas parasitadas y no parasitadas en la muestra. Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas por un periodo de cinco días.

Análisis estadístico. El porcentaje de parasitismo en las uredosporas evaluadas cada 24 horas

presence of at least one rust pustule, were placed in a Petri dish with agar water; each leaf disk was considered as a repetition of five. We sprayed 1 ml of the spore suspension previously prepared with each one of the strains, and the control group was sprayed with sterile distilled water. The treatments were established under a totally random design and kept under light periods of 12 h and 12 h of darkness, at 24 °C.

To determine the percentage of mycoparasitism in rust pustules, in each leaf disk, the sporulating lesions were scraped and suspended in 1 ml of distilled water, adding 100 μl of Tween 80 at 0.01%. From the dilution obtained, 100 μl were taken and observed under the microscope to count the number of parasited and non-parasited uredospores in the sample. The evaluations were carried out every 24 hours for a period of 5 days.

Statistical analysis. The percentage of parasitism in the uredospores evaluated every 24 hours was analyzed with an analysis of variance and a Tukey average separation test, with the aid of the program Statistica version 6.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of mycoparasites. A total of 23 mycoparasite isolations were obtained from the different sampling sites. The highest number (10) was obtained from the middle altitude zone (El Ocote, 1030 masl), and the lowest number (6), from the low altitude zone with a higher temperature and rainfall than the other sampling sites (Zentla, 650 masl). Considering that weather conditions are factors that determine the development of fungi, our results differ from those reported by Martins *et al.*, (2015), who report a greater incidence of mycoparasites on *H. vastatrix* in the dry season

se analizaron a través de un análisis de varianza y una prueba de separación de medias de Tukey con ayuda del programa Statistica versión 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de micoparásitos. Se obtuvieron un total de 23 aislamientos de micoparásitos de los diferentes sitios de muestreo. El mayor número (10) se obtuvo de la zona altitudinal media (El Ocote, 1030 msnm), y el menor número (6) de la zona altitudinal baja con mayor temperatura y precipitación respecto a los otros sitios de muestreo (Zentla, 650 msnm), considerando que las condiciones climáticas son factores que determinan el desarrollo de los hongos, los resultados difieren de lo reportado por Martins *et al.*, (2015), que reporta mayor incidencia de micoparásitos sobre *H. vastatrix* en la estación seca del año, quien también sugiere que el micoparásito *Lecanicillium lecanii* podría ser más persistente a bajas temperaturas. Esto también difiere de lo reportado por Bagyaraj *et al.*, (2015) que encontró mayor población de bacterias y hongos en sistemas de rusticanos, por lo que en este caso se reporta mayor diversidad en condiciones de policultivo comercial donde la sombra es menos diversa que en el sitio de zona baja.

Se identificaron cuatro géneros de hongos: *Calcarisporium* sp. (4), *Lecanicillium* spp. (7), *Simplicillium* spp. (8), *Sporothrix* sp. (4), siendo los más abundantes *Simplicillium* spp. y *Lecanicillium* spp.

Descripción microscópica de los géneros.

***Lecanicillium* spp.** Presentó hifas septadas, hialinas; con fialides (15-23 x 0.5-1.2 µm) ordenadas en grupos de tres a cinco por verticilo (Zare y Gams, 2001), y no en pares o solitarias como lo señaló Cañedo y Ames (2004), además fueron ligeramente

of the year, and also suggest that the mycoparasite *Lecanicillium lecanii* could be more persistent at lower temperatures. This is also different to reports by Bagyaraj *et al.*, (2015) who found a greater bacteria and fungus populations in rustican systems, and therefore, in this case, there are reports of a higher diversity in conditions of commercial polyculture, where shade is less diverse than in the lower zone site.

Four fungal genera were identified: *Calcarisporium* sp. (4), *Lecanicillium* spp. (7), *Simplicillium* spp. (8), *Sporothrix* sp. (4), with *Simplicillium* spp. and *Lecanicillium* spp. being the most abundant.

Microscopic description of the genera.

***Lecanicillium* spp.** Presented septated hyphae, hyalines; with con phialides (15-23 x 0.5-1.2 µm) ordered in groups of three to five per whorl (Zare and Gams, 2001), and not in pairs or individually, as pointed out by Cañedo and Ames (2004); they were also slightly wider at the base. The conidia were elliptical (5-7x1-2 µm) and emerging in the top of the phialide (Figure 1 A); they were generally observed in conidial heads (Barranco, 2004).

***Calcarisporium* sp.** Presented hyaline and septated hyphae, which hold short conidiphora (Figure 1 B), and on them, verticillated phialides measuring 4-6 x 1-2 µm. A characteristic that distinguishes this genus is the shape of the phialides, which appeared wider in the base and end in small denticles on the apex (Hirose *et al.*, 2011). The simple phialides are formed directly from the hypha (Barnet, 1958). The conidia are ovoidal and measure 3-5x1.3-1.8 µm.

***Simplicillium* spp.** Presented hialine, this and septated hyphae; the conidiophora (15-35x0.8-1µm) emerge in ones (Zare *et al.*, 2000), perpendicular to the hyphae and become thinner

más anchas en la base. Los conidios fueron elípticos (de 5-7x1-2 μm) y emergiendo en el extremo superior de la fiálide (Figura 1 A); generalmente se observaron en cabezuelas (Barranco, 2004).

***Calcarisporium* sp.** Presentó hifas hialinas y septadas, las cuales sostienen conidióforos cortos (Figura 1 B) y sobre ellos, fiálides verticiladas que miden 4-6 x 1-2 μm . Una característica que distingue a este género es la forma de las fiálides, las cuales se observaron anchas en la base y terminan en pequeños denticulos en el ápice (Hirose *et al.*, 2011).

towards the tip (Molina *et al.*, 2012). Hyphae are generally interlaced (Figure 1 C). The conidia (1-3 μm) were circular and sometimes elliptical, with an abundant sporulation and an arrangement in mucoidal heads (Domsch *et al.*, 1980).

***Sporothrix* sp.** Presented hyalin vegetative hyphae, with short septa and denticles (Figure 1 D); no conidiophora were observed after 10 days; the conidia were observed on the denticles of the hyphae (Hoog, 1974); there was an abundant sporulation in the Agar-Oat medium.

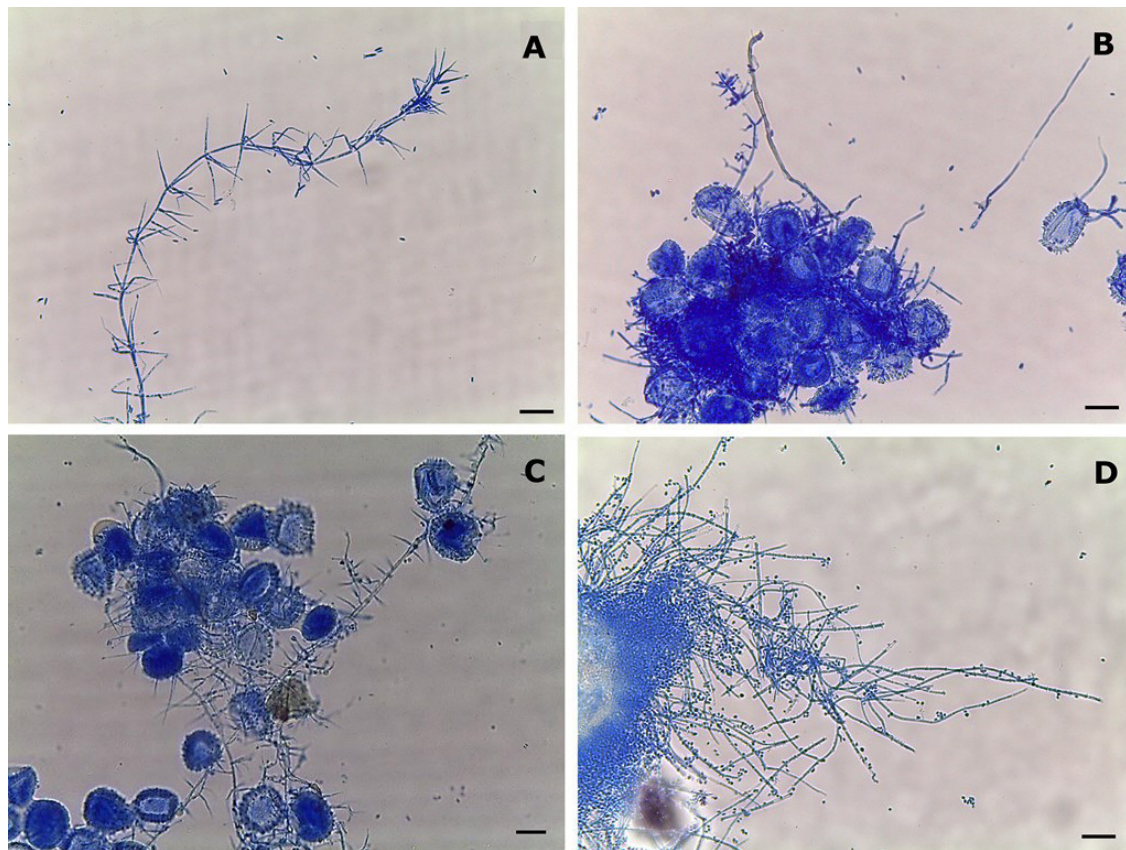


Figura 1. Micoparásitos encontrados en pústulas de Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix*) y sus características morfológicas en Avena-Agar. Dónde: *Lecanicillium* sp. (A-40X); *Calcarisporium* sp. (B-40X); *Simplicillium* sp. (C-40X) y *Sporothrix* sp. (D-40X). Barra: 10 μm .

Figure 1. Mycoparasites found in Coffee Leaf Rust pustules (*Hemileia vastatrix*) and their morphological characteristics in Oat-Agar. Where: *Lecanicillium* sp. (A-40X); *Calcarisporium* sp. (B-40X); *Simplicillium* sp. (C-40X) and *Sporothrix* sp. (D-40X). Bar: 10 μm .

Las fiálides simples se forman directamente de la hifa (Barnet, 1958). Los conidios son ovoides con medidas de 3-5x1.3-1.8 µm.

***Simplicillium* spp.** Presentó hifas hialinas, delgadas y septadas; los conidioforos (15-35x0.8-1µm) emergiendo solitarios (Zare *et al.*, 2000) en forma perpendicular a las hifas y adelgazan hacia la punta (Molina *et al.*, 2012). Las hifas generalmente se observaron entrelazadas (Figura 1 C). Los conidios (1-3 µm) fueron circulares y en ocasiones elípticos, con esporulación abundante y disposición en cabezas mucoides (Domsch *et al.*, 1980).

***Sporothrix* sp.** Presentó hifas vegetativas hialinas, con septos cortos y denticulos (Figura 1 D); no se observaron conidióforos a los 10 días, los conidios se observaron sobre los denticulos de las hifas (Hoog, 1974); se observó abundante esporulación en medio Agar-Avena.

Micoparasitismo *in vitro* sobre *H. vastatrix*. Cuarenta y ocho horas posteriores a la inoculación de tratamientos, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas (P=0.05) entre tratamientos (Cuadro 2). Los mayores porcentajes de micoparasitismo observados durante las primeras 72 horas corresponden

Mycoparasitism *in vitro* on *H. vastatrix*. Forty-eight hours after the inoculation of treatments, significant statistical differences (P=0.05) were obtained between treatments (Table 2). The highest percentages of mycoparasitism observed in the first 72 hours were found in isolations of *Simplicillium* sp., and *Calcarisporium* sp., whereas 96 and 120 h after inoculation, the highest percentages were found in *Simplicillium* sp. and *Lecanicillium* sp. (Table 2).

The genus *Simplicillium* is reported as part of the fungi related to Coffee Leaf Rust in Puerto Rico and Mexico (James *et al.*, 2016). The species of this genus have been registered mainly in relation with *H. vastatrix* (Zare and Gams, 2001), while its potential as a biological control agent of other diseases has had little studies. It has been recorded in association with pathogenic fungi in plants, such as *Alternaria brassicicola*, *Sclerotium rolfisii* and *Rhizoctonia solani* (Shyang *et al.*, 2017), as well as with nematodes (Gams and Zare, 2003) and aphids (Shyang *et al.*, 2017).

The genus *Lecanicillium* has been widely studied, and documented as a biological control agent for mildews and uredinales (Alavo, 2015). Mahfund *et al.* (2006) point out that the effects of two species of this genus can vary between

Cuadro 2. Evaluación del porcentaje de parasitismo de tres microorganismos sobre pústulas de roya de café (*Hemileia vastatrix*) en condiciones *in vitro*.
Table 2. Evaluation of the percentage of parasitismo of three microorganisms on Coffee Leaf Rust pustules (*Hemileia vastatrix*) in *in vitro* conditions.

| Tratamiento | Horas después de la inoculación | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
| Testigo | 0.00±0a | 0.00±b | 0.00±c | 0.00±c | 0.00±0c |
| <i>Calcarisporium</i> sp. | 0.00±0a | 20.87±13ab | 41.02±13ab | 50.12±0.7b | 51.60±10b |
| <i>Lecanicillium</i> sp. | 2.68±2 a | 9.85±6b | 17.49±16bc | 49.19±13b | 68.10±12b |
| <i>Simplicillium</i> sp. | 0.89±2 a | 42.73±9a ^z | 51.19±16a ^z | 83.48±3a ^z | 88.86±11a ^z |

^a=Medias ±Desviación estándar, los valores con la misma letra en las columnas no difieren estadísticamente (Tukey p=0.05) / ^z=Means ±Standard deviation, values with the same letter in the columns do not differ statistically (Tukey p=0.05)

a los aislamientos de *Simplicillium* sp., y *Calcarisporium* sp., mientras que a las 96 y 120 h posteriores a la inoculación, los mayores porcentajes correspondieron a *Simplicillium* sp. y *Lecanicillium* sp. (Cuadro 2).

El género *Simplicillium* se reporta como parte de los hongos asociados a roya del café en Puerto Rico y México (James *et al.*, 2016). Las especies de este género han sido registradas principalmente en asociación con *H. vastatrix* (Zare y Gams, 2001), mientras que su potencial como agente de control biológico de otras enfermedades ha sido poco estudiado. Ha sido registrado en asociación con hongos fitopatógenos como *Alternaria brassicicola*, *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Shyang *et al.*, 2017), también con nematodos (Gams y Zare, 2003) y áfidos (Shyang *et al.*, 2017).

El género *Lecanicillium* ha sido ampliamente estudiado, documentándose como agente de control biológico de mildius y uredinales (Alavo, 2015). Mahfund *et al.* (2006) señala que los efectos de dos especies de este género pueden actuar desde la decoloración de uredosporas, formación de micelio blanco sobre ellas o necrosamiento, dependiendo del tiempo de aplicación. Esto sugiere que el porcentaje de parasitismo de *Lecanicillium* sp., varía entre especies y aislamientos (Arriola *et al.*, 1998).

Finalmente, en estudios previos se ha señalado el parasitismo de *Calcarisporium* sp., sobre roya del cafeto de manera natural (Carrión y Rico, 2002).

CONCLUSIONES

Los géneros *Lecanicillium* sp., *Calcarisporium* sp., *Sporothrix* sp. y *Simplicillium* sp. fueron aislados de pústulas de roya de cafeto en los municipios de Huatusco y Zentla, en el estado de Veracruz, México.

the decoloring of uredospores, the formation of white mycellia on them, or necrosis, depending on the time of application. This suggests that the percentage of parasitism of *Lecanicillium* sp. varies between species and isolations (Arriola *et al.*, 1998).

Finally, previous studies have pointed out the natural parasitism of *Calcarisporium* sp. on Coffee Leaf Rust (Carrión and Rico, 2002).

CONCLUSIONS

The genera *Lecanicillium* sp., *Calcarisporium* sp., *Sporothrix* sp. and *Simplicillium* sp. were isolated from rust pustules in the municipal areas of Huatusco and Zentla, in the estate of Veracruz, Mexico.

The highest percentages of mycoparasitism in the *in vitro* tests were obtained with the strains of *Simplicillium* sp. (88.86%) and *Lecanicillium* sp. (68.10%), 120 hours after inoculation.

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

Los mayores porcentajes de micoparasitismo en las pruebas *in vitro* se obtuvieron con las cepas de *Simplicillium* sp. (88.86%) y *Lecanicillium* sp. (68.10%), a las 120 horas posteriores a la inoculación.

## LITERATURA CITADA

- Alavo BC. 2015. The insect pathogenic fungus *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas and its use for pests control: A review. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 3:337-345. [http://dx.doi.org/10.18006/2015.3\(4\).337.345](http://dx.doi.org/10.18006/2015.3(4).337.345)
- Arriola MC, Chet I and Rölz C. 1998. Hongos que atacan la roya del café: Un breve comentario. *Universidad Del Valle de Guatemala* 8:2-6. Disponible en línea: <http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/revista8.pdf>



- Assante G, Maffi D, Sarachi M, Farina G, Morica S and Raggi A. 2004. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. *Mycology* 108:170-182. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008852>
- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderac P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The coffee rust crisis in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Barnett HL and Lilly VG. 1958. Parasitism of *Calcarisporium parasiticum* on species of *Physalospora* and related fungi. *Boletín* 420T. West Virginia University Agricultural Experiment Station. 1-37 pp. Disponible en línea: [https://ia902300.us.archive.org/13/items/parasitismofcalc420barn/parasitismofcalc420barn\\_bw.pdf](https://ia902300.us.archive.org/13/items/parasitismofcalc420barn/parasitismofcalc420barn_bw.pdf)
- Barranco, FJE. 2004. Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* cultivado en medio sólido. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México, D.F.
- Barros ST, Oliveira TN, Bastos T G and Maia CL. 1999. Hyperparasitism of *Cladosporium uredinicola* over *Puccinia putana* on the host *Ipomoea fistulosa*. *Mycologist* 13:23-24. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(99\)80071-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(99)80071-8)
- Bagyaraj JD, Thilagar J, Ravisha C, Kashalapa GC, Krishnamurthy NK and Vaast P. 2015. Below ground microbial diversity as influenced by coffee agroforestry systems in the Western Ghats, India. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 202:198-202. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.01.015>
- Boosalis MG. 1964. Hyperparasitism. *Annual Review of Phytopathology* 2:363-376. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.02.090164.002051>
- Carrión G and Rico-Gray V. 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11:49-60. Disponible en línea: [http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD\\_11\\_49-60.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_11_49-60.pdf)
- Carrión G. 1988. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en México. *Micología Neotropical* 1:79-86.
- Cressey D. 2013. Coffee rust regains foothold: researchers marshal technology in bid to thwart fungal outbreak in Central America. *Nature* 493 (7434):587. Disponible en línea: <http://www2.tap-ecosur.edu.mx/mip/Plagas/Roya/pdfs/Notas/Coffee%20rust%20regains.pdf>
- Domsch KH, Gams W and Anderson TH. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol. 1. Academic Press. London, UK. 860p.
- Escamilla PE. 2016. Boletín informativo: Políticas públicas. Las variedades de Café en México ante el desafío de la Roya. Inédito. Disponible en línea: [http://pmcarbono.org/pmc/descargas/proyectos/redd/Breves\\_de\\_Políticas\\_Públicas\\_No.4-Varietades\\_de\\_café\\_en\\_México.pdf](http://pmcarbono.org/pmc/descargas/proyectos/redd/Breves_de_Políticas_Públicas_No.4-Varietades_de_café_en_México.pdf)
- Eskes AB, Mendes MD and Robbs CF. 1991. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Café-Cacao-Thé*, 35:275-282.
- Gauthuier WN, Maruthachalam K, Subbarao VK, Brown M, Xiao Y, Robertson L and Schneider WR. 2014. Mycoparasitism of *Phakospora pachyrizi*, the soybean rust pathogen, by *Simplicillium lanosoniveum*. *Biological Control* 76:87-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.05.008>
- Gams W and Zare R. 2003. A taxonomic review of the clavicipitaceous anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. 17-73. In: *Clavicipitalean Fungi: Evolutionary biology, Chemistry, Biocontrol and Cultural Impacts*. DOI: 10.1201/9780203912706.pt1
- Haddad, F, Saraiva R, Mizubuti E, Romeiro R and Maffia L. 2014. Isolation and selection of *Hemileia vastatrix* antagonists. *European Journal of Plant Pathology* 139:763-772. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-014-0430-9>
- Hirose D, Dewaga Y and Inaba S. 2012. The anamorphic genus *Calcarisporiella* is a new member of the Mucoromycotina. *Mycoscience* 53:256-260. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0160-1>
- Hoog GS. 1974. The genera *Blatobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* Gen. Nov. *Studies in Mycology* 7:70-73.
- Hoyos L, Duque G y Orduz S. 2008. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp., y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2: 76-86. <https://doi.org/10.17584/rcch.2008v2i1.1175>
- James T, Marino J, Perfecto I and Vandermeer J. 2016. Identification of putative coffee rust micoparasites via single-molecule DNA sequencing of infected pustules. *Applied and Environmental Microbiology* 83: 631-639. DOI: 10.1128/AEM.02639-15
- Mahfund MC, Mior AZ, Meon S and Kadir J. 2006. *In Vitro* and *in Vivo* Tests for Parasitism of *Verticillium psalliotae* Treschow on *Hemileia vastatrix* Berk and Br. *Malaysian Journal of Microbiology*. 2:46-50. Disponible en línea en: <http://www.myjournal.my/public/article-view.php?id=10291>
- Martins JS, Soares CA, Medeiros VH, Santos CV, Pozza EV. 2015. Contribution of host and environmental factors to the Hyperparasitism of coffee rust under field conditions. *Australasian Plant Pathology* 44:605-610. <https://doi.org/10.1007/s13313-015-0375-2>
- Moguel P y Toledo V. 1996. El café en México, ecología, cultura y sustentabilidad. *Ciencias* 43:40-51.
- Molina RE, Morales RR, Valenzuela FE, y Vives GI. 2012. Caracterización morfológica de *Acremonium* sp. asociado a *Neonectria fuckeliana* en *Pinus radiata* en Chile. *Boletín de Micología* 27: 32-38. <http://dx.doi.org/10.22370/bolmicol.2012.27.2.883>
- OIC. 2015. Informe sobre el brote de la roya del café en Centroamérica y Plan de acción para combatirla. Organización Internacional del Café. Disponible en línea: <http://www.ico.org>
- Rolz AC, De León LR y Paniagua O. 2013. Evidencia de un antagonismo *in vitro* de especies de *Trichoderma* contra *Hemileia vastatrix* (roya del café). Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones. Universidad del Valle de Guatemala. *Revista* 25 de la Universidad del Valle de Guatemala. Disponible en línea: [http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero25/8\\_evidencia%20de%20un.pdf](http://uvg.edu.gt/publicaciones/revista/volumenes/numero25/8_evidencia%20de%20un.pdf)



- Sandoval S y López OM. 2001. Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viridae* y *T. pseudokoningii* sobre diferentes hongos fitopatógenos. Revista de Fitosanidad, 5:41-44. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Playa, Ciudad La Habana, Cuba. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209118258010>
- Servicio Meteorológico Nacional. (2000). Normales climatológicas. Disponible en línea: <http://smn.cna.gob.mx>
- Schieber E. 1972. Economic impact of coffee rust in Latin America. Annual Review of Phytopathology 10:491-510. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.002423>
- Shyang CR, Huang CC, Li CJ and Tsay GJ. 2017. Evaluation of characteristics of *Simplicillium lanosoniveum* on pathogenicity to aphids and *in vitro* antifungal potency against plant pathogenic fungi. International Journal of Environmental & Agriculture Research 3:55-61. Disponible en línea: <http://www.ijoeear.com/Paper-January-2017/IJOEAR-JAN-2017-7.pdf>
- Spencer DM and Atkey PT. 1981. Parasitic effects of *Verticillium lecanii* on two Rust fungi. Transactions of the British Mycological Society. 77:535-542. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(81\)80101-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80101-5)
- Zambolim L, Vale FXR, Pereira A e Chaves G. 1997. Café (*Coffea arabica* L.), Controle de Doenças. In: Vale FXR, Zambolim L. (eds.). Controle de Doenças de Plantas: Grandes Culturas, vol. 1. Suprema Gráfica e Editora, Visconde do Rio Branco, Brasil. 83-40 pp.
- Zare R and Gams W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. Nov. Nova Hedwigia 73:1-50. DOI: 10.1127/nova.hedwigia/71/2001/1
- Zare R, Gams W and Culham A. 2000. A revision of *Verticillium* sect. *Prostata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. Nova Hedwigia 71:465-480. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023073040>
- Zare R, Gams W and Culham A. 2000. A revision of *Verticillium* sect. *Prostata* I. Phylogenetic studies using ITS sequences. Nova Hedwigia 71:465-480. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023073040>

# Morphological and molecular identification of *Mortierella* species associated to rhizosphere of apple trees with symptoms of root diseases

## Identificación morfológica y molecular de especies de *Mortierella* asociados a rizosfera de manzanos con síntomas de enfermedades radiculares

Yericka Mares-Ponce de León, Laila Nayzzel Muñoz-Castellanos, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas, *Campus* Universitario #2, Circuito Universitario, Chihuahua. CP. 31125, Chihuahua, Chihuahua, México; María Fernanda Ruiz-Cisneros, Daniel Alonso Pérez-Corral, José de Jesús Ornelas-Paz, Carlos Horacio Acosta-Muñiz, David Ignacio Berlanga-Reyes, Claudio Rios-Velasco\*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Campus Cuauhtémoc. Avenida Río Conchos S/N. Parque Industrial, CP. 31570, Cuauhtémoc, Chihuahua, México. \*Autor para correspondencia: claudio.rios@ciad.mx.

Recibido: 09 de Octubre, 2017.

Aceptado: 13 de Diciembre, 2017.

Mares-Ponce de León Y, Muñoz-Castellanos LN, Ruiz-Cisneros MF, Pérez-Corral DA, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Berlanga-Reyes DI, Rios-Velasco C. 2017. Morphological and molecular identification of *Mortierella* species associated to rhizosphere of apple trees with symptoms of root diseases. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 184-195.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1710-2

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2017.

First DOI publication: December 27, 2017.

**Resumen.** Se aislaron especies de *Mortierella* en Agar Dextrosa Papa y agar V8, así como peras maduras y hojas de azalea, como sustratos trampa. Se obtuvieron 419 aislados de *Mortierella*, de muestras de suelo en Chihuahua, México, los cuales se clasificaron en 21 grupos de acuerdo con sus caracteres morfológicos. *Mortierella* se aisló con mayor

**Abstract.** *Mortierella* species were isolated on Potato Dextrose Agar and V8-agar as well as mature pear fruits and azalea leaves as substrate baits. Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were obtained from soil samples in Chihuahua, Mexico which were classified into 21 groups, according to their morphological characters. *Mortierella* was isolated more frequently when pear fruits were used, obtaining 143 isolates (34.1%), followed by the V8-agar-antibiotics medium with 133 isolates (31.7%), and azalea leaves with 95 isolates (22.7%). An isolate from each of the 21 groups was identified molecularly, 12 corresponded to *Mortierella alpina*, one to *M. gamsii*, one to *M. capitata*, and six to *Mortierella* sp., and one belonged to the Mortierelliales order. In addition, the putative pathogenicity of the 21 *Mortierella* isolates identified was tested in G30

frecuencia cuando se emplearon peras, obteniendo 143 aislados (34.1%), seguido del agar V8-antibióticos con 133 aislados (31.7%) y las hojas de azalea, con 95 aislados (22.7%). Se identificó molecularmente un aislado de cada uno de los 21 grupos, 12 correspondieron a *Mortierella alpina*, uno a *M. gamsii*, uno a *M. capitata* y seis a *Mortierella* sp. y uno perteneció al orden Mortierelliales. Adicionalmente se probó la patogenicidad putativa de los 21 aislados de *Mortierella* identificados, en porta injertos de manzana G30 bajo condiciones de invernadero y ninguno fue patogénico. Estas especies no habían sido reportadas previamente en México. El estudio demostró que existen especies de *Mortierella* en la rizosfera de manzanos en Chihuahua, México. Estas podrían producir ácidos grasos poliinsaturados y ejercer efectos elicitors en cultivos hortofrutícolas confiriéndoles resistencia a múltiples patógenos.

**Palabras clave:** Mortierellales, diversidad, sustratos trampa, medio de aislamiento, patogenicidad.

Se estima que solo un 5% de las especies fúngicas existentes han sido registradas y descritas (Hawksworth, 2001). Mortierelliales es uno de los órdenes más abundantes y diversos de los hongos basales y hay cerca de 100 especies descritas en 13 géneros de la familia Mortierellaceae (Yadav *et al.*, 2014), género al cual corresponde el hongo *Mortierella*. La mayoría de las especies de este género producen ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) al convertir el exceso de azúcares y otras fuentes de carbón en lípidos bajo diferentes condiciones de fermentación (Rayaroth *et al.*, 2016). En varios estudios se ha demostrado que algunas especies de *Mortierella* pueden acumular ácidos araquidónico, gamma-linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico en el micelio (Ho *et al.*,

apple rootstocks under greenhouse conditions and none was pathogenic. These species have not been reported previously in Mexico. The study showed that there are *Mortierella* species in the rhizosphere of apple trees in Chihuahua Mexico. These fungal isolates might produce polyunsaturated fatty acids and exert effects of elicitation in horticultural plants and fruit trees improving their resistance to multiple pathogens.

**Key words:** Mortierellales, diversity, substrate baits, isolation medium, pathogenicity.

It has been estimated that only 5% of the existing fungi species have been recorded and described (Hawksworth, 2001). The Mortierellales is one of the most abundant and diverse orders of basal fungi, with nearly 100 species described into 13 genera of the Mortierellaceae family (Yadav *et al.*, 2014), in which the *Mortierella* genus is located. Most of species of this genus are able to produce polyunsaturated fatty acids (PUFAs) by converting excess of sugars and other carbon sources into lipids under different fermentation conditions (Rayaroth *et al.*, 2016). Several studies have shown that some *Mortierella* species are able to accumulate arachidonic,  $\gamma$ -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the mycelium (Ho *et al.*, 2007; Dedyukhina *et al.*, 2014). These compounds are involved in induction of resistance to phytopathogens in plants of agricultural importance (Zlotek and Wojcik, 2014). Additionally, these PUFAs are widely used as food supplements and drugs to improve the immune response in humans, giving technological importance to the *Mortierella* genus as an alternative source of these compounds (Dedyukhina *et al.*, 2014). However, existing information about the diversity of Mortierellales is limited or out of date. The identification of

2007; Dedyukhina *et al.*, 2014). Estos compuestos están involucrados en la inducción de resistencia a fitopatógenos en plantas de importancia agrícola (Zlotek and Wojcik, 2014). Asimismo, estos PUFA son ampliamente utilizados como suplementos alimenticios y fármacos que mejoran la respuesta inmunológica en los seres humanos, lo cual confiere importancia tecnológica al género *Mortierella* como fuente alternativa de dichos compuestos (Dedyukhina *et al.*, 2014). Sin embargo, existe información escasa u obsoleta acerca de la diversidad de los Mortierellales. La identificación de las especies de *Mortierella* se ha basado principalmente en sus caracteres morfológicos (Watanabe, 2010). Además, la identidad de las especies de estos hongos mediante técnicas moleculares ha recibido poca atención, sobre todo en México, donde actualmente existe un gran interés por encontrar microorganismos antagónicos para el control de fitopatógenos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue aislar e identificar especies nativas de *Mortierella* asociadas con manzanos con síntomas aparentes de enfermedades radiculares.

De junio a julio de 2015, se muestrearon tres huertas de manzanos (*Malus x domestica* Borkh. Rosales: Rosaceae) en las cuatro zonas productoras de manzana más importantes: Cuauhtémoc, Guerrero, Bachiniva y Namiquipa, Chihuahua, México (Cuadro 1). Se recolectaron muestras de suelo (500-600 g) de la rizosfera de cinco árboles con síntomas aparentes de enfermedades radiculares causadas por hongos y oomicetos en cada huerto (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Para aislar las cepas de *Mortierella* se utilizaron dos medios de cultivo (Agar Dextrosa Papa y agar V8). Los medios agar-dextrosa-papa (PDA; BD Bioxon) y agar V8 [jugo V8, carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) - agar] contenían antibióticos [oxitetraciclina, 0.01 g/L; rifampicina, 0.03 g/L; pimarcina, 0.01 g/L, y 66.8 µL/L de un formulado fungicida

*Mortierella* species has mainly been based on morphological characters (Watanabe, 2010). Besides, the identity of species of this fungi by molecular techniques has received little attention, especially in México, where currently there is a high interest to find out antagonistic microorganisms to control phytopathogens. Thus, the aim of the study was to isolate and identify native *Mortierella* species associated to apple trees with apparent symptoms of root diseases.

Three apple orchards (*Malus x domestica* Borkh. Rosales: Rosaceae) were sampled from June through July of 2015 in the four most important apple-producing areas: Cuauhtémoc, Guerrero, Bachiniva and Namiquipa, Chihuahua, Mexico (Table 1). Soil samples (500-600 g) were collected from the rhizosphere of five trees with apparent symptoms of root diseases caused by fungi and Oomycetes in each orchard (Ruiz-Cisneros *et al.*, 2017).

Two culture media (Potato Dextrose Agar and V8-agar) were used for the isolation of *Mortierella* strains. The potato-dextrose-agar (PDA; BD Bioxon) and V8-agar [V8 juice, calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) - agar], media contained antibiotics [oxytetracycline, 0.01 g/L; rifampicin, 0.03 g/L; piramicin, 0.01 g/L, and 66.8 µL/L of the fungicidal hymexazol formulated (Summit Agro, México)]. The isolation of *Mortierella* strains on V8-agar was performed with and without pear fruits (*Pyrus communis* L.) and azalea leaves (*Rhododendron simsii* Planch.) as bait substrates. For isolation on PDA and V8-agar without bait substrates, serial dilutions (1:10) were performed in test tubes containing 9 mL of sterile peptone water (0.1% peptone and 0.85% NaCl in distilled water) by adding 1 g of soil previously sieved, to generate 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> dilutions. Aliquots (50 µL) of each suspension were spread in triplicate on 90-mm Petri dishes containing one of the two media,



**Cuadro 1. Localidad donde se recolectaron muestras de suelo rizosférico en huertos de manzana en Chihuahua, México, en 2015.**  
**Table 1. Location of apple orchards where samples of rhizosphere soil were collected in Chihuahua, Mexico, in 2015.**

| Localidad  | Huerto                | Localización geográfica  | Altitud |
|------------|-----------------------|--------------------------|---------|
| Cuauhtémoc | Campo 2A              | N28°26'40"; O106°59'18"  | 2,130   |
|            | Campana 4 ½           | N28°33'49"; O106°54'24"  | 1,995   |
|            | Picacho               | N28°29'28"; O 106°40'08" | 2,020   |
| Guerrero   | Alberto Gameros       | N28°31'58"; O 107°26'57" | 2,096   |
|            | Alberto Gameros PIG30 | N28°31'58"; O 107°26'57" | 2,096   |
|            | Efraín Sandoval       | N28°32'59"; O 107°27'10" | 2,099   |
| Namiquipa  | Carlos Márquez        | N29°11'20"; O 107°25'14" | 1,877   |
|            | San Rafael            | N29°12'19"; O 107°25'22" | 1,858   |
|            | El Terrero            | N29°18'84"; O107°44'21"  | 2,037   |
| Bachiniva  | La Cienega            | N28°46'52"; O 107°15'21" | 2,009   |
|            | Santa Rosa            | N28°50'17"; O 107°14'12" | 1,989   |
|            | Los 40                | N28°48'07"; O 107°16'06" | 1,990   |

con hymexazol (Summit Agro, México]. El aislamiento de cepas de *Mortierella* en agar V8 se llevó a cabo con y sin frutos de pera (*Pyrus communis* L.) y hojas de azalea (*Rhododendron simsii* Planch.) como sustratos trampa. Para el aislamiento en PDA y agar V8 sin sustratos trampa, se prepararon diluciones seriadas (1:10) en tubos de ensayo con 9 mL de agua estéril de peptona (peptona al 0.1% y NaCl al 0.85% en agua destilada), a las que se agregó 1 g de suelo previamente tamizado para generar diluciones de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$ . Utilizando la técnica de difusión, las alícuotas (50  $\mu$ L) de cada suspensión se distribuyeron por triplicado en cajas de Petri de 90 mm que contenían uno de los medios. Posteriormente, las cajas de Petri se incubaron a  $28 \pm 1$  °C por 72 h en una cámara ambiental sin luz (Precision Scientific, Winchester, VA, EUA). Para aislar las cepas de *Mortierella* utilizando frutos de pera como sustrato trampa, se colocaron 200-250 g de suelo húmedo en vasos de plástico de 1 L con tapa que contenían una pera previamente lavada con NaClO al 1.5% por 1 min. Los vasos fueron incubados a  $26 \pm 1$  °C en oscuridad por 72 h. En seguida, los frutos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril

using a diffusion technique. The Petri dishes were subsequently incubated at  $28 \pm 1$  °C for 72 h in an environmental chamber without light (Precision Scientific, Winchester, VA, USA). For isolation of *Mortierella* strains using pear fruits as bait substrate, 200-250 g of moistened soil were placed in 1 L plastic cups with a lid, containing one pear that had been previously washed with 1.5% NaClO for 1 min. The cups were incubated at  $26 \pm 1$  °C in darkness for 72 h. Then, the fruits were rinsed three times with sterile distilled water and dried on sterile brown paper in a biosafety hood (Envirco Corporation, Albuquerque, USA). The fruits were individually incubated at  $26 \pm 1$  °C for 48 h. Three sections (5 mm<sup>2</sup>) of damaged epidermis (transition zone) or mycelium-containing epidermis, were excised from the fruit and placed on Petri dishes containing V8-agar with antibiotics. The dishes were incubated at  $26 \pm 1$  °C for 72 h. For the isolation using azalea leaves as bait substrate, fresh young leaves were treated in the same way than pear fruits. The leaves were cut in circles of 5 mm of diameter. The circles were placed on Petri dishes (60 × 15 mm) containing 10-15 g of moistened

y se secaron en papel de estraza en una campana de bioseguridad (Enviroco Corporation, Albuquerque, EUA). Los frutos fueron incubados de manera individual a  $26 \pm 1$  °C por 48 h. Se extirparon tres secciones ( $5 \text{ mm}^2$ ) de la epidermis dañada del fruto (zona de transición), o de la epidermis con micelio, y se colocaron en cajas de Petri que contenían agar V8 con antibióticos. Las cajas se incubaron a  $26 \pm 1$  °C por 72 h. Para el aislamiento con hojas de azalea como sustrato trampa, se utilizaron hojas jóvenes y frescas que fueron sometidas al mismo tratamiento que los frutos de pera. Las hojas se cortaron en círculos de 5 mm de diámetro. Los círculos se colocaron en cajas de Petri ( $60 \times 15 \text{ mm}$ ) que contenían 10-15 g de suelo húmedo y se incubaron a temperatura ambiente por 24 h. Los círculos de las hojas se desprendieron de la caja, se lavaron con agua destilada estéril y se secaron en papel de estraza. Los círculos se colocaron en los cuatro puntos cardinales y en el centro de las cajas de Petri que contenían agar V8 con antibióticos y se incubaron a  $28 \pm 1$  °C por 72 h. Estos experimentos se hicieron por triplicado.

Las colonias con morfología típica de *Mortierella* se aislaron y purificaron en los medios agar V8 o PDA sin antibióticos, aplicando la técnica de cultivo monospórico, y se incubaron a  $28 \pm 1$  °C sin luz por 120 h.

Los aislados putativos de Mortierellales fueron agrupados según sus caracteres morfológicos macroscópicos y después se tomó un aislado de cada grupo para su identificación (Watanabe, 2010), de acuerdo con los caracteres microscópicos observados en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Germany).

La extracción de ADN genómico (ADNg) se realizó de acuerdo con el método de Raeder y Broda (1985) y Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). El ADNg se utilizó para amplificar la región espaciadora interna

soil and incubated at room temperature for 24 h. The leaf circles were removed, washed with sterile distilled water and dried on sterile brown paper. Leaf circles were placed in the four cardinal points and center of Petri dishes containing V8-agar with antibiotics and incubated at  $28 \pm 1$  °C for 72 h. These experiments were performed in triplicate.

The colonies with typical morphology of *Mortierella* were isolated and purified on V8-agar or PDA medium without antibiotics, using a monosporic culture technique followed by incubation at  $28 \pm 1$  °C, without light for 120 h.

Putative Mortierellales isolates were grouped according to their macroscopic morphological characters and then an isolate of each group was taken for identification (Watanabe, 2010) according to its microscopic characters seen at an optical microscope (Carl Zeiss, Germany).

Genomic DNA (gDNA) was extracted according to Raeder and Broda (1985) and Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). This gDNA was used to amplify the internal transcribed spacer (ITS) region of 18S rDNA gene using the universal primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). The amplification was performed according to the methodology described by Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). The PCR products were examined by electrophoresis on a 1% agarose gel. Subsequently, these products were sequenced at MacroGen Company (Rockville, MD, USA). The obtained sequences were compared against the NCBI database using the BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990) to verify the percent identity corresponding to the analyzed species. Additionally, a phylogenetic tree by maximum likelihood method, to observe the grouping of Mortierellales fungi was constructed, using Mega software version 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

transcrita (ITS) del gen 18S ADNr con iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3') (White *et al.*, 1990). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Ruiz-Cisneros *et al.* (2017). Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, los productos fueron secuenciados por Macrogen Company (Rockville, MD, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo de BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para verificar el porcentaje de identidad correspondiente a las especies analizadas. Además, se construyó un árbol filogenético, por el método de máxima verosimilitud, a fin de observar el agrupamiento de los hongos Mortierellales, para lo cual se utilizó el software Mega versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

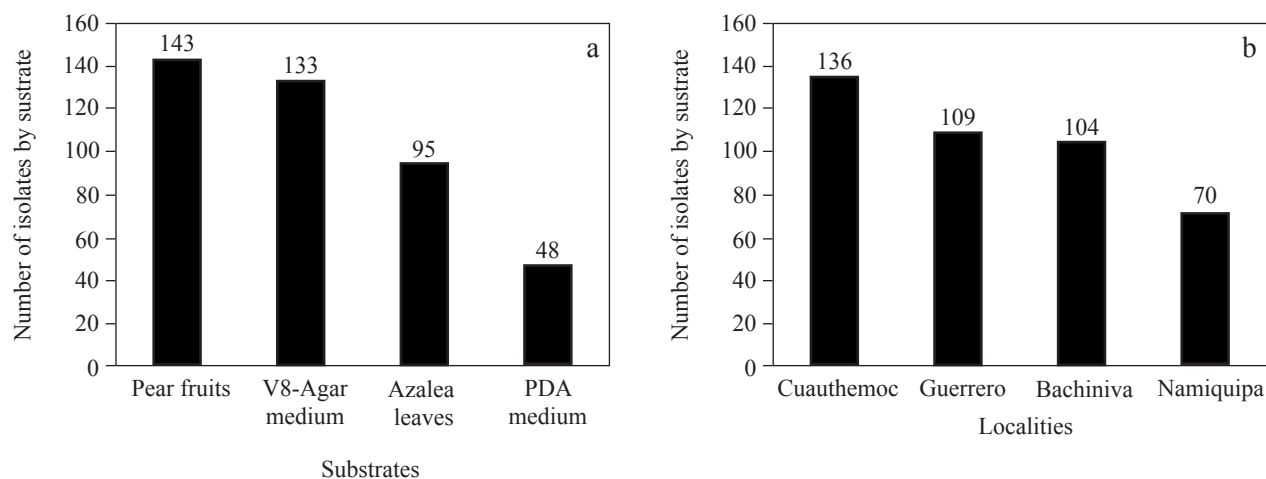
La patogenicidad de los 21 aislados de *Mortierella* se probó en porta injertos de manzana G30 (una de las que más se producen en México) en condiciones de invernadero, según el método de Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) con modificaciones. Se evaluaron 10 porta injertos G30 (de 1 año de edad) por cada aislado de *Mortierella*, junto con diez árboles de testigo (sin inóculo). Dos meses después de la plantación, cada árbol fue inoculado con 10 mL de inóculo de *Mortierella* no cuantificado. El inóculo, de 6-7 días de edad, se sembró en jugo de verduras V8 [jugo V8 (Campbell's™) y carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>)], y se mantuvo a 28 °C con agitación orbital constante a 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Posteriormente, los porta injertos inoculados se mantuvieron dos meses más en condiciones de invernadero y durante este periodo fueron monitoreados cada semana.

Se obtuvieron 119 aislados de *Mortierella* de las muestras de suelo evaluadas (Cuadro 1, Figura 1a-b). El uso de frutos de pera como sustrato

The pathogenicity of 21 *Mortierella* strains was tested in G30 apple rootstocks (one of the most planted in Mexico) under greenhouse conditions, according to Ruiz-Cisneros *et al.* (2017) with modifications. Ten G30 rootstocks (1 year old) were tested for each *Mortierella* strain, along with ten control trees (without inoculum). Two months after planting, each tree was inoculated with 10 mL of unquantified *Mortierella* inoculum. The inoculum was 6-7 d old, grown in vegetable broth V8 [V8 juice (Campbell's™) and calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>)] and maintained at 28 °C with constant orbital shaking at 140 rpm (Orbit 1900, Labnet International Inc.). Subsequently, the inoculated rootstocks were maintained for another two months under greenhouse conditions and during this time were monitored weekly.

Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were obtained from tested soil samples (Table 1, Figure 1a-b). The use of pear fruits as bait substrate allowed to obtain the highest number of isolates (143 isolates, 34.1%), followed by the V8-agar-antibiotics medium (133 isolates, 31.7%) and the method involving leaves of azalea as bait substrate (95 isolates, 22.7%). The least effective isolation method was the PDA-antibiotics medium (48 isolates, 11.5%) (Figure 1a). The high number of isolated microorganisms using pear fruits might be consequence of a higher contact area of this fruits with soil, and longer exposure. Azalea leaves and mature fruits have been used as bait substrates to isolate other microorganisms with favorable results. In contrast to our results, Yadav *et al.* (2014) efficiently isolated *Mortierella alpina* on PDA medium.

The number of *Mortierella* isolates obtained from each region is shown in Figure 1b. The highest number of isolates (136, 32%) was obtained from the Cuauhtémoc area. Webster and Weber (2007) demonstrated that the isolation frequency for each



**Figura 1.** Aislados de *Mortierella* asociados con la rizosfera de manzanos enfermos en cuatro de las principales localidades productoras de manzana en el estado de Chihuahua, México; a) número de aislados obtenidos por sustrato; b) número de aislados obtenidos por localidad.

**Figure 1.** *Mortierella* isolates associated to diseased apple trees rhizosphere in four main producing localities of Chihuahua State, Mexico; a) number of isolates obtained by substrate; b) number of isolates obtained by locality.

trampa nos permitió obtener el mayor número de aislados (143 aislados, 34.1%), seguido del medio de V8-agar-antibióticos (133 aislados, 31.7%) y del método en que se utilizaron hojas de azalea como sustrato trampa (95 aislados, 22.7%). El método menos eficaz de aislamiento fue el medio de PDA-antibióticos (48 aislados, 11.5%) (Figura 1a). El alto número de microorganismos aislados utilizando frutos de pera pudo haber sido consecuencia de una mayor área de contacto de los frutos con el suelo y de una exposición más prolongada. Las hojas de azalea y frutos maduros de pera se han utilizado como sustratos trampa para aislar otros organismos con resultados favorables. A diferencia de nuestros resultados, Yadav *et al.* (2014) aislaron *Mortierella alpina* en el medio PDA de manera eficiente.

El número de aislados de *Mortierella* que se obtuvo en cada región se muestra en la Figura 1b. El mayor número de aislados (136, 32%) se obtuvo en la región de Cuauhtémoc. Webster y Weber (2007) demostraron que la frecuencia de aislamiento de

fungus is highly variable, depending on the isolation method, culture medium, temperature and other factors during processing of samples. The evident variation in abundance of *Mortierella* in tested orchards might be due to multiple factors such as the geographical location, soil type, rootstock type, age of trees, climatic conditions, technification level, organic matter content, existent vegetation, among other factors. Bosso *et al.* (2017) found *Mortierella* species in soils with different uses and they attributed the high presence of *Mortierella* to the possible control of phytopathogens, since this genus may have disease suppressive properties (Dedyukhina *et al.*, 2014; Zlotek and Wojcik, 2014).

Four hundred and nineteen *Mortierella* isolates were differentiated and identified according to their macro- and microscopic distinctive characters, such as the flower-shaped radial growth of young colonies of white color (Figure 2). However, some of these colonies turned yellow



cada hongo varía mucho, dependiendo del método de aislamiento, el medio de cultivo, la temperatura y otros factores durante el procesamiento de las muestras. La evidente variación en la abundancia de *Mortierella* en los huertos evaluados podría ser resultado de múltiples factores, como la ubicación geográfica, el tipo de suelo, el tipo de porta injertos, la edad de los árboles, las condiciones climáticas, el nivel de tecnificación, el contenido de materia orgánica, la vegetación existente, entre otros. Boso *et al.* (2017) encontraron especies de *Mortierella* en suelo con diferentes usos y atribuyeron la alta presencia de *Mortierella* al posible control de fitopatógenos, ya que este género podría tener propiedades supresoras de enfermedades (Dedyukhina *et al.*, 2014; Zlotek y Wojcik, 2014).

Se diferenciaron e identificaron 419 aislados de Mortierellales, de acuerdo con sus caracteres macro- y microscópicos distintivos, como el crecimiento radial en forma de flor de las colonias jóvenes de color blanco (Figura 2). Sin embargo, al crecer, algunas de las colonias cambiaron de color blanco a amarillo. El micelio de los aislados era hialino y cenocítico, pero en algunas, se observó la presencia de hifas septadas conforme maduraban (Watanabe, 2010). Se observaron también estructuras microscópicas típicas de la reproducción asexual de este género, lo mismo que estructuras de resistencia en forma de clamidosporas catenuladas e intercalares en la mayoría de los aislados (Figura 2, Cuadro 2; Watanabe, 2010). No se observaron estructuras de reproducción sexual como cigosporas. Park *et al.* (2001) demostraron que este tipo de estructura es poco común y suele estar rodeada de micelio cenocítico, y que los cambios morfológicos de *Mortierella* dependen de las condiciones de cultivo y del genotipo del aislado.

Los fragmentos de ADN<sub>g</sub> obtenidos después de la amplificación de las muestras del hongo, con los iniciadores ITS4 e ITS5, mostraron mayor

when they grew up. The mycelium of the isolates was hyaline and coenocytic but some hyphae became septated as they aged (Watanabe, 2010). In addition, the microscopic structures typical of asexual reproduction of this genus were observed, besides, the resistance structures as catenulate and intercalary chlamydo-spores, were also observed in most of the isolates (Figure 2, Table 2; Watanabe, 2010). Sexual reproductive structures such as zygospores, were absent in the isolates. Park *et al.* (2001) demonstrated that this structure type is uncommon and often surrounded by coenocytic mycelia and that the morphological changes of *Mortierella*, were dependent on culture conditions and strain genotype.

gDNA fragments obtained after amplification of the fungal samples, with ITS4 and ITS5 primers, showed high homogeneity. According to the morphological characters and sequences obtained from the PCR products, 12 of the 21 Mortierellales isolates belonged to *Mortierella alpina*, six to *Mortierella* sp., one to *Mortierella gamsii*, one to *Mortierella capitata* and one to the Mortierellales order (Figure 3). All isolates had 99-100% identity and a maximum similarity with the molecular scores and taxonomic keys, corresponding to each strain and according to the sequences available in the GenBank database (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). Melo *et al.* (2014) found *M. alpina* from tissues of the antarctic moss *Schistidium antarctici*, demonstrating that *Mortierella* can be found in high frequency. These differences could be due to the sampling source, since in our study, soil samples were taken from agroecosystems disturbed by anthropogenic activities, mainly by intensive use of pesticides for agricultural pests and diseases management. Nicola *et al.* (2017) found that *Mortierella* is a fungus that is usually found colonizing plant roots and is normally associated with apple replant diseases. In our study, this

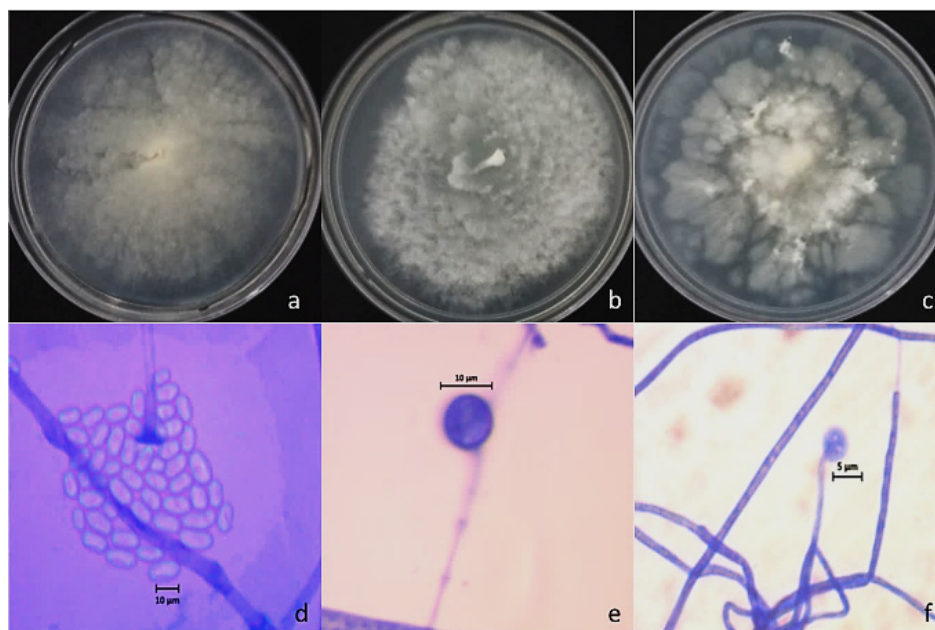


Figure 2. Morfología de *Mortierella* spp., a-c) características macroscópicas de *M. alpina*, *M. alpina* y *Mortierella* sp. sembradas en un medio de cultivo PDA; d-f) caracteres microscópicos, d) esporangiosporas hialinas y ovaladas, e) clamidospora intercalary, f) esporangios terminales.

Figure 2. Morphology of *Mortierella* spp., a-c) macroscopic characteristics grown of *M. alpina*, *M. alpina* and *Mortierella* sp. on PDA culture medium; d-f) microscopic characters, d) sporangiospores hyaline and ovoid, e) intercalary chlamydospore, f) terminal sporangia.

homogeneidad. De acuerdo con los caracteres morfológicos y las secuencias obtenidas de los productos de PCR, se determinó que 12 de los 21 aislados de Mortierellales pertenecían a *Mortierella alpina*, seis a *Mortierella* sp., uno a *Mortierella gamsii*, uno a *Mortierella capitata* y uno al orden de los Mortierellales (Figura 3). Todos los aislados mostraron de 99 a 100% de identidad y máxima verosimilitud con las puntuaciones moleculares y las claves taxonómicas, que corresponden a cada aislado y según las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI) (Altschul *et al.*, 1990). Melo *et al.* (2014) encontraron *M. alpina* en tejidos de musgo antártico *Schistidium antarctici*, y demostraron que la presencia de *Mortierella* es muy frecuente. Estas diferencias podrían derivarse de la fuente de las muestras, ya que, en nuestro

replanting process was detected in some sampled orchards.

The maximum likelihood tree showed genetic differences between *Mortierella* isolates. According to O'Donnell *et al.* (2001), some genera and even some species of the Mucorales order are polyphyletic, as can be observed in the phylogenetic tree obtained from the different isolates. Mortierellales isolates were not pathogenic to apple rootstocks G30. Bosso *et al.* (2017) demonstrated that these fungi species can be considered antagonistic due to the ability to produce different substances which can help in the defense of plants, as systemic resistance inducer.

There are several *Mortierella* species associated to the rhizosphere of apple trees with apparent symptoms of root diseases in Chihuahua. The most

**Cuadro 2. Principales caracteres microscópicos de aislados de *Mortierella* asociados con la rizosfera de manzanos enfermos en el estado de Chihuahua, México.****Table 2. Main microscopic characters of *Mortierella* isolates associated to diseased apple trees rhizosphere in Chihuahua State, Mexico.**

| Código del aislado | Identificación molecular            | Forma de los esporangios | Tamaño (µm) | Esporangióforo (µm) | Clamidospora (µm)  | Esporangiosporas (forma) |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------|---------------------|--------------------|--------------------------|
| G11                | <i>Mortierella</i> sp. (TR065)      | Ovalado                  | 5           | 43                  | Ausente            |                          |
| G3-2               | <i>M. alpina</i> (FCF20120803)      | Esférico                 | 5           | 50                  | Intercalar (5-10)  |                          |
| G17                | <i>M. alpina</i> (ATT234)           | Esférico                 | 5-7         | 35-50               | Intercalar (5)     |                          |
| G18                | <i>M. alpina</i> (C051D16)          | Ovalado                  | 10          | 50                  | Intercalar (5-7)   |                          |
| G21                | <i>Mortierella</i> sp. (FMR13-4)    | Ovalado                  | 8-12        | 20                  | Intercalar (5)     |                          |
| G26                | <i>Mortierella</i> sp. (MEL2385001) | Esférico                 | 5-10        | 40-55               | Catenulada (7-10)  |                          |
| G29-1              | <i>M. alpina</i> C08ID17            | Esférico                 | 10-15       | 30-50               | Intercalar (7-10)  |                          |
| G61                | <i>M. alpina</i> MUT: 5194          | Ovalado                  | 5-7         | 20-30               | Intercalar (5)     |                          |
| G31                | <i>M. alpina</i> strain xds08088    | Esférico                 | 5-10        | 50-60               | Ausente            |                          |
| G12                | <i>M. alpina</i> voucher RIFA 12B   | Esférico                 | 10-7        | 40-70               | Intercalar (8-10)  |                          |
| G54                | <i>M. alpina</i> A03ID2             | Esférico                 | 10-7        | 30-50               | Intercalar (5-7)   | Ovalada                  |
| G52                | <i>M. alpina</i> ATCC16266          | Esférico                 | 7-10        | 30-50               | Intercalar (5-7)   |                          |
| G14                | <i>M. alpina</i> A01ID1             | Ovalado                  | 5-10        | 40-50               | Ausente            | Ovalada                  |
| G44                | <i>Mortierella</i> sp. FMR23-12     | Esférico                 | 10-15       | 30-40               | Intercalar (5-10)  |                          |
| G16                | <i>M. gamsii</i> aurium 1205        | Esférico                 | 5-10        | 20-40               | Intercalar (7-10)  |                          |
| G2                 | Uncultured <i>Mortierellales</i>    | Esférico                 | 5-10        | 30-50               | Intercalar (5-10)  | Ovalada                  |
| G9                 | <i>Mortierella</i> sp. 11MA04       | Esférico                 | 5-10        | 20-40               | Intercalar (7-10)  |                          |
| G25                | <i>M. capitata</i>                  | Ovalado                  | 10          | 30-40               | Catenulada (5-7)   |                          |
| G32                | <i>Mortierella</i> sp. (FMR23-12)   | Esférico                 | 5           | 40-50               | Intercalar (5-10)  |                          |
| G35                | <i>Mortierella</i> sp. F0210-20S2   | Esférico                 | 7-10        | 40-50               | Intercalar (10-15) |                          |
| G43                | <i>Mortierella</i> sp. SD006        | Ovalado                  | 8-10        | 30-40               | Ausente            |                          |

estudio, las muestras de suelo fueron recolectadas en agroecosistemas disturbados por actividades antropogénicas, principalmente por el uso intensivo de plaguicidas para el control de plagas agrícolas y el manejo de enfermedades. Nicola *et al.* (2017) descubrieron que *Mortierella* es un hongo que por lo general coloniza las raíces de las plantas y que normalmente se le asocia con enfermedades de replanteo de manzana. En nuestro estudio detectamos este proceso de replanteo en algunos huertos donde recolectamos las muestras.

El árbol de máxima verosimilitud mostró diferencias genéticas entre los aislados de *Mortierella*. Según O'Donnell *et al.* (2001), algunos géneros, e incluso algunas especies, del orden Mucorales son polifiléticos, tal como se puede observar en el árbol filogenético de los diferentes aislados. Los

efficient method for the isolation of *Mortierella* involved the use of pear fruits as bait substrate.

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

aislados de *Mortierellales* no fueron patogénicos en los porta injertos de manzana G30. Bosso *et al.* (2017) demostraron que estas especies de hongos pueden ser consideradas antagonistas debido a su capacidad de producir diferentes sustancias que pueden ayudar en la defensa de las plantas como inductores de resistencia sistémica.

En Chihuahua existen varias especies de *Mortierella* asociadas con la rizosfera de los manzanos que muestran síntomas aparentes de enfermedades radiculares. El método más eficaz para

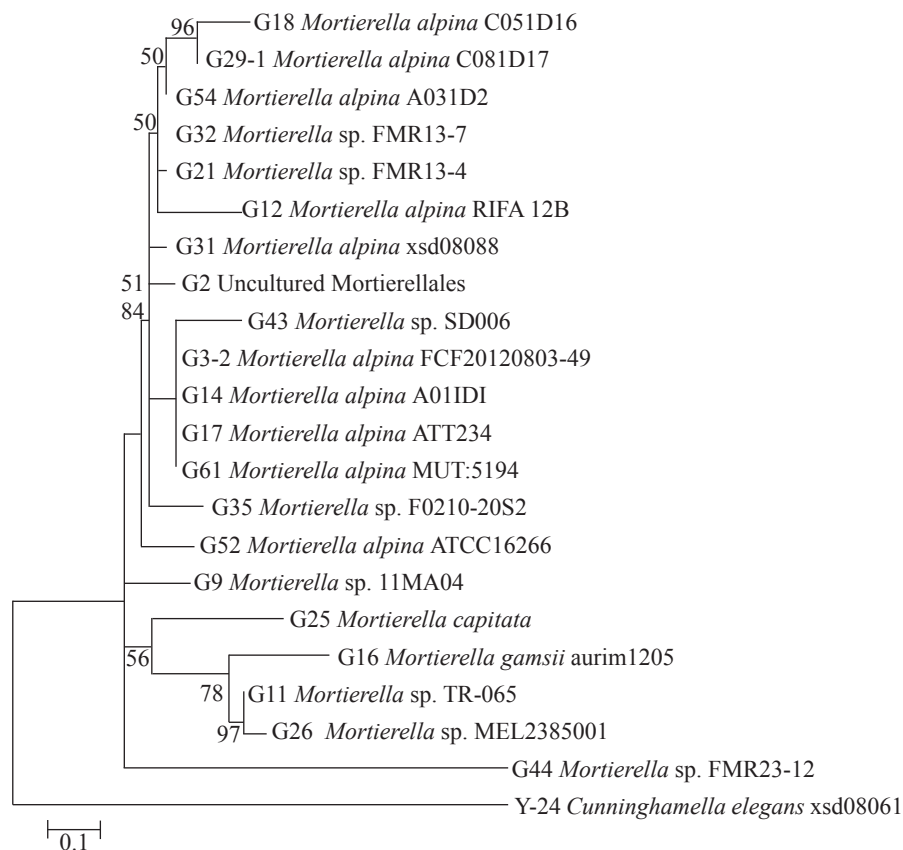


Figura 3. Árbol de máxima verosimilitud de aislados de *Mortierella* obtenidos en la rizosfera de árboles de manzana enfermos en Chihuahua, México, con base en los resultados de BLAST utilizando las secuencias de la región ITS4 e ITS5 de cada aislado. La barra de escala representa las sustituciones de un nucleótido y los puntos de la rama numérica indican valores de soporte como porcentaje con base en 1,000 repeticiones de bootstrap (se muestran únicamente los valores > 50%).

Figure 3. Maximum likelihood tree of *Mortierella* isolates, obtained in diseased apple trees rhizosphere in Chihuahua, Mexico, based on BLAST results from sequences of the ITS4 and ITS5 region of each isolate, the scale bar represents one nucleotide substitutions and numbers branch points indicate values support as percentage based on 1,000 bootstrap replicates (only values > 50% are shown).

el aislamiento de *Mortierella* incluyó el uso de frutos de pera como sustrato trampa.

LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410. [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bosso L, Lacatena F, Varlese R, Nocerino S, Cristinzio G and Russo D. 2017. Plant pathogens but not antagonists change

- in soil fungal communities across a land abandonment gradient in a Mediterranean landscape. *Acta Oecologica*, 78:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2016.11.002>
- Dedyukhina EG, Chistyakova TI, Mironov AA, Kamzolova SV, Morgunov IG and Vainshtein MB. 2014. Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116:429-437. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300358>
- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105:1422-1432. <https://doi.org/10.1017/S0953756201004725>
- Ho SY, Jiang Y and Chen F. 2007. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) content of the fungus *Mortierella alpina* isola-

- ted from Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:3960-3966. <https://doi.org/10.1021/jf0700071>
- Melo IS, Santos SN, Rosa LH, Parma MM, Silva LJ, Queiroz SCN and Pellizari VH. 2014. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the antarctic moss *Schistidium antarctici*. Extremophiles, 18:15-23. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0588-7>
- Nicola L, Turco E, Albanese D, Donati C, Thalheimer M, Pindo M, Cavalieri ID and Pertot I. 2017. Fumigation with dazomet modifies soil microbiota in apple orchards affected by replant disease. Applied Soil Ecology, 113:71-79. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.002>
- O'Donnell KL, Lutzoni FM, Ward TJ and Benny GL. 2001. Evolutionary relationships among Mucoralean fungi (Zygomycota): Evidence for family polyphyly on a large scale. Mycologia, 93:286-296. <https://doi.org/10.2307/3761650>
- Park EY, Koike Y, Cai HJ, Higashiyama K and Fujikaya S. 2001. Morphological diversity of *Mortierella alpina*: Effect of consumed carbon to nitrogen ratio in flask culture. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 6:161-166. <https://doi.org/10.1007/BF02932544>
- Raeder U and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology, 1:17-20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rayaroth A, Tomar RS and Mishra RK. 2017. Arachidonic acid synthesis in *Mortierella alpina*: Origin, evolution and advancements. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences, 87:1053-1066. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0714-2>
- Ruiz-Cisneros MF, Rios-Velasco C, Berlanga-Reyes D.I, Ornelas-Paz JJ, Acosta-Muñiz CH, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Pérez-Corral DA, Salas-Marina MÁ, Ibarra-Rendón JE, and Fernández-Pavía SP. 2017. Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua, Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología, 35:437-462. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1704-3>
- Tamura K, Glen S, Peterson D, Filipiski A and Sudhir K. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30:2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species (3rd ed.):153-155. CRC Press.
- Webster J and Weber R. 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press White TJ, Bruns, T, Lee SB and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ, Eds. PCR protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York, 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yadav DR, Kim SW, Babu AG, Adhikari M, Kim C, Lee HB and Lee YS. 2014. First report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) isolated from crop field soil in Korea. Mycobiology, 42:401-404. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.4.401>
- Zlotek U and Wójcik W. 2014. Effect of arachidonic acid elicitation on lettuce resistance towards *Botrytis cinerea*. Scientia Horticulturae, 179:16-20. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.026>