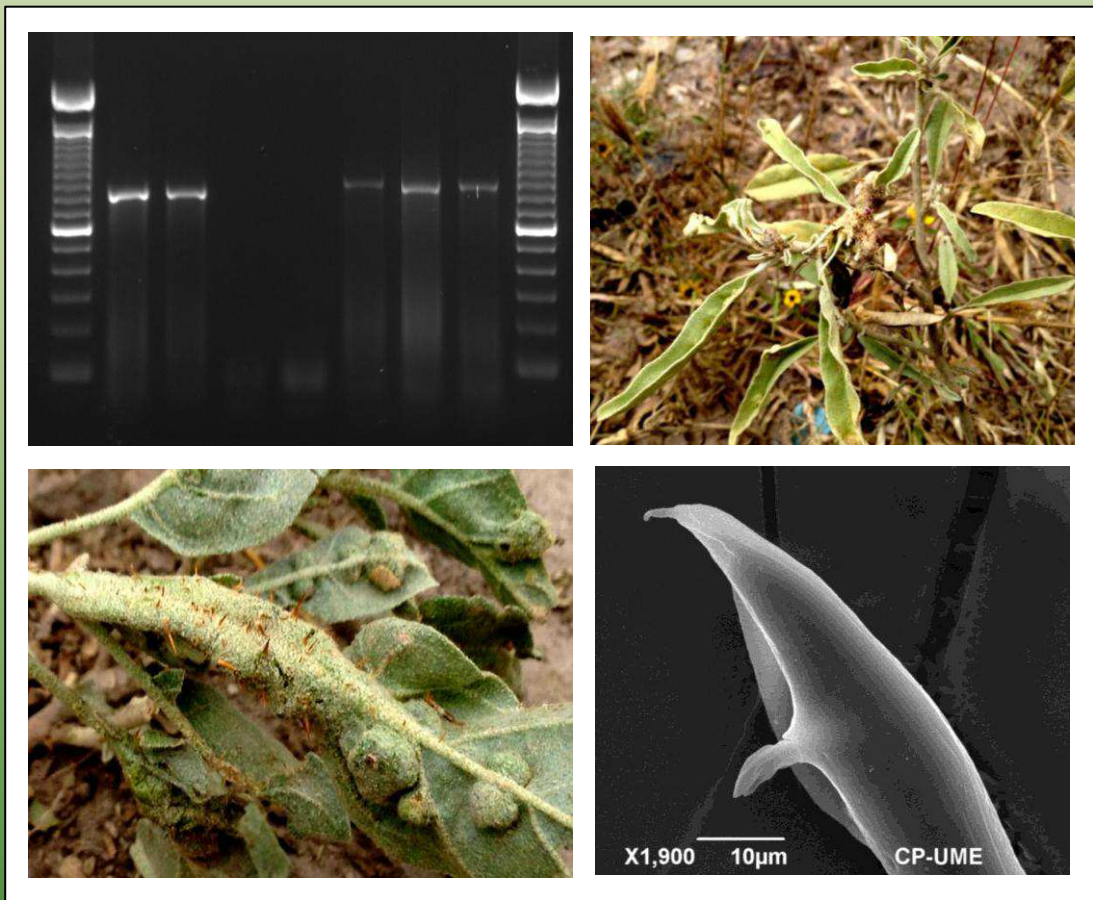


REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

Fully Bilingual

Volumen 34, Número 2, 2016



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

Lic. Ma. Yunuén López Muratalla

Composición Web * Web Composition

Ing. Eduardo Guzmán Hernández

Editoras(es) Adjuntos * Senior Editors

Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía UMSNH
Dra. Emma Zavaleta Mejía Colegio de Postgraduados
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro CIAD
Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada CIAD
Dr. Ángel Rebollar Alviter Universidad Autonoma Chapingo

Comité Editorial Internacional * International Editorial Advisory Board

Dra. Lilian Amorim, Universidad de Sao Paolo, Brasil
Dr. Rodrigo Rodríguez Kábana Auburn University, USA
Dr. Sami Jorge Michereff Universidad Federal Rural de Pernambuco, Brasil

Editoras(es) Asociados * Associate Editors

Dra. Graciela Ávila Quesada, CIAD
Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Instituto Tecnológico Agropecuario Conkal
Dr. Juan Carlos Noa Carranca, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada-UV
Dr. Victor Heber Aguilar Rincón, Colegio de Postgraduados
Dr. Carlos Fredy Ortíz García, Colegio de Postgraduados
Dr. Rómulo García Velasco, UAEM
Dr. José Alfredo Samaniego Gaxiola, INIFAP

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS * SCIENTIFIC ARTICLES

- Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and 3* in Mexico * Detección de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 y 3* en México.** 131
Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Daniel Emigdio Uriza-Ávila, Reyna Isabel Rojas-Martínez, Douglas Rodríguez-Martínez
- Phytophthora cinnamomi* Rands. pathogenicity tests in *Pseudotsuga mensiezii* * Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*.** 142
Alejandra Almaraz-Sánchez, Dionicio Alvarado-Rosales, Santos Gerardo Leyva-Mir, Armando Equihua-Martínez, Sergio Aranda-Ocampo, Javier Hernández-Morales.

ARTÍCULO DE REVISIÓN * REVISION ARTICLES

- Review of diagnosis techniques for *Brenneria* spp in walnut (*Juglans regia*) * Revisión de técnicas de diagnóstico de *Brenneria* spp en nogal (*Juglans regia*).** 158
Julia Anguiano-Cabello, Roberto Arredondo-Valdés, Ernesto Cerna-Chávez, Mariana Beltran-Beache, Juan Carlos Delgado-Ortíz, Yisa María Ochoa-Fuentes

NOTAS FITOPATOLÓGICAS * PHYTOPATOLOGICAL NOTES

- Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained *in vitro* * Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*.** 173
Sergio Ramírez-Rojas, Felipe de Jesus Osuna-Canizalez, Faustino García-Pérez, Jaime Canul-Ku, Jesús Hernández-Romano, Katya Ornelas-Ocampo, Patricia Landa-Salgado
- Identification and phylogenetic analysis of the leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* affecting *Solanum elaeagnifolium* Cav. in Guanajuato, Mexico * Identificación y análisis filogenético del nematodo foliar *Orrina phyllobia* afectando *Solanum elaeagnifolium* Cav. en Guanajuato, México.** 184
Edgar Medina-Gómez, Ángel Ramírez-Suárez, Juventino Cuevas-Ojeda, Daniel Martínez-Gómez
- Virus associated to yellowing of *Hibiscus sabdariffa* in Guerrero, Mexico * Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México.** 200
Patricia Velázquez-Fernández, Erika Janet Zamora-Macorra, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Grisel Negrete-Fernández, Javier Hernández-Morales

Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and 3* in Mexico

Detección de *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 y 3* en México

Daniel Leobardo Ochoa-Martínez*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230; **Daniel Emigdio Uriza-Ávila**, INIFAP-Campo Experimental Cotaxtla, km 34.5 Carr. Federal Veracruz-Córdoba, Medellín de Bravo, Ver., CP 94270; **Reyna Isabel Rojas-Martínez** y **Douglas Rodríguez-Martínez**. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230. *Autor de Correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 06 de Enero, 2016

Aceptado: 28 de Marzo, 2016

Ochoa-Martínez DL, Uriza-Ávila DE, Rojas-Martínez RI, Rodríguez-Martínez D. 2016. Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 and 3* in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 131-141.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1601-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-1)

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 29th, 2016.

Abstract. In El Bajo Papaloapan, the main producing area of pineapple of Mexico, leaves with typical symptoms of viral infection consisting in chlorosis, flaccidity, reduced growth and reddening were collected. By RT-PCR with specific primers for the hsp70 gene and subsequent sequencing were detected *Pineapple mealybug wilt virus associated-virus 1* (PMWaV-1) and *Pineapple mealybug wilt virus associated-3* (PMWaV-3). From the sequences obtained a tree was done with sequences from different regions of the world available in GenBank in order to know their similarity. The sequence obtained from the Mexican isolate PMWaV-1 was genetically related

Resumen. En El Bajo Papaloapan, principal zona productora de piña, se colectaron hojas con síntomas de clorosis, flacidez, reducción del crecimiento y enrojecimiento foliar típicos de infecciones virales en este cultivo. Mediante RT-PCR con indicadores específicos para el gen hsp70 y posterior secuenciación, fueron detectados los virus *Pineapple mealybug wilt associated-virus 1* (PMWaV-1) y *Pineapple mealybug wilt associated-virus 3* (PMWaV-3). A partir de las secuencias obtenidas se construyó un árbol con secuencias procedentes de diferentes regiones del mundo disponibles en el GenBank para determinar su similitud. La secuencia obtenida del aislamiento mexicano del PMWaV-1 resultó ser más próxima genéticamente a secuencias de aislamientos procedentes de Cuba, Taiwán, Tailandia y Hawai y más distante del aislamiento australiano. La secuencia obtenida para el aislamiento mexicano del PMWaV-3 se encontró más relacionada con los aislamientos de Hawai, Cuba, Australia y Taiwán y más distante del aislamiento tailandés. Este es el primer reporte de la presencia de estos dos virus en México.

to the sequences of isolates from Cuba, Taiwan, Thailand and Hawaii and more distant from the Australian isolate. The sequence obtained for the Mexican isolate PMWaV-3 was more related to isolates from Hawaii, Cuba, Australia and Taiwan and more distant from the Thailand isolate. This is the first report of the presence of these two viruses in Mexico.

Additional keywords: ampeloviruses, mealybug, pineapple red wilt, phylogeny.

El Bajo Papaloapan is the main producing area of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) of Mexico which includes the regions of Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Villa Azueta, El Zopilote, Isla, Juan Rodríguez Clara and Los Tigres (Veracruz) where this crop is an important economic activity. At global level a viral complex associated with pineapple is known (Sether *et al.*, 2010), consisting of *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* (PMWaV-2) and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) transmitted by mealybugs *Dysmicoccus neobrevipes* and *Dysmicoccus brevipes* (Sether *et al.*, 1998). Mealybug wilt of pineapple (MWP) is one of the most destructive diseases of this species in many parts of the world and it is associated with the infection of PMWaV-2 combined with mealybug feeding (Sether *et al.*, 2005). In Hawaii, it was found that mealybug feeding alone or in combination with PMWaV-1 or PMWaV-3 does not cause MWP requiring the presence of PMWaV-2 for this to occur (Sether and Hu, 2002). Symptoms of the disease consist of a severe dieback, reddish coloration of leaves and wilting which together cause the collapse of mature plants (Carter, 1945). It has also been reported a

Palabras clave adicionales: ampelovirus, piojo harinoso, marchitez roja de la piña, filogenia.

El Bajo Papaloapan es principal zona productora de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) de México que incluye las regiones de Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Villa Azueta, El Zopilote, Isla, Juan Rodríguez Clara y Los Tigres (Veracruz), donde este cultivo representa una importante actividad económica. A nivel global se conoce un complejo viral relacionado con la piña (Sether *et al.*, 2010), que consiste en *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* (PMWaV-2) y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) transmitido por los piojos harinosos *Dysmicoccus neobrevipes* y *Dysmicoccus brevipes* (Sether *et al.*, 1998). El marchitamiento asociado al piojo harinoso en piña (MaPHP) es una de las enfermedades más destructivas de esta especie en muchas partes del mundo y se relaciona con la infección de PMWaV-2 en combinación con la alimentación del piojo harinoso (Sether *et al.*, 2005). En Hawaii, se encontró que sólo la alimentación del piojo harinoso o en combinación con PMWaV-1 o PMWaV-3 no causa MaPHP, y se requiere la presencia de PMWaV-2 para que se lleve a cabo (Sether y Hu, 2002). Los síntomas de la enfermedad consisten en un desecamiento severo, hojas de color rojizo y marchitamiento, que juntos causan el colapso de plantas adultas (Carter, 1945). También se ha reportado una coloración café de las plantas afectadas, flacidez, enroscado de las puntas de las hojas hacia abajo, reducción del sistema radical y frutas con pulpa fibrosa y de sabor agrio (Borroto *et al.*, 1998). La detección de estos virus fue llevada a cabo con inmunoimpresión de tejido y con RT-PCR con indicadores específicos al gen hsp70 (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005).

brown coloration of the affected plants, flaccidity, downward curling of the leaf tips, reduction of the root system and fruits with fibrous pulp and tasting sour (Borroto *et al.*, 1998). Detection of these viruses has been done by tissue blot immunoassay and by RT-PCR with primers specific to the hsp70 gene (Sether *et al.*, 2001; Sether *et al.*, 2005). In the producing area of pineapple of El Bajo Papaloapan producers and technicians have been observed plants with symptoms of flaccidity, chlorosis, light reddening or wilt without root rot or necrosis of vascular bundles randomly distributed within the plots. Since no damage of the root system or the vascular bundles has been observed in the affected plants it is possible that these symptoms are associated with PMWaV-1, or PMWaV-2 or PMWaV-3, causal agents of the MWP one of the most important diseases of this crop in the world. So, the objective of this study was to determine the presence of these viruses in the region and to know their relationships with several isolates of the world.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

In plots with different production system located in the region of Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Sabaneta, Ejido, Isla and Los Tigres (Veracruz), a directed sampling was conducted in July 2011 to collect leaf tissue of pineapple plants var. Cayena or the MD2 hybrid with symptoms of flaccidity, wilting, reddish or tan coloration of leaves, general reduction of growth associated with pineapple mealybug wilt as well as asymptomatic plants. All sampled plants were revised in search of mealybugs and in those showing wilting, roots were dug up to observe them and discard that this flaccidity was associated with root rot or necrosis

En el área productora de piña de El Bajo Papaloapan, productores y técnicos han observado plantas con síntomas de flacidez, clorosis, ligero enrojecimiento o marchitamiento sin pudrición de la raíz o la necrosis de haces vasculares distribuidas al azar entre las parcelas. Debido a que no se ha observado daños del sistema radical o de los haces vasculares en las plantas afectadas, es posible que estos síntomas estén relacionados con PMWaV-1 o PMWaV-2 o PMWaV-3, agentes causales del MaPHP, una de las más importantes enfermedades de este cultivo en el mundo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de estos virus en la región y conocer su relación con varios aislados del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reolección de muestras

En parcelas con diferentes sistemas de producción ubicadas en la región de Loma Bonita (Oaxaca), Linda Vista, Sabaneta, Ejido, Isla y Los Tigres (Veracruz), un muestreo dirigido fue llevado a cabo en Julio de 2011 para reunir tejido de hojas de plantas de piña var. Cayena o el híbrido MD2 con síntomas de flacidez, marchitamiento, coloración rojiza o café en las hojas, reducción general en el crecimiento, relacionados con el marchitamiento asociado al piojo harinoso de piña, así como plantas asintomáticas. Todas las plantas muestreadas fueron revisadas en busca de piojo harinoso, y en aquellas que presentaban marchitamiento, las raíces fueron desenterradas para observarlas y descartar que esta flacidez estuviera relacionada con la pudrición de la raíz o la necrosis de haces vasculares. El tejido vegetal fue colocado en bolsas de polietileno y etiquetadas para ser transportadas al laboratorio.

Extracción de RNA y RT-PCR

of vascular bundles. The plant tissue was placed in polyethylene bags and labeled for its transportation to the laboratory.

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA extraction from collected leaves was performed with Trizol[®] method (AFGC, 2002), according to the manufacturer's instructions. The RNA obtained was employed to generate cDNA and use it to realize PCR (MMLV enzyme and Taq polymerase from Promega[®] were used) with specific primers of a segment of the hsp70 gen from PMWaV-1 (5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'/5'-CGCACAAACTTCAAGCAATC-3'), PMWaV-2 (5'-CATACGAACTAGACTCATACG-3'/5'-TCATTCCACTCACTTATCGTTG-3') and PMWaV-3 (5'-AGTTCACTGTAGATTTTCGGA-3'/5'-ATTCATGGATGTGTATCG-3'), that amplify 589, 609 and 495 bp, respectively (Sether *et al.*, 2005; Sether *et al.*, 2009). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2 % agarose gel containing ethidium bromide. As reference a molecular weight marker of 100 bp was used, the gels were visualized on a UV transilluminator Syngene[®] mod. Gene Snap. They were then purified using the Wizard SV gel and PCR clean-up system[®] and sequenced at the Institute of Biotechnology, UNAM.

Sequence analysis

Sequences were used to obtain Contigs with DNA Baser Sequence Assembler v2 (www.dnabaser.com). Contigs were after analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) of NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

The resulting sequences were compared with the 15 existing sequences found in GenBank (NCBI),

La extracción total del RNA de las hojas colectadas fue llevada a cabo con el método Trizol[®] (AFGC, 2002), según las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue usado para generar cDNA que se usó para realizar PCR (se usaron la enzima MMLV y la Taq polimerasa de Promega[®]) con indicadores específicos de un segmento del gen hsp70 de PMWaV-1 (5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'/5'-CGCACAAACTTCAAGCAATC-3'), PMWaV-2 (5'-CATACGAACTAGACTCATACG-3'/5'-TCATTCCACTCACTTATCGTTG-3') y PMWaV-3 (5'-AGTTCACTGTAGATTTTCGGA-3'/5'-ATTCATGGATGTGTATCG-3'), que amplifican 589, 609 y 495 bp, respectivamente (Sether *et al.*, 2005; Sether *et al.*, 2009). Se analizaron los productos PCR por electroforesis en un gel al 2 % de agarosa que contenía bromuro de etidio. Como referencia se usó un marcador de peso molecular de 100 bp, los geles fueron visualizados en un transiluminador UV Syngene[®] mod. Gene Snap. Luego fueron purificados usando el gel Wizard SV and PCR clean-up system[®] y secuenciados en el Instituto de biotecnología, UNAM.

Sequence analysis

Se usaron secuencias para obtener Contigs con el Ensamblador de Secuencias DNA Baser v2 (www.dnabaser.com). Los Contigs luego fueron analizados con el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de NCBI (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Las secuencias resultantes fueron comparadas con las 15 secuencias existentes halladas en el GenBank (NCBI), con los siguientes números de acceso de PMWaV-1: Cuba (HQ129930.1), Taiwán (EU769113.1), Tailandia (I583225.1 & EF620774.1), Hawai (AF414119.3)

with the following accession of PMWaV-1: Cuba (HQ129930.1), Taiwan (EU769113.1), Thailand (I583225.1 & EF620774.1), Hawaii (AF414119.3) and Australia (EF467923.1); PMWaV-2: Cuba (FN825676); PMWaV-3: Cuba (GU563497.1), Hawaii (DQ399259.2), Australia (EF488755.1 & EF467918.1), Taiwan (FJ209047.1) and Thailand (HE583227.1); PMWaV-4: USA (EU372003.1); and PMWaV- 5: Australia (EF488753.1).

In order to obtain a visual representation of sequence variability between all isolates, we determinate identity percentage; Neighbor-joining cluster analysis was used to generate rootless trees of the relationships between the 15 sequences. The data set of each of these trees was bootstrapped 1000 times.

RESULTS

During the sampling no plants with typical symptoms of pineapple mealybug wilt described or shown in photographs in different publications were observed. The most frequently observed alterations were flaccidity, chlorosis, and reddish coloration in the center of leaves (Figure 1). No mealybugs were observed in any of the collected plants as well as no visible damage or necrosis in the roots were recorded in those showing wilting.

PMWaV-1 was found in one sample (called as PMWaV-1Mexico) showing reduction of growth and irregular chlorotic spots (Figure 1J) and PMWaV-3 was present in one sample too (called as PMWaV-3Mexico) with chlorosis and reddening of lower leaves (Figure 1K), both collected at Isla, Veracruz. PMWaV-2 was not detected in any of the samples analyzed in this study. Both genomic fragments of PMWaV-1Mexico (GenBank access KC800714.1) and PMWaV-3Mexico (GenBank access KC800715.1) sequenced in this work are

y Australia (EF467923.1); PMWaV-2: Cuba (FN825676); PMWaV-3: Cuba (GU563497.1), Hawaii (DQ399259.2), Australia (EF488755.1 & EF467918.1), Taiwán (FJ209047.1) y Tailandia (HE583227.1); PMWaV-4: EEUU (EU372003.1); y PMWaV- 5: Australia (EF488753.1).

Para obtener una representación visual de la variabilidad de secuencia entre todos los aislados, determinamos porcentaje de identidad; se realizó un análisis de Neighbor-joining para generar árboles sin raíces de las relaciones entre las 15 secuencias. El conjunto de datos de cada uno de estos árboles fue remuestreado 1000 veces.

RESULTADOS

Durante el muestreo no se observaron plantas con los síntomas típicos del marchitamiento asociado al piojo harinoso de la piña descritos o ilustrados en fotografías en diferentes publicaciones. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia fueron flacidez, clorosis y una coloración rojiza en el centro de las hojas (Figura 1). No se observaron piojos harinosos en alguna de las plantas recolectadas, así como tampoco se registraron daños visibles o necrosis en las raíces en las que presentaban marchitamiento.

PMWaV-1 fue hallado en una muestra (nombrada PMWaV-1Mexico) presentando reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares (Figura 1J) y PMWaV-3 también estaba presente en una muestra (nombrada PMWaV-3Mexico) con clorosis y enrojecimiento de hojas inferiores (Figura 1K), ambas tomadas en Isla, Veracruz. PMWaV-2 no fue hallado en alguna de las muestras analizadas en este estudio. Ambos fragmentos genómicos de PMWaV-1Mexico (número de acceso KC800714.1) y PMWaV-3Mexico (número de acceso KC800715.1) secuenciados en este traba-

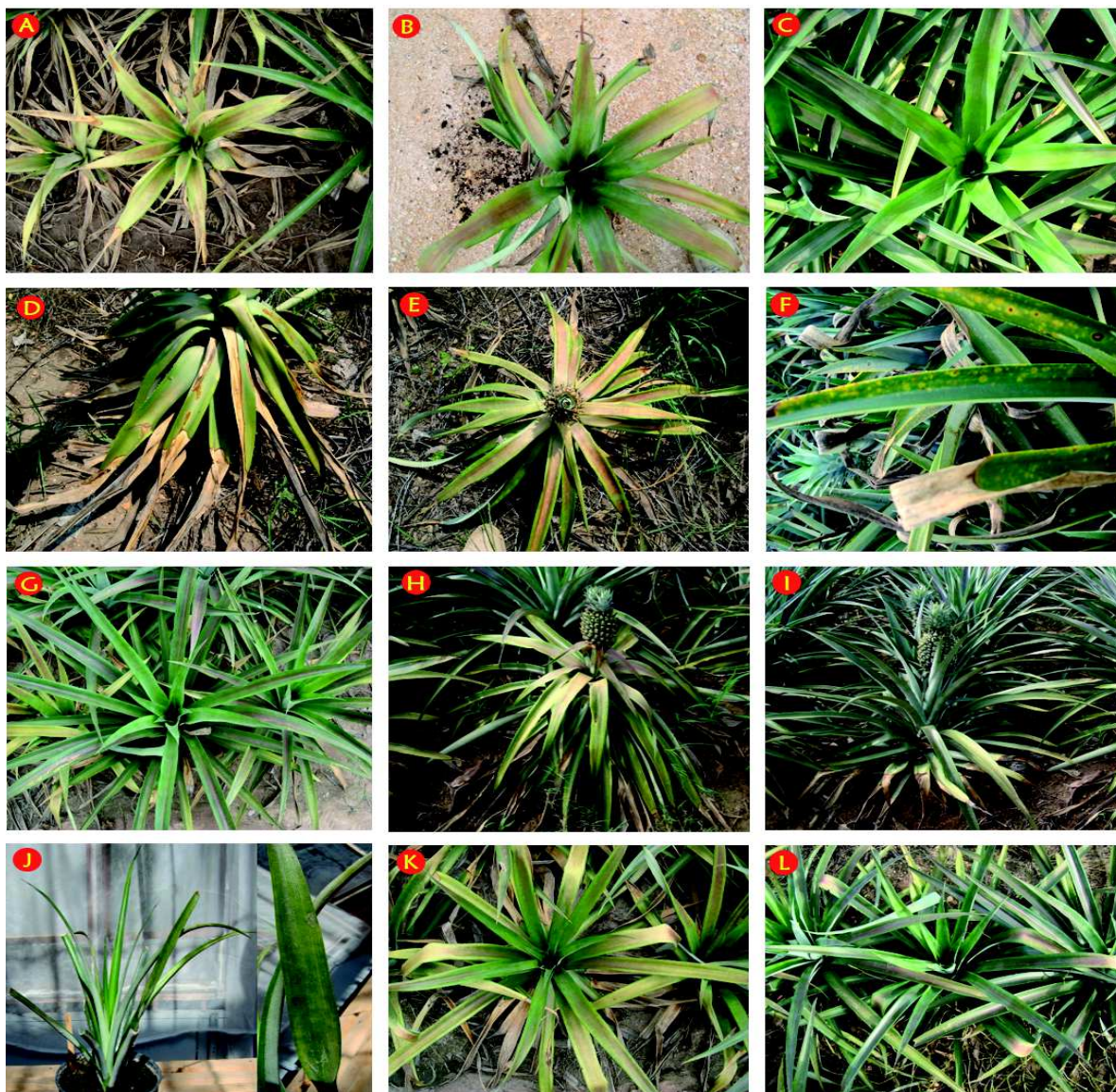


Figure 1. Pineapple plants grown in the region of El Bajo Papaloapan with putative symptoms of mealybug wilt: **A:** apex leaf necrosis, chlorosis and reddish coloration; **B:** reddish coloration in the central part of the leaves and downward curvature of the apex; **C:** Asymptomatic plant; **D:** flaccidity and apical necrosis of leaves; **E:** flaccidity, severe chlorosis and reddening of the central part of the leaves; **F:** yellow chlorotic spots, some with necrotic center; **G:** Asymptomatic plant; **H:** wilting, chlorosis in leaves of the middle part and reddening of upper leaves; **I:** Asymptomatic plant; **J:** reduction of growth and irregular chlorotic spots; **K:** chlorosis and reddening of lower leaves; **L:** reduction of growth, chlorosis of upper leaves, reddening and flaccidity of lower leaves. Plants **D** and **E** were of MD2, the rest of Cayena.

Figura 1. Plantas de piña cultivadas en la región de El Bajo Papaloapan con síntomas putativos de marchitamiento del piojo harinoso: **A:** necrosis del ápice foliar, clorosis y coloración rojiza; **B:** coloración rojiza en la parte central de las hojas y curvatura hacia abajo del ápice; **C:** planta asintomática; **D:** flacidez y necrosis de ápice foliar; **E:** flacidez, clorosis severa y enrojecimiento de la parte central de las hojas; **F:** manchas cloróticas amarillas, algunas con centro necrótico; **G:** planta asintomática; **H:** marchitamiento, clorosis en hojas de la parte central y enrojecimiento de hojas superiores; **I:** planta asintomática; **J:** reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares; **K:** clorosis y enrojecimiento de hojas inferiores; **L:** reducción del crecimiento, clorosis de hojas superiores, enrojecimiento y flacidez de hojas inferiores. Plantas **D** y **E** fueron de MD2, el resto de Cayena.

located within the hsp70 gene, which encodes the heat shock 70-like protein into the ORF 3. PMWaV-1 sequence (589pb) corresponded to the 8.386 - 8.974 positions of the genome of a Hawaiian PMWaV-1 isolate (GenBank accession AF414119), and PMWaV-3 sequence (324pb) corresponded to the 7.004 - 7.327 positions of the genome of a Hawaiian PMWaV-3 isolate (GenBank accession DQ399259.2).

The isolate PMWaV-1Mexico showed a 100 % of identity with Cuban isolate and 98 % higher than the rest of isolates, except with Australian isolate (88.6 % of identity). By the other hand, the isolate PMWaV-3Mexico showed a 95.5 % identity higher with the rest of isolates in its group, except with Thailand isolate (88.2 % of identity). Figure 2 shows the similarity of Mexican isolates in relation with those reported in GenBank used for comparison. PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico grouped with groups 1 and 3, respectively, but no with groups 2, 4 and 5.

DISCUSSION

Mealybug wilt of pineapple (MWP) is a disease characterized by a severe dieback, reddening of leaves, wilt and collapse of mature plants associated with the viruses *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) (Sether and Hu, 2000). In this study it was not observed in any of the plants analyzed the typical symptoms described in literature for MWP. PMWaV-1 was detected in a plant showing reduction of growth and irregular chlorotic spots on all leaves, especially the mature ones (Figure 1), these symptoms are different from those observed in field by Hu *et al.*, (1997) who also mentioned that a high percentage of plants with MWP are infected with PMWaV-1 while

jo se encuentran dentro del gen hsp70, que codifica la proteína de choque térmico 70 en el ORF 3. La secuencia PMWaV-1 (589pb) correspondió con las 8.386 - 8.974 posiciones del genoma de un aislado PMWaV-1 hawaiano (número de acceso AF414119), y la secuencia PMWaV-3 (324pb) correspondió con las 7.004 - 7.327 posiciones del genoma de un aislado hawaiano PMWaV-3 (número de acceso DQ399259.2).

El aislado PMWaV-1Mexico mostró un 100 % de identidad con el aislado cubano y 98 % más alto que el resto de los aislados, excepto con el aislado australiano (88.6 % de identidad). Por otra parte, el aislado PMWaV-3Mexico mostró un 95.5 % de identidad mayor con el resto de los aislados de su grupo, excepto con el aislado de Tailandia (88.2 % de identidad). La Figura 2 muestra la semejanza de los aislados mexicanos en relación con los reportados en GenBank usados para la comparación. PMWaV-1Mexico y PMWaV-3Mexico se agruparon con los grupos 1 y 3, respectivamente y no con los grupos 2, 4 y 5.

DISCUSIÓN

El marchitamiento asociado al piojo harinoso en piña (MaPHP) es una enfermedad que se caracteriza por un severo desecamiento, el enrojecimiento de las hojas, el marchitamiento y colapso de plantas maduras relacionados con los virus *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1), y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) (Sether y Hu, 2000). En este estudio no se observó en ninguna de las plantas los síntomas típicos de MaPHP descritos en la literatura. Se detectó a PMWaV-1 en una planta que presentaba reducción de crecimiento y manchas cloróticas irregulares en todas las hojas, especialmente en las maduras (Figura 1). Estos síntomas son diferentes

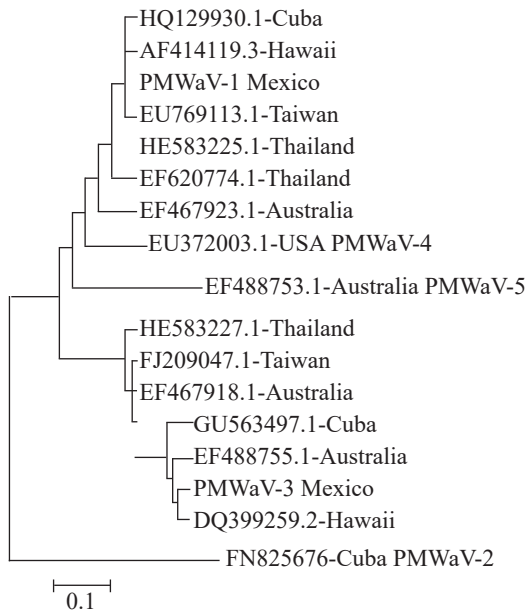


Figure 2. Neighbor-Joining tree of 17 PMWaV isolates based on partial sequences of hsp70 gene. Sequences align of isolates PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico with sequences of all PMWaV groups found in Genbank.

Figura 2. Árbol obtenido por el análisis Neighbor-Joining de aislados de 17 PMWaV basados en secuencias parciales del gen hsp70. Alineamiento de las secuencias de aislados PMWaV-1Mexico y PMWaV-3Mexico con secuencias de todos los grupos de PMWaV encontrados en Genbank.

others are asymptomatic. PMWaV-1 is limited to phloem; it is not transmitted mechanically and in field is spread by the mealybug *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). In this study did not find mealybugs in any of the sampled plants including the one that tested positive for PMWaV-1, however, this insect is a common pest in the area of study and this form of transmission in field is not discarded; it is possible that its spread may also occur in a vegetative form too (Sether *et al.*, 2005) since this virus causes asymptomatic infections (Hu *et al.*, 1997). In the area of study a reduction of the crop yield has not been observed; however, the presence of PMWaV-1 in the region can eventually affect the production if

to the observed by Hu *et al.*, (1997) quienes también mencionaron que un alto porcentaje de plantas con MaPHP están infectadas con PMWaV-1 mientras otras permaneces asintomáticas. PMWaV-1 se limita al floema; no es transmitido de manera mecánica y en el campo es transmitido por los piojos harinosos *Dysmicoccus brevipes* y *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). En este estudio no se encontraron piojos harinosos en ninguna de las plantas muestreadas, incluyendo la que dio positivo para PMWaV-1, aunque este insecto es una plaga común en el área de estudio y esta forma de transmisión en el campo no queda descartada; es posible que su propagación también pueda ocurrir en una forma vegetativa (Sether *et al.*, 2005), ya que este virus causa infecciones asintomáticas (Hu *et al.*, 1997).

En el área de estudio no se ha observado una reducción en el rendimiento del cultivo; sin embargo, la presencia de PMWaV-1 en la región podría, a la larga, afectar la producción si el manejo de los vectores y el suministro del agua no son adecuados, ya que se ha comprobado que la infección por este virus y un riego limitado producen un efecto negativo (6.7 y 4.2 %, respectivamente) y un efecto acumulativo (13.4 %) sobre el tamaño y peso de la fruta de la piña (Sether y Hu, 2001). El aislado de PMWaV-1 detectado en este estudio es similar al reportado en Cuba (Figura 2), quizá debido al mayor intercambio comercial de material propagativo entre ambos países y menos similar a los aislados de Australia y Hawai debido a diferencias en los sistemas de producción, al material vegetal cultivado y condiciones ambientales predominantes en los tres casos (Sether *et al.*, 2010).

Así como el PMWaV-1, PMWaV-3 no induce la MaPHP por sí solo ni junto con la alimentación del de piojo harinoso en Hawai (Sether *et al.*, 2005) y no se sabe cuál es el efecto en la producción de piña (Sether *et al.*, 2009). Sólo una planta de la misma localidad que mostró diferentes síntomas

vector management and water supply is neglected since it has been shown that infection by this virus and limited irrigation produce a negative effect (6.7 and 4.2 %, respectively) and an additive effect (13.4 %) on size and weight of the pineapple fruit (Sether and Hu, 2001). The isolate of PMWaV-1 detected in this study is similar to that reported in Cuba (Figure 2) due perhaps to the highest trade exchange of propagative material between the two countries and least similar to isolates from Australia and Hawaii related to differences in systems production, cultivated plant material and prevailing environmental conditions in all three cases (Sether *et al.*, 2010).

Like PMWaV-1, PMWaV-3 does not induce MWP by itself or together with the mealybug feeding in Hawaii (Sether *et al.*, 2005) and it is unknown what is its effect on the production of pineapple (Sether *et al.*, 2009). Only one plant from the same location that showed different symptoms resulted positive for PMWaV-3. This plant had a reddish coloration in the central part of the mature leaves while young ones had a dark green, and in general did not show a decrease in growth nor flaccidity. As already mentioned, mealybug wilt of pineapple (MWP) is one of the most devastating diseases of this crop worldwide and has been associated with five different ampeloviruses (designated as *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* to 5) (Gambley *et al.*, 2008). However, it has been shown that the typical symptoms of this disease are only produced when infection simultaneously occurs of *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* and feeding of *Dysmicoccus brevipes* and/or *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). In this study mealybugs were not observed and PMWaV-2 was not detected in the samples analyzed, which is similar to that reported in Hawaii where the incidence of this virus ranges from 0 to 20 % depending on the production system and the hybrid used (Sether *et al.*, 2001)

salió positivo para PMWaV-3. Esta planta tenía una coloración roja en la parte central de las hojas maduras, mientras que las jóvenes tenían una verde oscura, y en general no mostraban una reducción en el crecimiento ni flacidez. Como ya se mencionó, el marchitamiento asociado al piojo harinoso en (Ma- PHP) es una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo a nivel mundial y ha sido relacionado con cinco ampelovirus diferentes (designados como *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* al 5) (Gambley *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que los síntomas típicos de la enfermedad sólo se producen cuando ocurren simultáneamente la infección de *Pineapple mealybug wilt associated virus-2* y la alimentación de *Dysmicoccus brevipes* y/o *D. neobrevipes* (Sether *et al.*, 1998). En este estudio no se observaron piojos harinosos y no se detectó PMWaV-2 en las muestras analizadas, lo cual es similar a lo reportado en Hawaii, donde la incidencia de este virus va de 0 a 20 %, dependiendo del sistema de producción y el híbrido usado (Sether *et al.*, 2001) y puede causar pérdidas de hasta 100 % en frutas cuando está presente (Sether y Hu, 2001). Sin embargo, es necesario analizar un mayor número de muestras para conocer la situación de PMWaV-2 en el área de estudio. Como PMWaV-1 Mexico y PMWaV-3 Mexico son más distantes y menos similares a los aislados australiano y tailandés, respectivamente, podría sugerir que estos aislados tuvieron diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, sería necesario estudiar otros genes y mayor número de aislados para confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

Pineapple mealybug wilt associated virus-1 (PMWaV-1) fue detectado en una planta de la piña que presentaba reducción de crecimiento y man-

and can cause up to 100 % losses of the fruits when it is present (Sether and Hu, 2001). However, it is necessary to analyze a larger number of samples to know the situation of PMWaV-2 in the area of study. Since PMWaV-1Mexico and PMWaV-3Mexico are more distant and less similar to the Australian and Thailand isolates, respectively, it could suggest that these isolates had different geographical origins. However, it would be necessary to study other genes and largest number of isolates to confirm this hypothesis.

CONCLUSIONS

Pineapple mealybug wilt associated virus-1 (PMWaV-1) was detected in a pineapple plant showing reduction of growth and irregular chlorotic leaf spots and *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) in one plant showed a reddish coloration in the center of mature leaves. The PMWaV-1Mexico isolate is similar to one reported in Cuba and somewhat different from that of Australia and Hawaii, while PMWaV-3Mexico isolate show genetic differences with other isolates of PMWaV-3 reported in the Genbank.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank for the partial funding granted by the Comité Veracruzano de Productores de Piña A.C. for conducting this investigation.

LITERATURE CITED

AFGC. 2002. Arabidopsis functional genomics consortium. Total RNA isolation. <http://www.arabidopsis.org/portals/masc/AFGC/RevisedAFGC/site2RnaL.htm>. Revised on Sept. 09 2010.

Borroto EG, Cintra M, González J, Borroto C and Oramas P. 1998. Pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba. *Plant Disease* 82:263. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.263C>

chas cloróticas irregulares y *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) en una planta que presentó una coloración rojiza en el centro de hojas maduras. El aislado PMWaV-1Mexico es similar a uno reportado en Cuba y algo distinto de los de Australia y Hawai, mientras que el aislado PMWaV-3Mexico muestra diferencias con otros aislados de PMWaV-3 reportados en el Genbank.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al financiamiento parcial otorgado por el Comité Veracruzano de Productores de Piña A.C. para llevar a cabo esta investigación.

~~~~~ Fin de la versión en español ~~~~~

Carter W. 1945. Some etiological aspects of mealybug wilt. *Phytopathology* 35:305-315.

Gambley CF, Steele V, Geering ADW and Thomas JE. 2008. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. *Australasian Plant Pathology* 37:95-105. <http://dx.doi.org/10.1071/AP07096>

Hu JS, Sether DM, Liu XP, Wang M, Zee F and Ullman D. 1997. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. *Plant Disease* 81:1150-1154. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1150>

Sether DM, Ullman DE and Hu JS. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt associated virus by two species of mealybugs (*Dysmicoccus* spp.). *Phytopathology* 88:1224-1230. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1224>

Sether DM and Hu JS. 2000. A closterovirus and mealybug exposure are both necessary components for mealybug wilt. *Phytopathology* 90:S71. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.6.S1>

Sether DM and Hu JS. 2001. The impact of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* and reduced irrigation on pineapple yield. *Australasian Plant Pathology* 30:31-36. <http://dx.doi.org/10.1071/AP00060>

Sether DM, Karasev AV, Okumura C, Arakawa C, Zee F, Kislán MM, Busto JL and Hu JS. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different Pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Disease* 85:856-864. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.8.856>

Sether DM and Hu JS. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease.

- Phytopathology 92:928-935. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.928>.
- Sether DM, Melzer MJ, Busto J, Zee F and Hu JS. 2005. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease* 89:450-456. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0450>
- Sether DM, Melzer MJ, Borth WB and Hu JS. 2009. Genome organization and phylogenetic relationship of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* with family Closteroviridae members. *Virus Genes* 38: 414-420. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-009-0334-5>
- Sether DM, Borth WB, Melzer MJ and Hu J. 2010. Spatial and temporal incidences of Pineapple mealybug wilt-associated viruses in pineapple planting blocks. *Plant Disease* 94:196-200. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-2-0196>

# *Phytophthora cinnamomi* Rands. Pathogenicity tests in *Pseudotsuga mensiezii*

## Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*

Alejandra Almaraz-Sánchez<sup>1</sup>, Dionicio Alvarado-Rosales<sup>1\*</sup>, Gerardo Leyva-Mir<sup>2</sup>, Armando Equihua-Martínez<sup>1</sup>, Sergio Aranda-Ocampo<sup>1</sup> y Javier Hernández-Morales<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados, km 36.5 carr. México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 56230; <sup>2</sup>Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, km 38.5 carr. México-Texcoco. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 56230. Correspondencia\*dionicioyganoderma@gmail.com

Recibido: 13 de Octubre de 2015

Aceptado: 05 de Mayo de 2016

Almaraz-Sánchez A, Alvarado-Rosales D, Leyva-Mir G, Equihua-Martínez A, Aranda-Ocampo S y Hernández-Morales J. Pruebas de patogenicidad de *Phytophthora cinnamomi* Rands. en *Pseudotsuga mensiezii*. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 142-157.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1509-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1509-2)

Primera publicación DOI: 09 de mayo 2016

First DOI publication: May 9th of 2016

### RESUMEN

*Phytophthora cinnamomi* Rands es un microorganismo del suelo que ha causado grandes pérdidas económicas y ecológicas a nivel mundial, en una amplia gama de hospedantes. Es por esto que se identificó y evaluó la patogenicidad de cinco aislados de *P. cinnamomi*, procedentes de cinco regiones de México, en plantas de *Pseudotsuga mensiezii*. Los aislados se obtuvieron de suelo, raíz y canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, de El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* de

### ABSTRACT

*Phytophthora cinnamomi* Rands is a soil microorganism that has caused large economic and environmental losses worldwide in a wide array of hosts. For this reason, *P. cinnamomi* was identified and its pathogenicity was evaluated in five isolations from five different regions in Mexico on *Pseudotsuga mensiezii* plants. The isolations were taken from the soil, roots, and cankers of *Quercus salicifolia* trees, from El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* from Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* from Manántlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* from Edo. de México (EDO-T), and *Persea americana*, defrom Peribán Mich. (MICH-P). Through a morphological analysis on genus and molecular analysis on species (accession number: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) the identification of the isolations was corroborated with the molecular analyses that indicate a homology of 99 % identity with *P. cinnamomi*. Pathogenicity was tested on healthy

Manántlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga menziesii* del Edo. de México (EDO-T) y *Persea americana*, de Peribán Mich. (MICH-P). A través de un análisis morfológico a género y molecular a especie (No Accesoión: KP773290, KP773291, KP773292, KP773293, KP773294) se corroboró la identificación de los aislados con los análisis moleculares que indican una homología de 99 % de identidad con *P. cinnamomi*. La patogenicidad se probó en plantas sanas de *P. menziesii* de tres años de edad. Para cada aislado se utilizaron cinco plantas con su respectivo testigo de cinco plantas sin inocular, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero y las observaciones de síntomas se realizaron semanalmente durante ocho meses. Los resultados obtenidos indicaron que los cinco aislados de *P. cinnamomi* son capaces de infectar a las plantas de *P. menziesii*.

El aislado COL-A, de la región del Arrayanal Col., se comportó como el más patogénico, causando la muerte en un periodo más corto de las plantas a los 120 ddi, le siguieron los aislados GRO-P a los 180 ddi, JAL-C y EDO-T a los 210 ddi, y MICH-P a los 240 ddi. Para analizar los datos obtenidos en el ensayo se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis detectando diferencias estadísticas significativas de los aislados sobre el hospedante. El testigo no presentó síntoma alguno. Este es el primer reporte de *P. cinnamomi* aislado de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *P. menziesii* y *P. americana* evaluado en plantas de *P. menziesii*, donde se corrobora la patogenicidad del patógeno.

**Palabras clave:** *P. cinnamomi*, identificación; morfológica, molecular, *Pseudotsuga menziesii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

*Phytophthora cinnamomi* es un microorganismo del suelo que provoca grandes pérdidas económicas

three year old *P. menziesii* plants. Five plants were used for each isolation with its respective control of five uninoculated plants; the plants were kept under greenhouse conditions and the observations of symptoms were carried out weekly for eight months. The results obtained indicated that the five *P. cinnamomi* plants are capable of infecting the *P. menziesii* plants.

The isolation COL-A, from the area of Arrayanal Col. Behaved as the most pathogenic, causing the death, in the shortest period, of the plants after 120 ddi, followed by the isolations GRO-P at 180 ddi, JAL-C and EDO-T at 210 ddi, and MICH-P at 240 ddi. The data obtained in the test was analyzed with the Kruskal-Wallis test, finding significant differences of the isolations on the host. The control presented no symptoms. This is the first report on *P. cinnamomi* isolated from *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *P. menziesii*, and *P. americana* evaluated in *P. menziesii* plants, where the pathogenicity of the pathogen is corroborated.

**Key words:** *P. cinnamomi*, identification; morphological, molecular, *Pseudotsuga menziesii*, *Persea americana*, *Quercus* spp.

*Phytophthora cinnamomi* is a soil microorganism that causes large economic and environmental losses; it causes rotting of roots, butt, trunk, and branches. It affects many plant species in agriculture, vegetable production, and forest species, including over 1000 species and has a wide geographic distribution throughout the world (Crone *et al.*, 2013; Erwin and Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). The first description of *Phytophthora cinnamomi* was by Rands in 1922 as the cause of canker in cinammon tree trunks, in Sumatra (Erwin and Ribeiro, 1996). Since then, its damage has been reported in different



y daños ecológicos; causante de pudriciones radicales, cuello, tronco y ramas. Afecta a muchas especies de plantas en la agricultura, horticultura y especies forestales, que incluye a más de 1000 especies y cuenta con una amplia distribución geográfica, en todo el mundo (Crone *et al.*, 2013; Erwin y Ribeiro, 1996; Garbelotto *et al.*, 2006; Philip *et al.*, 2009; Zentmyer, 1980). La primera descripción de *Phytophthora cinnamomi* la realizó Rands, en 1922, como el agente causal del cancro en tallo de árboles de canelo, en Sumatra (Erwin y Ribeiro, 1996). Desde entonces sus daños se han reportado en diferentes hospedantes. En México, los primeros reportes de *P. cinnamomi* fueron realizados por Zentmyer en 1952, causando daños severos en áreas productoras de aguacate y pérdidas de hasta 90 % (Pérez, 2008; Téliz y Mora, 2007; Tamayo, 2007). Así mismo, se ha reportado en bosques naturales de *Quercus* spp, a principios del año 2000, en El Arrayanal, Col., ocasionando la muerte y daños en árboles de encino (Tainter *et al.*, 2000). Posteriormente se le encontró afectando árboles del mismo género en la Reserva de la Biosfera, en Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) y en Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 y 2008).

También se reporta que afecta árboles de *Pseudotsuga menziesii* en los estados de Jalisco, Edo. de México y Veracruz (García, 2007). Los síntomas causados por el patógeno son clorosis, defoliación, muerte de ramas, canchales en la corteza y pudrición de raíz, lo que ocasiona la muerte del árbol (Dos Santos *et al.*, 2011; Erwin y Ribeiro, 1996). La patogenicidad del género de *Phytophthora*, está influenciada por condiciones de temperatura, precipitación, humedad, textura del suelo, pH y disponibilidad de nutrientes (Shew y Benson, 1983; Balci *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2014). La patogenicidad depende del tipo de cepa y adaptación de los patógenos en la planta, y puede ser estimada por la

hosts. In Mexico, the first reports of *P. cinnamomi* were made by Zentmyer in 1952 as causing severe damages in avocado production areas, and losses of up to 90 % (Pérez, 2008; Téliz and Mora, 2007; Tamayo, 2007). Likewise, it has been reported in natural *Quercus* spp forests at the beginning of the year 2000, in El Arrayanal, Col., causing the death of, and damaging, red oak trees (Tainter *et al.*, 2000). Later, it was found to affect trees of the same genus in the Reserva de la Biosfera, in Jalisco (Davidson *et al.*, 2003) and in Tecoaapa, Gro. (Alvarado *et al.*, 2007 and 2008).

It has also been reported to affect *Pseudotsuga menziesii* trees in the states of Jalisco, Edo. de México, and Veracruz (García, 2007). The symptoms caused by the pathogen are chlorosis, defoliation, death of branches, cankers on the bark, and rotting of roots, leading to the death of the tree (Dos Santos *et al.*, 2011; Erwin and Ribeiro, 1996). The pathogenicity of the *Phytophthora* genus is influenced by temperature, humidity, soil texture, pH and nutrient availability (Shew and Benson, 1983; Balci *et al.*, 2008; Jonsson *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2014). Pathogenicity depends on the type of strain and adaptation of pathogens in the plant, and can be calculated by the speed at which the pathogen damages the host (Pariaud *et al.*, 2009; Robin and Desprez 1998).

Pathogenicity tests have been performed on *P. cinnamomi* in Mexico on avocado varieties, although there are no reports of these with *P. cinnamomi* isolations from different regions in Mexico, taken from forest species. This pathogen is a threat to both commercial and natural forest species found in other areas of the country, since the lack of awareness of this information can bring as a consequence the economic and environmental importance of the species affected. This pathogen has been identified with the use of taxonomic keys,

rapidez del patógeno en dañar al hospedante (Pariad et al., 2009; Robin and Desprez., 1998)

En México se han realizado pruebas de patogenicidad de *P. cinnamomi* en variedades de aguacate, sin embargo, no hay reportes de estas con aislados de *P. cinnamomi* procedentes de distintas regiones de México, obtenidas de especies forestales. Este patógeno representa una amenaza para especies de plantas tanto comerciales como bosques naturales, que se encuentran en otras partes del país, ya que el desconocimiento de esta información puede traer como consecuencia una importancia económica y ecológica de la especie afectada. La identificación de este patógeno ha sido a través del uso de claves taxonómicas, medios selectivos y muy recientemente se ha caracterizado empleando diferentes técnicas moleculares mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), con iniciadores específicos para cada especie obteniendo resultados importantes sobre la taxonomía, filogenia y variabilidad del hongo (Gallegly y Hong, 2008; Tsai et al., 2006; Martín et al., 2000). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar y evaluar la patogenicidad de cinco aislados de *P. cinnamomi*, procedentes de cinco regiones de México obtenidos de árboles de *Quercus elliptica*, *Q. salicifolia*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana*., en plantas de *P. mensiezii*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento del patógeno

Los aislados empleados en esta investigación se obtuvieron de suelo, raíz o canchales de árboles de *Quercus salicifolia*, de El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* de Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* de Manantlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* del Edo. de México (EDO-

selective media and has, very recently, has been characterized using different molecular techniques using PCR (Polymerase Chain Reaction), with specific indicators for each species, obtaining important results on the taxonomy, phylogeny, and variability of the fungus (Gallegly and Hong, 2008; Tsai et al., 2006; Martín et al., 2000). Due to this, the aim of this study was to identify and evaluate the pathogenicity of five *P. cinnamomi* isolations from five regions of Mexico taken from *Quercus elliptica*, *Q. salicifolia*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii*, and *Persea americana* trees, in *P. mensiezii* plants.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of the pathogen

The isolations used in this investigation were obtained from soils, roots or cankers on *Quercus salicifolia* trees from El Arrayanal, Col. (COL-A); *Quercus elliptica* from Tecoaapa, Gro. (GRO-P), *Quercus peduncularis* from Manantlán, Jal. (JAL-C), *Pseudotsuga mensiezii* from Edo. de México (EDO-T), and *Persea americana*, from Peribán Mich. (MICH-P), which were identified with a morphological analysis on the genus, and a molecular analysis on the species.

The trees displayed characteristic symptoms caused by *P. cinnamomi*, including regressive death, wilting, chlorosis, premature defoliation, cankers, and a dark colored exudate in the bark. In order to obtain the pathogen directly in the field from cankers, we used the selective medium PARPH (pimaricin-ampicilin-rifampicin-PCNB e hymexazol) (Jeffer and Martín, 1986; Erwin and Ribeiro, 1996). In the lab, the root samples were disinfected and planted in a PARPH selective medium. For the soil samples, a method of trapping

T) y *Persea americana*, de Peribán Mich. (MICH-P), los cuales fueron identificados a través de un análisis morfológico a género y molecular a especie.

Los árboles mostraban síntomas característicos que causa *P. cinnamomi*, entre estos muerte regresiva, marchitez, clorosis, defoliación prematura, canchales y exudado color oscuro en la corteza. Para obtener al patógeno directamente en campo, a partir de canchales, se utilizó medio selectivo PARPH (pimaricina-ampicilina-rifampicina-PCNB e himexazol) (Jeffer y Martín, 1986; Erwin y Ribeiro, 1996). En laboratorio las muestras de raíz, se desinfectaron y sembraron en medio selectivo PARPH. Para las muestras colectadas de suelo, se utilizó un método de trampeo con discos de camelia, una suspensión de agua suelo + raíz y medio selectivo (Almaraz *et al.*, 2013). El aislado de aguacate, fue proporcionado por el Dr. Salvador Ochoa Ascencio de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la UMSNH. El aislado de planta de aguacate se obtuvo por los síntomas característicos de la enfermedad tristeza del aguacatero por *P. cinnamomi*.

### Identificación morfológica

Las colonias obtenidas de *Phytophthora* se les realizó punta de hifa y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) y se incubaron durante siete días en oscuridad, a una temperatura de  $\pm 25$  °C (Zentmyer, 1980). Posteriormente se caracterizaron a género con base en la morfología de la colonia y estructuras de reproducción. El desarrollo de las colonias se midió diariamente de cada uno de los aislamientos, hasta que el oomiceto llenó la caja Petri. Para la producción de esporangios se realizó una suspensión de extracto de suelo + agua destilada estéril, en la cual se colocó discos de micelios de 5 mm de diámetro en cajas Petri (Romero, 1996), estas cajas se colocaron a una temperatura de  $\pm 25$  °C bajo condiciones de luz

was used with camellia discs, a water soil + root and selective medium suspension was used (Almaraz *et al.*, 2013). The avocado isolation was provided by Dr. Salvador Ochoa Ascencio of the Department of Agrobiology “Presidente Juárez” of the UMSNH. The avocado tree isolation was obtained by the characteristic symptoms of the avocado tristeza disease by *P. cinnamomi*.

### Morphological identification.

The colonies obtained from *Phytophthora* were performed at hypha point, transferred to Petri dishes with a PDA (potato-dextrose-agar) medium and incubated for 7 days in the dark at a temperature of  $\pm 25$  °C (Zentmyer, 1980). Later, were identified to genus based on the morphology of the colony and reproductive structures. The development of the colonies was measured on a daily basis from each of the isolations, until the oomycete filled the Petri dish. For the production of sporangia, a soil extract was suspended in sterile distilled water, and mycelia discs with a diameter of 5 mm in Petri dishes were placed inside them (Romero, 1996); these Petri dishes were kept at a temperature of  $\pm 25$  °C under continuous light for six days. The sporangia were observed under the microscope and each isolation was described, along with their measurements for height and length; 100 sporangia were measured from each isolation.

Once the genus of each isolation was identified, they were placed in test tubes containing PDA and mineral oil was added. All this was carried out in the Forest Pathology lab of the Colegio de Postgraduados.

### Molecular characterization

The DNA of each isolation used for the identification of species was extracted from

continua por seis días. Los esporangios se observaron al microscopio y se realizaron las descripciones de cada aislamiento así como sus mediciones de la relación largo y ancho, se midieron 100 esporangios de cada aislamiento.

Una vez identificados a género todos los aislamientos, se procedió a conservarlos en tubos de ensayo que contenían PDA agregando aceite mineral. Todo esto se realizó en el laboratorio de Patología Forestal del Colegio de Postgraduados.

### Caracterización molecular

El ADN de cada aislamiento que se utilizó para la identificación a especie se extrajo de colonias miceliales desarrolladas en medio de cultivo PDA de aproximadamente siete días de crecimiento. Para la extracción del ADN se empleó la técnica de Sambrook y Russell (2001). El ADN total obtenido se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Termoscientific).

PCR. Para realizar el análisis por PCR del ADN extraído, se amplificaron las regiones ITS con los primers ITS'5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS'4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de genes rRNA de las subunidades 18S-5.8S y 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). Para la reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 µL con la siguiente formulación: 13.22 µL de agua ultrapura estéril, 2.5 µL con solución amortiguadora de buffer 5X, 2.08 µL de MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, 2 µL dNTPs a 2.0 mM, 2 µL de cada primers a 20 ρMol, 0.2 µL de Taq-DNA polimerasa a 1.5 U y 1 µL de muestra de ADN 80 ng. La amplificación de los iniciadores se realizó en un termociclador Perkin-Elmer (Mod. CT 2400), con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización del ADN a 95 °C por 2 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min, alineación a 50 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 2 min; la extensión

mycelial colonies developed in a PDA medium with a growth of approximately seven days. For the extracion of DNA, the technique used was Sambrook and Russell (2001). The total DNA obtained was observed by electrophoresis in agarose gel at 0.8 % and quantified in a Nanodrop 1000 (Termoscientific) spectrophotometer.

PCR. To perform the analysis by PCR of the DNA extracted, we amplified the ITS regions with the primers ITS'5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS'4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) of rRNA genes of the subunits 18S-5.8S and 5.8S-28S (White *et al.*, 1990). For the PCR reaction, we used a final volume of 25 µL with the following formulation: 13.22 µL of ultrapure sterile water, 2.5 µL with a buffer solution 5X, 2.08 µL of MgCl<sub>2</sub> at 2.5 mM, 2 µL dNTPs at 2.0 mM, 2 µL of each primers at 20 ρMol, 0.2 µL of Taq-DNA polymerase at 1.5 U and 1 µL of an 80 ng DNA sample. The amplification of the primers was performed in a Perkin-Elmer (Mod. CT 2400) thermocycler, with the following program: one initial DNA denaturation cycle at 95 °C for 2 min; 30 cycles at 95 °C for 1 min, aligning at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 2 min; the final extension was at 72 °C for 10 min. The amplified fragment was purified using the KIT Quiagen® and the quality was verified by electrophoresis in agarose gel at 1 % stained with ethidium bromide. La banda se visualizó en un transilluminator (GelDoc 2000, BIO RAD®), and analyzed with the program Quantity One 4.0.3 (Sambrook and Russel, 2001). The PCR product was sent to the company Macrogen, U.S.A. for sequencing (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer).

The sequences obtained with the primers ITS5–ITS4 were aligned with those available in the genebank of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), in the U.S.A. (<http://www>.

final fue a 72 °C por 10 min. El fragmento amplificado se purificó con el KIT Quiagen® y la calidad se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La banda se visualizó en un transiluminador (GelDoc 2000, BIO RAD®), y se analizó con el programa Quantity One 4.0.3 (Sambrook y Russel, 2001). El producto de PCR se envió a la compañía Macrogen, E.U.A, para su secuenciación (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer).

Las secuencias obtenidas con los iniciadores ITS5–ITS4 se alinearon con las disponibles en el banco de genes del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), de E.U.A. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). De los valores cuantitativos generados, solo se bajaron las secuencias con el valor más alto, para su comparación con las que se obtuvieron en este estudio. Las secuencias se alinearon con Clustal W versión 1.6. y se depositaron en la base de datos del Gen Bank para obtener su número de acceso.

### Pruebas de patogenicidad

Una vez desarrolladas las colonias en medio de cultivo PDA con siete días de edad, se procedió a realizar las pruebas de patogenicidad. De cada uno de los aislamientos obtenidos se procedió a realizar las pruebas bajo condiciones de invernadero en árboles cultivados en macetas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad, con una altura de 45 a 47 cm. La inoculación se realizó con el método de disco de micelio en tallo (O’Gara *et al.*, 1996). En el punto de inoculación los tallos de plantas se limpiaron con agua destilada estéril, con una aguja de disección desinfectada con alcohol al 70 % y flameada al mechero, se realizaron 10 punciones, de cada aislado se tomaron discos de 0.5 mm de diámetro con micelio del pseudohongo crecido en medio de cultivo PDA, los cuales se colocaron en

[ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Of the quantitative values generated, only the sequences with the highest values were reduced in order to compare them with those obtained in this study. The sequences were aligned with Clustal W version 1.6. and were deposited in the database of the Gen Bank to obtain their accession number.

### Pathogenicity tests

Once the colonies were developed in the seven-day old PDA medium, the pathogenicity tests began. For each one of the isolations obtained, the tests were carried out under greenhouse conditions on three-year old *Pseudotsuga menziesii* trees planted in pots, with a height of 45 to 47 cm. The inoculation was carried out with the method of mycelium discs in the stem (O’Gara *et al.*, 1996). In the point of inoculation, the stems of the plants were cleaned with sterile distilled water, using a dissection needle disinfected with alcohol at 70 % and heated with a burner, ten punctures were performed, from each isolation, disks were taken with a diameter of 0.5 mm with a mycelium of the pseudofungus grown in a PDA medium, which were placed in the area and covered with moist sterile cotton, and covered with a gauze and parafilm tape around the stem in order to retain humidity. All this was carried out under aseptic conditions.

Five plants were inoculated for each of the isolations (repetitions), and there was a control which was only applied PDA medium, giving a total of 30 inoculated plants. Finally, each plant was covered with a plastic bag to produce conditions of relative humidity. They remained in this way for one week, and were kept at a temperature of  $\pm 25$  °C. The plants were distributed at random on tables in the greenhouse and watered every three days at field capacity. The number of days before the appearance of symptoms and death of each plant

el área y se cubrieron con algodón estéril húmedo, y se cubrió con una gasa y cinta de parafilm alrededor del tallo, con el fin de mantener la humedad. Todo esto se realizó bajo condiciones asépticas.

Se inocularon cinco plantas para cada uno de los aislamientos (repeticiones), así mismo, se contó con un testigo, al que sólo se le aplicó medio de cultivo PDA, dando un total de 30 plantas inoculadas. Finalmente, a cada planta se le cubrió con una bolsa de plástico, para generar condiciones de alta humedad relativa. Así permanecieron por una semana y se mantuvieron a una temperatura ambiente  $\pm 25$  °C. Las plantas se distribuyeron al azar sobre mesas en el invernadero y se regaron cada tercer día a capacidad de campo. Se evaluó el número de días a la aparición de los síntomas y muerte en la planta, esto se realizó semanalmente durante ocho meses, y los resultados obtenidos se sometieron a un análisis estadístico (prueba de Kruskal-Wallis) utilizando el programa SAS (SAS, 2012) para determinar el comportamiento de los aislados de *P. cinnamomi*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislamientos obtenidos de suelo, raíz y canchales de árboles de las diferentes localidades se muestran en el Cuadro 1.

### Identificación morfológica

Las cinco colonias aisladas de árboles de *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Persea americana* mostraron un crecimiento uniforme en medio de cultivo PDA observándose el crecimiento micelial de aspecto algodonoso, de color blanco, en forma de camelia (Figura 1) debido al crecimiento deprimido; micelio cenocítico, toruloso, con hifas coraloides y

was evaluated on a weekly basis for eight months, and the results obtained underwent a statistical analysis (Kruskal-Wallis test) using the program SAS (SAS, 2012) to determine the behavior of the *P. cinnamomi* isolations.

## RESULTS AND DISCUSSION

The isolations obtained from the soil, root, and cankers of the trees in different locations are shown in Table 1.

### Morphological identification

The five isolated colonies of *Q. salicifolia*, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Pseudotsuga mensiezii* and *Persea americana* trees showed a uniform growth in a PDA medium, displaying a mycelial growth with a cotton-like aspect, white colored, camellia-shaped (Figure 1) due to the depressed growth; coenocytic mycelium, torulose, with coralloid hyphae and abundant swellings, all at the genus level. This pathogen was observed to produce spherical, oval, pyriform, terminal or intercalated chlamydospores, frequently in bunches. Some authors mention that they persist in the soil for years, which constitute an organ of conservation and survival as reported by Erwin and Ribeiro (1996); Jung *et al.*, (2013) and Zentmyer *et al.*, (1996).

The measurements of the average length and width of 100 sporangia from each isolation were also taken, and they are as follows: COL-A 40.49 x 28.19, JAL-C 40.81 x 28.63  $\mu\text{m}$ , GRO-P 48.24 x 31.47  $\mu\text{m}$ , EDO-T 43.2 x 32.9  $\mu\text{m}$  and MICH 56.23 x 33.8  $\mu\text{m}$ . On the other hand, Erwin and Ribeiro (1996) report values of 75 x 40  $\mu\text{m}$ , and therefore they do not coincide with those obtained in this study. Regarding the size of the sporangia, these

**Cuadro 1.** Aislados obtenidos de *P. cinnamomi*, empleados en las pruebas de patogenicidad en plantas de *Pseudotsuga menziesii*.

**Table 1.** Isolations obtained from *P. cinnamomi*, used in the pathogenicity tests on *Pseudotsuga menziesii* plants.

| Clave   | Localidad                    | Hospedante                    | Origen<br>Suelo/Raíz/canero |
|---------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| COL – A | El Arrayanal, Col.           | <i>Quercus salicifolia</i> .  | canero                      |
| GRO – P | Tecoanapa, Gro               | <i>Quercus elliptica</i> .    | canero                      |
| JAL – C | Manantlán, Jal.              | <i>Quercus peduncularis</i> . | Suelo                       |
| MICH- P | Peribán, Mich.               | Aguacate                      | Raíz                        |
| EDO – T | Tres Encinos. Edo. de México | <i>Pseudotsuga menziesii</i>  | Suelo                       |

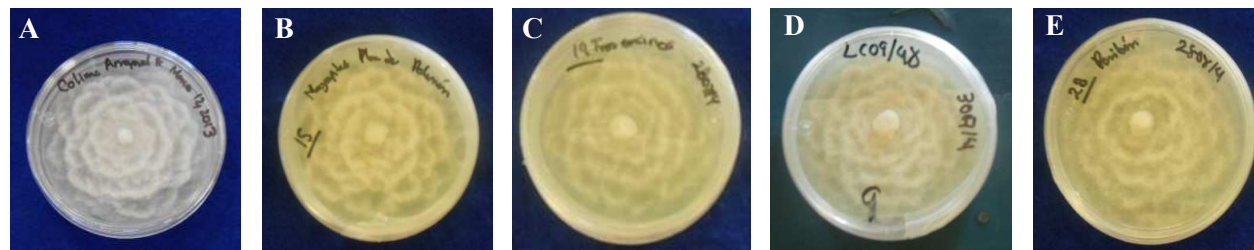
abundantes hinchamientos, todo esto a nivel de género. Se observó que este patógeno produce clamidosporas esféricas, ovales, piriformes, terminales o intercalares, frecuentemente en racimos, algunos autores mencionan que persisten en el suelo por años, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia como lo reportan Erwin y Ribeiro (1996); Jung *et al.*, (2013) y Zentmyer *et al.*, (1996).

Además, se midió el largo y ancho promedio de 100 esporangios de cada aislamiento, éstos fueron los siguientes: COL-A 40.49 x 28.19, JAL-C 40.81 x 28.63 µm, GRO-P 48.24 x 31.47 µm, EDO-T 43.2 x 32.9 µm y MICH 56.23 x 33. 8 µm, por su parte Erwin y Ribeiro (1996), reportan valores

vary depending on the weather conditions and are only produced in the soil extract (Sánchez *et al.*, 2002b). The morphological characteristics of the *P. cinnamomi* sporangia, elongated ovoids and a non-papillated apex, agree with those reported by Erwin and Ribeiro (1996), Gallegly and Hong (2008) and Waterhouse (1963).

**Molecular characterization**

The band of the product of PCR was approximately 1200 to 1500 pb (Figure 3). The results of the sequencing of each isolation were compared with the sequences reported in the gene bank (NCBI). The sequences by isolation had a



**Figura 1.** A) Colonias de los aislados heterotálicos de *P. cinnamomi* de seis días con clave: A) COL-A y siete días de edad con clave: B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C y E) MICH-P en forma de camelia desarrollándose en medio de cultivo PDA.

**Figure 1.** A) Colonies of the six-day old heterothallic *P. cinnamomi* isolations coded: A) COL-A and seven days old with the codes: B) GRO-P, C) EDO-T encinos, D) JAL-C and E) MICH-P, camellia-shaped, developing in PDA medium.

de 75 x 40 µm, por lo que no concuerdan con las obtenidas en este estudio. En cuanto al tamaño de los esporangios, estos varían con las condiciones ambientales y solo se producen en extracto de suelo (Sánchez *et al.*, 2002b). En las características morfológicas de los esporangios de *P. cinnamomi*, ovoides a elongados y ápice no papilado, concuerdan con las reportadas por Erwin y Ribeiro (1996), Gallegly y Hong (2008) y Waterhouse (1963).

### Caracterización molecular

La banda del producto de PCR fue de aproximadamente 1200 a 1500 pb (Figura 3). Los resultados de la secuenciación de cada aislado se compararon con las secuencias reportadas en el banco de genes (NCBI). Las secuencias por aislamiento tuvieron 99 % de índice de similaridad para la especie *P. cinnamomi*. Al comparar los nucleótidos de cada aislamiento e identificados morfológicamente con las reportadas en el banco de genes (NCBI), estas correspondieron a la misma especie. Esto corroboró la identificación morfológica de cada aislado (Cuadro 3).

### Pruebas de patogenicidad

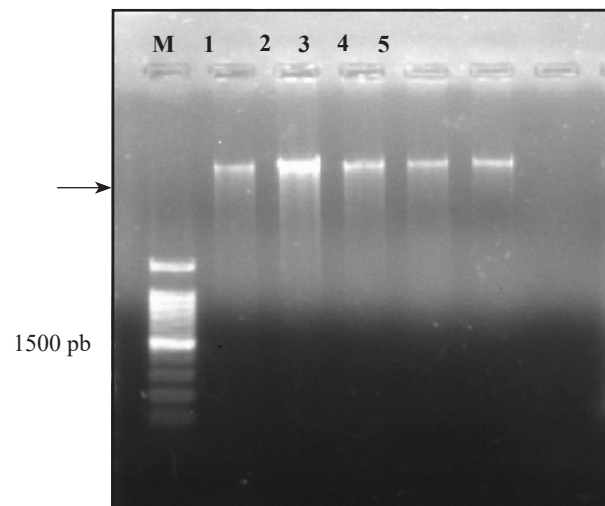
Las plantas de *Pseudotsuga mensiezii* que se les colocó el patógeno empezaron a presentar síntomas de marchitez de brotes, flacidez en las puntas, clorosis en las acículas, muerte de ramas en la base de la planta. Acompañado del desarrollo de cancro en el tallo, el cual se caracterizó por la presencia de necrosis en la epidermis del mismo y desprendimiento de la corteza, dando una coloración de color café claro a oscura.

Los aislados presentaron una patogenicidad diferente en el hospedante inoculado. El aislado COL-A del Arrayanal, Col., procedente de *Quercus salicifolia*, fue el primero en causar síntomas visi-

99 % similarity index for the species *P. cinnamomi*. When comparing the nucleotides of each isolation and morphologically identified with those reported in the gene bank (NCBI), they corresponded to the same species. This corroborated the morphological identification of each isolation (Table 3).

### Pathogenicity tests

The *Pseudotsuga mensiezii* plants that were given the pathogen began showing symptoms of sprout wilting, flaccid tips, chlorosis of the needles, death of leaves on the base of the plants, along with the growth of cankers on the stem, which was characterized by the presence of necrosis on its epidermis and detachment of the bark, giving a light to dark brown color.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % que muestra una banda de aproximadamente 1500 pb del producto amplificado por PCR con los iniciadores ITS4 e ITS5; M. Marcador molecular de 1 kb, carril 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P y 5. EDO-T.

**Figure 3.** Electrophoresis in 1% agarose gel that shows a band of approximately 1500 pb of the product amplified by PCR with the primers ITS4 and ITS5; M. 1 kb molecular marker, lane 1. COL-A., 2. GRO-P., 3. JAL-C., 4. MICH-P, and 5. EDO-T.



**Cuadro 3.** Identificación morfológica y molecular de aislados de *Phytophthora cinnamomi*, número de nucleótidos, especie alineada con el 99 % de confiabilidad y número de acceso en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

**Table 3.** Morphological and molecular identification of *Phytophthora cinnamomi* isolations, number of nucleotides, species aligned with 99 % reliability and accession number in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

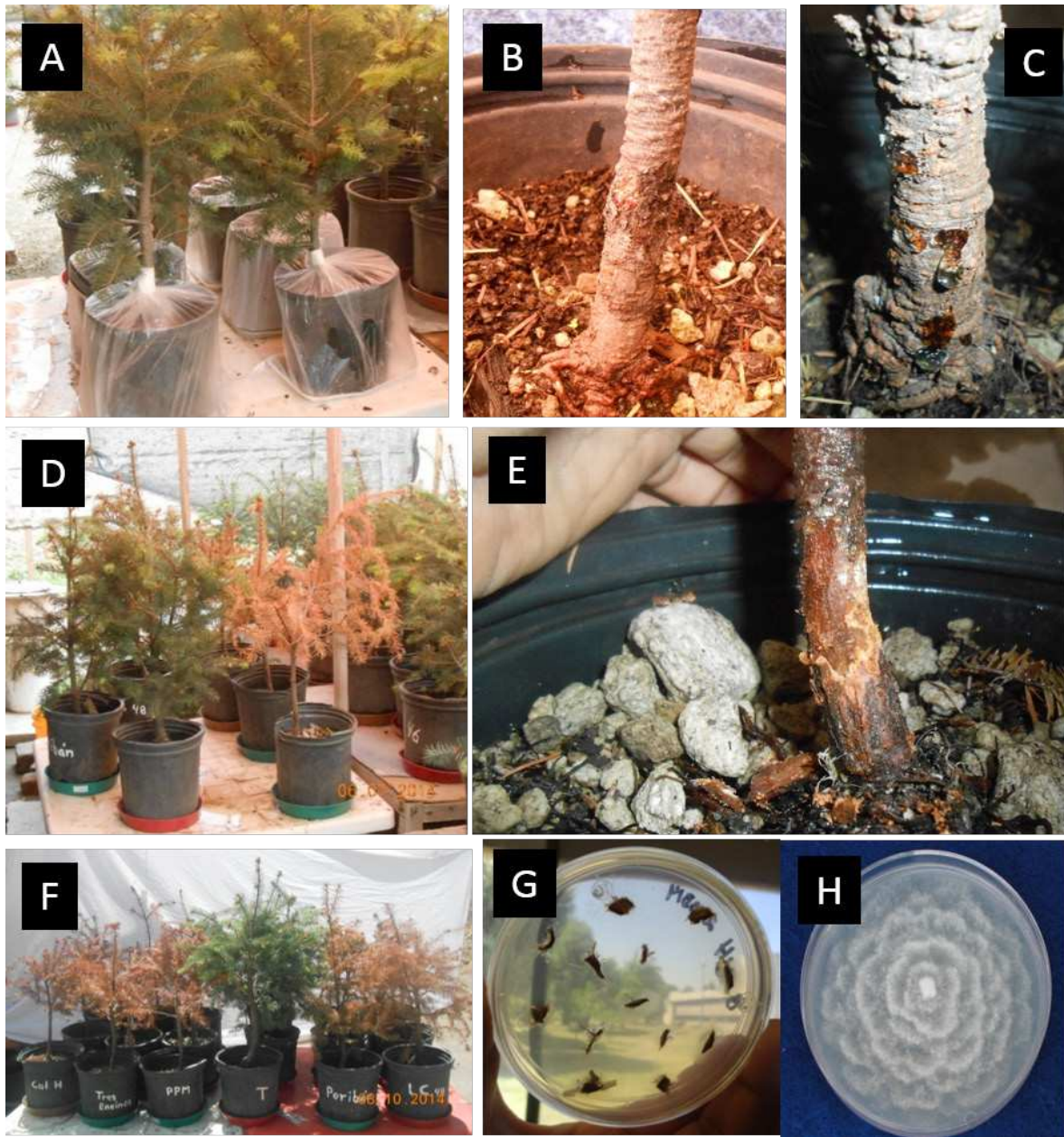
| Clave de Aislamiento | Identificación Morfológica | No. de nucleótidos | Especie alineada    | Núm. de acceso a especie alineada NCBI |
|----------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|----------------------------------------|
| Col-A                | <i>P. cinnamomi</i>        | 1046               | <i>P. cinnamomi</i> | KP773290                               |
| GRO-P                | <i>P. cinnamomi</i>        | 925                | <i>P. cinnamomi</i> | KP773291                               |
| JAL-C                | <i>P. cinnamomi</i>        | 940                | <i>P. cinnamomi</i> | KP773292                               |
| MICH-P               | <i>P. cinnamomi</i>        | 926                | <i>P. cinnamomi</i> | KP773293                               |
| EDO-T                | <i>P. cinnamomi</i>        | 952                | <i>P. cinnamomi</i> | KP773294                               |

bles a los 67 ddi y la muerte de la plantas a los 120 días después de la inoculación. Además se observó que el aislamiento procedente del El Arrayanal, Col. (COL-A) fue el primero en cubrir la caja Petri a los cinco días; así mismo, el primero en la formación de esporangios en seis días en solución de suelo. El aislado GRO-P, procedente de *Q. elliptica*, ocasionó los síntomas 93 ddi y la muerte 180 días después de la inoculación; en el caso del EDO-T, de *Pseudotsuga menziesii*, se requirieron 135 ddi lo mismo que para JAL-C, obtenido de *Q. peduncularis* y la muerte de la plantas 210, y para MICH-P, aislado de *Persea americana* 160 ddi y 240 días para la muerte (Figura 2). Los resultados anteriores muestran que todos los aislamientos fueron capaces de causar enfermedad pero el aislado COL-A se comportó como el más patogénico en las plantas de *Pseudotsuga menziesii*, por lo que fue evidente que hay variación de patogenicidad entre los aislamientos de *P. cinnamomi* de las diferentes regiones de México.

Los datos anteriores, específicamente determinan la muerte en base a patogenicidad de los aislamientos, estos resultados se sometieron a un análisis estadístico utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se obtuvieron diferencias significativas entre los aislados (P 0.0001) (Cuadro 2). El aislado

The isolations presented a different pathogenicity in the inoculated host. The isolation COL-A from Arrayanal, Col., found in *Quercus salicifolia*, was the first to cause visible symptoms at 67 ddi, and the death of plants at 120 days after inoculation. It was also observed that the isolation from El Arrayanal, Col. (COL-A) was the first to cover the Petri dish after 5 days, as well as the first to form sporangia in six days in the soil solution. Isolation GRO-P, taken from *Q. elliptica*, caused the symptoms 93 ddi and death at 180 days after inoculation; in the case of EDO-T, in *Pseudotsuga menziesii*, 135 days were required, as with JAL-C, taken from *Q. peduncularis* and for the death of plants, 210; for MICH-P, isolated from *Persea Americana*, 160 ddi and 240 days for death (Figure 2). These results show that all the isolations were able to cause a disease, yet the isolation COL-A behaved the most pathogenic in *Pseudotsuga menziesii* plants, therefore it was evident that there is a variation in pathogenicity amongst the *P. cinnamomi* isolations from the different regions in Mexico.

The above data, specifically determine death based on the pathogenicity of the isolations. These results underwent a statistical analysis using the Kruskal-Wallis test. Significant differences between isolates (P 0.0001) were obtained (Table



**Figura 2.** A) Desarrollo de síntomas en plantas de *Pseudotsuga menziesii* de tres años de edad inoculadas con los diferentes aislados de *P. cinnamomi* clave (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C, y MICH-P). B) Cancro en plantas. C) Resinación en la base del tallo. D) Progreso de la enfermedad en la planta E) Cancro de coloración café claro a oscuro causado por el aislamiento COL-A. F) Testigo y plantas inoculadas durante las pruebas de patogenicidad. G) Tejido enfermo del aislado COL-A y micelio del organismo en medio selectivo PARHP. H) Reaislamiento COL-A de *P. cinnamomi* de siete días en PDA.

**Figure 2.** A) Development of symptoms in three-year old *Pseudotsuga menziesii* plants inoculated with the different *P. cinnamomi* isolations, coded (COL-A, GRO-P, EDO-T, JAL-C, and MICH-P). B) Canker in plants. C) Sap on the base of the stem. D) Progress of the disease in the plant E) Light to dark brown canker caused by the isolation COL-A. F) Control and plants inoculated during the pathogenicity tests. G) Tissue infected with the isolation COL-A and mycelia of the organism in the selective medium PARHP. H) Reaisolation COL-A of seven-day old *P. cinnamomi* in PDA.

COL-A fue estadísticamente diferente al resto de los demás, mostrando una media de rango mayor a la de los otros.

A partir del tejido infectado de las plantas inoculadas con cada aislado, se re aisló el patógeno *P. cinnamomi*. Las plantas de *Pseudotsuga menziesii* que se emplearon como testigo no presentaron ningún síntoma. No se encontraron estudios similares en especies forestales, sin embargo, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Ceja *et al.*, (2000) en plantas de aguacate inoculadas con *P. cinnamomi* quienes observaron que el patógeno provocó marchitez en el follaje, presencia de cancro de color oscuro en tallo con una lesión interna de color café y finalmente la muerte de las plantas.

En este estudio se relacionó la sintomatología causada por los aislados en plantas de *Pseudotsuga menziesii*, la cual coincide con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996).

Por otra parte, Jordan y Tainter (1996) observaron que al inocular plantas de robles blancos y rojos, estas especies son muy susceptibles a *P. cinnamomi* y que los síntomas pueden tardar de meses a años para ser evidentes.

De igual manera, Robin y Desprez-Loustau (1998), quienes inocularon discos de agar de micelio de *P. cinnamomi* en plantas de castaño y roble rojo, probaron su patogenicidad, encontrando que todas las plantas manifestaron síntomas de amarillamiento, defoliación, agrietamientos, coloración color marrón y canchales pero con diferente nivel de virulencia. Sin embargo, Chastagner (1997), hace mención que la formación o desarrollo del cancro no siempre se forma ya que este dependerá del mecanismo del patógeno y del ambiente.

Podger (1989) por su parte, menciona que cuando utilizó 14 aislados australianos de *P. cinnamomi*, aisladas de 10 especies de plantas hospedadoras, causaron enfermedad en especies de dicotiledóneas y el síntoma principal consistió de una coloración

**Cuadro 2.** Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar número de días en síntomas y la muerte en las plantas inoculadas con los cinco aislamientos de *Phytophthora cinnamomi*.

**Table 2.** Kruskal-Wallis test to evaluate the number of days in symptoms and the deaths of plants inoculated with the five *Phytophthora cinnamomi* isolations.

| Tratamiento | Hongo               | Medias de rangos | Grupos |
|-------------|---------------------|------------------|--------|
| Testigo     | <i>P. cinnamomi</i> | 31.50            | A      |
| MICH-P      | <i>P. cinnamomi</i> | 60.68            | B      |
| EDO-T       | <i>P. cinnamomi</i> | 64.85            | B      |
| JAL-C       | <i>P. cinnamomi</i> | 64.85            | B      |
| GRO-P       | <i>P. cinnamomi</i> | 66.52            | B      |
| COL-A       | <i>P. cinnamomi</i> | 97.00            | C      |

Letras iguales no difieren significativamente entre tratamientos./ Same letters do not differ significantly between treatments.

2). The isolation COL-A was statistically different to the others, showing an average with a higher range than the others.

The pathogen *P. cinnamomi* was re-isolated from the infected tissue of the plants inoculated with each isolation. The *Pseudotsuga menziesii* plants used as a control presented no symptoms. No similar studies on forest species were found, although these results coincide with reports by Ceja *et al.*, (2000) on avocado plants inoculated with *P. cinnamomi*, who observed that the pathogen caused wilting in the foliage, dark colored cankers in the stem with a brown internal lesion, and finally the death of the plants.

This study related the symptoms caused by for the isolations in *Pseudotsuga menziesii* plants, which coincides with reports by Erwin and Ribeiro (1996).

On the other hand, Jordan and Tainter (1996) observed that inoculating white oak or red oak trees, these species are very vulnerable to *P. cinnamomi*, and that symptoms may take months or years to become evident.

anormal en raíz y finalmente la muerte. Los aislados no mostraron diferencia en su patogenicidad.

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la patogenicidad de los aislados de *P. cinnamomi* coinciden con los reportados por Huberli *et al.*, (2001), quienes encontraron que la patogenicidad de aislados australianos en plantas de *Eucalyptus marginata* y *Corymbia calophylla* mostraron tres tipos de respuesta: la primera, con alta capacidad para matar plantas, a los 59 días, después de la inoculación; la segunda, de 182, los cuales fueron considerados intermedios y la tercera, los que no inducen muerte de planta, pero son considerados los menos patogénicos.

Por su parte, Dudzinski *et al.*, (1993), encontraron diferencias entre los aislados de *P. cinnamomi* colectados en Australia inoculados en tallos de *Eucalyptus marginata*, estos autores detectaron una variación de la patogenicidad en la manifestación de síntomas, desde la inoculación hasta la muerte de la planta. Otros estudio realizado por Brasier *et al.*, (1993) menciona que *P. cinnamomi* es un patógeno agresivo en árboles de robles y que la introducción y la propagación de suelo de bosque con el patógeno puede ser un factor importante en la declinación y disminución del alcornoques en la Península Ibérica.

Por otra parte Tippett *et al.*, 1985. Evaluaron el método de inoculación por herida en 21 árboles de *Eucalyptus marginata* y con un aislamiento de *P. cinnamomi* observaron que no existe variación en la patogenicidad de *P. cinnamomi* en las plantas inoculadas.

## CONCLUSIONES

Todos los aislados de *Phytophthora* correspondieron a *P. cinnamomi* y mostraron ser patogénicos sobre *Pseudotsuga mensiezii* de los cuales el aislado COL-A fue el más patogénico.

Likewise, Robin and Desprez-Loustau (1998), who inoculated *P. cinnamomi* mycelium agar discs in chestnut and red oak trees, tested its pathogenicity and found symptoms of yellowing, defoliation, cracking, brown coloring, and cankers, but with different levels of virulence. However, Chastagner (1997), mention that the formation or development of the canker does not always take place, since it will depend on the mechanism of the pathogen and the environment.

Podger (1989), meanwhile, mentions that when he used 14 Australian *P. cinnamomi* isolations, taken from 10 species of host plants, they diseased dicotyledonous species, and the main symptom consisted of an abnormal coloring in the root, and finally death. The isolates showed no difference in their pathogenicity.

The results obtained in this study on the pathogenicity of the *P. cinnamomi* isolations coincide with those reported by Huberli *et al.*, (2001), who found that the pathogenicity of Australian isolations on *Eucalyptus marginata* and *Corymbia calophylla* plants displayed three types of responses: the first, with a high capacity to kill plants after 59 days after inoculation; the second, of 182, which were considered intermediate, and the third, which do not lead to the death of plants, but are considered the least pathogenic.

At the same time, Dudzinski *et al.*, (1993) found differences between the *P. cinnamomi* isolations collected in Australia inoculated in *Eucalyptus marginata* stems. These authors found a variation of the pathogenicity of the manifestation of symptoms, from inoculation until the death of the plant. Another study, by Brasier *et al.*, (1993) mentions that *P. cinnamomi* is an aggressive pathogen on oak trees, and that the introduction and spreading of forest soil with the pathogen may be an important factor in declining and reducing cork in the Iberian Peninsula.

Este es el primer estudio en México donde se reportan la patogenicidad de aislados de *P. cinnamomi* procedentes de diferentes lugares y hospedantes sobre *P. menziesii*.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados, por el financiamiento y aceptación para realizar mis estudios de postgrado.

#### LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales D, L de L Saavedra Romero, A Almaraz-Sánchez, B. Tlapal-Bolaños, O Trejo-Ramírez, J. M Davidson, J T Kliejunas, S W Oak, J G O'Brien, F Orozco-Torres y Quiroz-Reygadas D. 2007. Agentes asociados y su papel en la declinación y muerte de encinos (*Quercus*, Fagaceae) en el centro-oeste de México. Polibotánica 23: 1-21. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62102301>
- Alvarado-Rosales-D, L de L Saavedra y A Almaraz-Sánchez. 2008. Primer reporte de *Phytophthora cinnamomi* Rands. asociado al encino *Quercus* spp., en Tecoanapa, Guerrero, México. Agrociencia 42: 565-572. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000500008](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000500008)
- Almaraz-Sánchez-A, Alvarado-Rosales-D, Saavedra-Romero LdeL. 2013. Trampeo de *Phytophthora cinnamomi* en bosque de encino con dos especies ornamentales e inducción de esporulación. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestal y del Ambiente 19: 5-12. <http://dx.doi.org/10.5154/rchscfa.2011.09.062>
- Balci Y, S Balci, W L MacDonald, and Gottschalk K W. 2008. Relative susceptibility of oaks to seven species of *Phytophthora* isolated from oak forest soils. For. Pathol. 38:394-409. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00559.x>
- Brasier C M, Sobredo F Ferraz J F P. 1993. Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline. Plant. Pathol. 42, 140-145. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01482.x>
- Crone M McComb, J A O'Brien P A, Hardy G E St J 2013. Assessment of Australian native annual/herbaceous perennial plant species as asymptomatic or symptomatic hosts of *Phytophthora cinnamomi* under controlled conditions. For. Pathol. 245-251. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12027>
- Ceja T L F, Téliz O D, Osada K S, Morales G J L. 2000. Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea Americana* Mill. en cuatro municipios del estado de Michoacán, México. Rev. Mexi. Fitopatol. 18:79-86.
- Chastagner G A, (Eds). 1997. Christmas tree diseases, insects, and disorders in the Pacific Northwest: identification and management. Washington State University Cooperative, Pullman 156.
- Davidson J M, O'Brien, J G, S W Oak and J Kliejunas. 2003. Report on a site visit to México-Muerte del Encino. USDA

On the other hand, Tippet *et al.*, 1985 evaluated the inoculation method by injury in 21 *Eucalyptus marginata* trees, and with a treatment of *P. cinnamomi* they discovered there is no variation in the pathogenicity of *P. cinnamomi* in inoculated plants.

#### CONCLUSIONS

All *Phytophthora* isolations corresponded to *P. cinnamomi* and proved to be pathogenic on *Pseudotsuga mensiezii*, out of which the isolation COL-A was the most pathogenic.

This is the first study in Mexico to report the pathogenicity of *P. cinnamomi* isolations from different places and hosts on *P. menziesii*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Science and Technology Council (CONACYT) and the Colegio de Postgraduados for the funding and acceptance to carry out my graduate studies.

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

- Forest Service. 9 p.
- Dos Santos Á F, D J Tessmann, T C A, Alves J B Vida, and R Harakava. 2011. Root and crown rot of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) caused by *Phytophthora cinnamomi*. J. Phytopathol. 159:194-196. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01741.x>
- Dudzinski M L, Old K M, and Gibbs R.J. 1993. Pathogenic variability in Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Bot 17: 35-37. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9930721>
- Erwin D C, and O K Ribeiro. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. USA. 562 Gallegly M.E, and Hong C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. ST. Paul, MN USA. 158.
- Gallegly M E, and Hong M. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA Fingerprints. APS Press. ST. Paul, MN USA. 150 p.
- Garbelotto M, Huberli D. 2006. First report on an infestation of *Phytophthora cinnamomi* in natural oak woodlands of California and its differential impact on two native oak species. Plant Dis. 90:685 <http://dx.doi.org/10.1094/PD->

- 90-0685C
- García D S E. 2007. Pudriciones de raíz por *Phytophthora* / Root rot by *Phytophthora*. En: Cibrián T D, Alvarado R.D, y García D S E (Eds). 2007 Enfermedades forestales en México/ Forest Diseases in México. Universidad Autónoma Chapingo y CONAFOR- SEMARNAT, México; Forest Service USDA, E.U.A.; NRCAN Forest Service, Canadá y Comisión Forestal de América del Norte, CONAFOR, FAO Chapingo, México. 587.
- Huberli D, Tommerup I C, Dobrowolski M P, Calver M C, and Hardy G E St J. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycol. Res.* 105:1053-1064. [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61967-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61967-X)
- Jordan A P and Tainter F H. 1996. The susceptibility of Southern Appalachian Oaks to *Phytophthora cinnamomi*. *Department of Forest Resources, Cleson University, USA.* *Castanea* 61(4): 348-355. http://www.jstor.org/stable/4033859?seq=1#page_scan_tab_contents
- Jonsson U Jung T, Sonesson K, and Rosengren U. 2005. Relationships between health of *Quercus robur*, occurrence of *Phytophthora* species and site conditions in southern Sweden. *Plant Pathol.* 54: 502-511. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01228.x>
- Jeffer N, Martin JB. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70, 1038-1043. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-70-1038>
- Jung T, Colquhoun I J, Hardy G E St J. 2013. New insights into the survival strategy of invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in indifferent natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathol.* 43: 266-288. <http://dx.doi.org/10.1111/efp.12025>
- Martin R R, James D, Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease. *Annu Rev Phytopathol.* 38: 207-239. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.207>
- Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, y Lanou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58:409-424. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>
- O'Gara E, Hardy G E S, and Mc Comb J A. The ability of *Phytophthora cinnamomi* to infect through wounded periderm tissue of *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology* 45: 955-963. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1996.tb02906.x>
- Pérez M, 2008. Significant Avocado Diseases Caused by Fungi and Oomycetes. *The European J Plant Sci Biotechnol* 2(1):1-24. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0806/EJPSB_2\(1\)/EJPSB_2\(1\)1-24o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0806/EJPSB_2(1)/EJPSB_2(1)1-24o.pdf)
- Philip A, O'Brien Nari Williams, and Giles E St J Hardy. 2009. Critical Review in *Microbiology* 35(3): 169-181.
- Podger F D. 1989. Comparative pathogenicity of fourteen Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* determined on transplants of Tasmanian temperate heathland. *Aust.J.Bot.* 37: 491-500. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9890491>
- Robin C, and Desprez-Loustau M L. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology (Buscar abreviatura)* 104: 465-475. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008649806620>
- Romero C S. 1998. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Patronato Universitario. 347 p
- Sánchez M E, Andicoberry S, and Trapero A. 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* ssp. *ballota*. *Forest Pathol* 35: 115-125. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0329.2004.00392.x>
- Sánchez M E, Caetano P, Ferraz J, Trapero A. 2002b. *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* insouthwestern Spain. *For. Path.* 32, 5-18. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00261.x>
- Sambrook J, and Russell D W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volumen 1*, 3rd. edition. Cold spring Harbour Laboratory Press, NY. USA. 234 p.
- Shew H D, and Benso D M. 1983. Influence of soil temperature and inoculum density of *Phytophthora cinnamomi* on root rot of Fraser fir. *Plant Dis.* 67:522-524. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05_522.PDF
- SAS Intitute. 2012. GLM Procedure. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Tainter F H, O'Brien J G, Hernández A, Orozco and O Rebolledo. 2000. *Phytophthora cinnamomi* as a cause of oak mortality in the state of Colima, Mexico. *Plant Dis.* 84(4):394-398. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.394>
- Tamayo P J .2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4:52-71.
- Tsai H L, Huang L C, Ann P J, and Liou R F. 2006. Detection of orchid *Phytophthora* diseases by nested PCR. *Bot Bull. Acad. Sin.* 47: 379-387. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2006/4/Bot474-03.pdf>
- Téliz O D y Mora A J A. 2007. El manejo integral del aguacate. In Téliz, O D; Mora A. *El aguacate y su manejo integral 2a. ed*(Eds). Editorial Mundi-Prensa, Méx.D.F., p 287-306.
- Tippett J T, Hill T C, and Shearer B L. 1985. Resistance of *Eucalyptus* spp. to invasion by *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany* 33, 409-18. <http://dx.doi.org/10.1071/BT9850409>
- Thompson S E, Levin S, and Rodriguez-Iturbe I. 2014. Rainfall and temperatures changes have confounding impacts on *Phytophthora cinnamomi* occurrence risk in the southwestern USA under climate change scenarios. *Glob. Chang. Biol.* 20 1299-1312. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcb.12463/abstract>
- Waterhouse G H. 1963 Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Commonw Mycol. Inst. Kew. UK.* 92 p.
- White JCH, Bruns, TLee S, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P315-322 In: Innis, ma, Gel fand, D.H., Sninsky, J. J., White, J. J. PCR protocols A guide to methods and applications. Eds. Academic Press, Inc., New York. Pp:315-322
- Zentmyer G A. 1952. *Phytophthora cinnamomi* on avocado in México and Costa Rica and others avocado diseases in México. *Plant. Dis. Rep.* 36: 31 p.
- Zentmyer A G. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and the diseases it causes. Monograh. 10 APS.Press. St. Paul, MN. USA. 96 pp.
- Zentmyer G A, Mircetich S M. 1966. Saprophytims and persistence in soil by *Phytohthora cinnamomi*. *Phythopathology* 56:710-112.

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

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

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

Recibido: 20 de Enero, 2016

Aceptado: 01 de Mayo, 2016

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

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

Primera publicación DOI: 09 de mayo 2016

First DOI publication: May 9th of 2016

RESUMEN

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DISTRIBUTION OF THE DISEASE

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

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

DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

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

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

BIOLOGÍA DEL PATÓGENO

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

BIOLOGY OF THE PATHOGEN

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

DIAGNOSIS TECHNIQUES

Traditional techniques

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

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

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

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

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

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

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Técnicas tradicionales

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

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

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

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

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

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

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

2006).

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

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

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

called rubrifaciens (SENASICA, 2013).

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

Isolation. Biosca *et al.* (2008), obtained *Brenneria* isolations from plant material (peridermis, cortical parenchyma, exudates, and fruits). These isolations were observed after 48 h of incubation at 26 °C in a King B medium, supplemented or not with cycloheximide (used to inhibit fungal growth). The isolation can be obtained from the external or internal canker or exudate tissue, the sample can be taken from the edge between infected and apparently healthy tissue (Biosca and López, 2012). The tissue must be disinfected with sodium hypochlorite and alcohol solutions and grinded in 5 mL of sterile PBS (8 g of NaCl; 0,2 g of KH₂PO₄; 1,15 g of Na₂HPO₄, 0,2 g of KCl, pH 7.2 by 1 liter of distilled water) or sterile salt solution (SS) (0,9 % of NaCl in distilled water, pH 7,0). Later, the culture medium chosen in planted (Biosca and López, 2012; Charkhabi *et al.*, 2011). The optimum temperature for the development of the bacteria in culture media is 30 to 33 °C. Within this range and with oxygen, the bacteria fluoresces and produces a cream- to white-colored colony (SENASICA, 2013).

lamientos de *Brenneria* de material vegetal (peridermis, parénquima cortical, exudados y frutos). Dichos aislamientos fueron observados tras 48 h de incubación a 26 °C en medio B de King suplementado o no con cicloheximida (utilizado para inhibir el crecimiento de hongos). El aislamiento puede ser obtenido a partir de tejido exterior o interior del cancro y de exudados, la muestra se puede tomar del borde entre parte de tejido enfermo y parte de tejido aparentemente sano (Biosca y López, 2012). El tejido debe ser desinfectado con soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol y triturado en 5 mL de PBS estéril (8 g de NaCl; 0,2 g de KH_2PO_4 ; 1,15 g de Na_2HPO_4 , 0,2 g de KCl, pH 7.2 por 1 litro de agua destilada) o solución salina estéril (SS) (0,9 % de NaCl en agua destilada, pH 7,0). Posteriormente se siembra el medio de cultivo seleccionado (Biosca y López, 2012; Charkhabi *et al.*, 2011). La temperatura óptima para el desarrollo de la bacteria en medios de cultivo es de 30 a 33 °C. En este rango y con oxígeno la bacteria fluoresce y produce colonia crema a blanco (SENASICA, 2013).

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

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

Biochemical techniques

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

Técnicas bioquímicas

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

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

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

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

Serological techniques

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

Molecular techniques

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

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

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

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

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

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

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

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

Técnicas serológicas

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

Técnicas moleculares

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

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

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

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

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

Métodos cromatográficos

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

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

Chromatography methods

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

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

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

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

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

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

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

CONTROL

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

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

CONTROL

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

CONCLUSIÓN

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

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

CONCLUSION

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

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

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

## LITERATURA CITADA

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

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

# Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained *in vitro*

## Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*

**Sergio Ramírez-Rojas\***, Felipe de Jesús Osuna-Canizalez, Faustino García-Pérez, Jaime Canul-Ku y Alejandro Palacios-Talavera Campo Experimental Zacatepec, INIFAP. km 0.5 Carretera Zacatepec-Galeana. C.P. 62780, Col Centro Zacatepec, Morelos, Tel. 734 3430230 ext. 108 y 139; **Jesús Hernández-Romano**, Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR). Blvd. Cuauhnahuac #566, C.P. 62550, Col. Lomas del Texcal, Jiutepec, Morelos, México; **Katya Ornelas-Ocampo** y **Patricia Landa-Salgado**, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, CP 56230 México. \*Correspondencia: sergioinifap@yahoo.com.mx.

**Recibido:** 23 de Noviembre, 2016. **Aceptado:** 28 de Marzo, 2016.

Ramírez-Rojas S, Osuna-Canizalez FJ, García-Pérez F, Canul-Ku J, Palacios-Talavera A, Hernández-Romano J, Ornelas-Ocampo K y Landa-Salgado P. 2016. Identificación molecular de bacterias asociadas a plantas ornamentales producidas *in vitro*. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 173-183.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1511-3](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1511-3)

Primera Publicación DOI: 28 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 28th, 2016.

**Resumen.** En plantas ornamentales reproducidas *in vitro* en viveros del Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca perteneciente al FIRA, se detectaron síntomas de necrosamiento en hojas y tallo durante la fase de adaptación. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los agentes asociados a éstas plantas. De tejido vegetal con síntomas de necrosamiento, se obtuvieron once aislamientos bacterianos, a los que se les extrajo el ADN con el paquete correspondiente para su secuenciación. Todos los productos de PCR se secuenciaron y se analizaron con el programa Chromas Lite®. Utilizando la búsqueda de homología por BLAST se identificaron las siguientes bacterias: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia*

**Abstract.** In ornamental plants propagated *in vitro* at Tezoyuca Technology Development Center, belonging to FIRA, symptoms of necrosis on leaves and stems during the adaptation stage. The objective of this study was to isolate and to identify the agents related to these plants. Eleven bacterial isolates were obtained from necrotic leaves and stems, from which ADN was extracted using a commercial PCR kit. The PCR products were sequenced and analyzed using the Chromas Lite® program. We search for homology with BLAST after which the following bacteria were identified: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*. The last three bacteria are plant disease in phase of acclimation in ornamental plants get *in vitro*.

**Additional key words:** Potted plant, Pathogens, Molecular identification, PCR.

*tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cyripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*: son de importancia fitosanitaria en su fase de aclimatación *in vitro*.

**Palabras clave:** Plantas en contenedor, patógenos, identificación molecular, PCR.

Las plantas tienen la capacidad de reproducirse sexual o asexualmente, en el primer caso hay una mayor variabilidad en la progenie, mientras que en el segundo se obtiene descendencia genéticamente igual a la madre (Corona-Nava-Esparza y Chimal-Hernández, 2006). La técnica de propagación *in vitro* es una reproducción asexual, que explota la capacidad de cada célula vegetal para generar individuos genéticamente similares. La industria de plantas ornamentales ha empleado esta técnica para multiplicar plantas con un alto grado de uniformidad y sanidad (Rout *et al.*, 2006).

Sin embargo, las plantas obtenidas por esta técnica deben pasar por una etapa de aclimatación para salir a la plantación definitiva. En esta fase, a las plántulas obtenidas *in vitro* se les remueve el agar (medio artificial de crecimiento) y se colocan en charolas con sustrato estéril y clima controlado hasta que están listas para trasplantarse en macetas. Esta etapa es considerada crítica por la tensión a la que se someten las plantas, debido a la nueva condición, en la que ya no se les proporcionan nutrientes presentes en el medio de cultivo; la tensión generada hace que las plantas sean muy susceptibles a algunas enfermedades de tipo biótico, principalmente bacterias, hongos y esporádicamente virus.

Las bacterias son organismos microscópicos cosmopolitas que pueden habitar como saprofitos, epifitos, endófitos, simbiontes, parásitos y patógenos de animales, plantas y seres humanos. Algunas bacterias pueden comportarse como saprofitas y

Plants have the capability of reproducing sexually or asexually. In the first case, there is a greater variability in the progeny, whereas in the second case, descendants are obtained genetically equal to the mother (Corona-Nava-Esparza and Chimal-Hernández, 2006). The *in vitro* propagation technique is an asexual form of reproduction that takes advantage of the capability of peach plant cell to generate genetically similar individuals. The ornamental plant industry has used this technique to multiply plants with a high degree of uniformity and safety (Rout *et al.*, 2006).

However, the plants obtained with this technique must undergo an acclimatization stage to come out to the definitive plantation. In this phase, plantlets obtained *in vitro* have their agar (artificial growth medium) removed and are placed in trays with a sterile substrate and a controlled climate, until they are ready to be transplanted to pots. This stage is considered critical, due to the tension plants undergo, because of the new condition, in which they are not given the nutrients present in the culture medium; the tension generated makes plants very vulnerable to some biotic diseases, mainly bacteria, fungi, and sporadically, viruses.

Bacteria are cosmopolitan microscopic organisms than can live as saprophytes, epiphytes, symbionts, parasites and pathogens of animals, plants, and humans. Some bacteria can behave as saprophytes, and under some conditions, may become opportunist pathogens (Madigan *et al.*, 1997).

Potted flower-producing plants are subject to bacterial diseases frequently caused by *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., and *Pseudomonas* spp. (Daughtrey *et al.*, 2001). Each bacteria causes different symptoms in plants, which may include rotting, foliar spots, wilting, yellowing, canker, mainly (Agrios, 2005). To identify the pathogen it is necessary to carry out

bajo algunas condiciones convertirse en patógenas oportunistas (Madigan *et al.*, 1997).

Las plantas productoras de flores en maceta están sujetas a enfermedades bacterianas causadas frecuentemente por *Pectobacterium* spp., *Xanthomonas* spp., y *Pseudomonas* spp. (Daughtrey *et al.*, 2001). Cada bacteria causa diferentes síntomas en las plantas; que pueden ser pudriciones, manchas foliares, marchitez, amarillamiento y canchales, principalmente (Agrios, 2005). Para identificar el patógeno es necesario realizar un aislamiento puro a partir de micelio en el caso de hongos, y algunos exudados o flujo bacteriano en el caso de bacterias.

En el estado de Morelos, la producción de ornamentales se estima en 3000 ha con un valor estimado de la producción de 1.2 mdp por ha/año. Algunas de las especies más importantes son *Euphorbia pulcherrima*, *Bougainvillea glabra*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Rosa* spp., *Pteridium aquilinum*, *Cedrela odorata*, *Citrus limonum*, *Tulipa* spp., *Acanthocalycium* spp., *Thrinax radiata*, *Pelargonium zonale*, *Begonia x tuberhybrida*. En el estado los municipios productores más importantes son Cuautla, Jiutepec, Cuernavaca, Yautepec, Puente de Ixtla, Emiliano Zapata, Xochitepec, Jonacatepec, Temixco y Tlaquiltenango.

El Centro de Desarrollo Tecnológico Tezoyuca, perteneciente a la oficina regional del Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura (FIRA) en Morelos, se encarga de reproducir *Anthurium andreanum*, *Syngonium podophyllum*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Pteridium aquilinum*, mediante la técnica *in vitro*, las que son afectadas por enfermedades en esta fase y en la de aclimatación.

Para desarrollar un método de control de enfermedades, es necesario identificar al asociado al síntoma mediante una caracterización morfológica, bioquímica y/o molecular; siendo esta última la más importante por la precisión y rapidez con que se realiza. El objetivo principal de éste trabajo fue

a pure isolation from mycelia in the case of fungi, and some exudates or bacterial discharge in the case of bacteria.

In the state of Morelos, the production of ornamental plants is calculated in 3 000 ha with an estimated production value of 1.2 million pesos per ha/year. Some of the most important species are *Euphorbia pulcherrima*, *Bougainvillea glabra*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Rosa* spp., *Pteridium aquilinum*, *Cedrela odorata*, *Citrus limonum*, *Tulipa* spp., *Acanthocalycium* spp., *Thrinax radiata*, *Pelargonium zonale*, *Begonia x tuberhybrida*. In the state, the municipal areas with the most important production are Cuautla, Jiutepec, Cuernavaca, Yautepec, Puente de Ixtla, Emiliano Zapata, Xochitepec, Jonacatepec, Temixco, and Tlaquiltenango.

The Tezoyuca Technology Development Center, which belongs to the regional *Fideicomiso Instituido en Relación a la Agricultura* (FIRA) office in Morelos, is responsible for reproducing *Anthurium andreanum*, *Syngonium podophyllum*, *Spathiphyllum uxpanapense*, *Pteridium aquilinum* with the *in vitro* technique, which are affected by diseases in this phase and in the phase of acclimatization.

To develop a disease control method, it is necessary to identify the causal agent of the symptom by a morphological, biochemical and/or molecular characterization, the latter being the most important due to the accuracy and speed with which is it carried out. The main objective of this investigation was to identify bacteria related to the necrosis of leaves and stems in ornamental plants produced *in vitro* during the phase of adaptation by molecular methods.

In *Syngonium podophyllum*, *Philodendron* spp., *Orchidaceae* spp., *Pteridium aquilinum*, and *Spathiphyllum uxpanapense* plants reproduced *in vitro* in FIRA in the state of Morelos, with



identificar bacterias asociadas a la necrosis de hojas y tallos en plantas ornamentales producidas *in vitro* durante la fase de adaptación por métodos moleculares.

En las plantas de *Syngonium podophyllum*, *Philodendron* spp., *Orchidaceae* spp., *Pteridium aquilinum* y *Spathiphyllum uxpanapense* reproducidas *in vitro* en el FIRA del estado de Morelos, con síntomas de necrosamiento durante la fase de aclimatación, se trasladaron en bolsas estériles de plástico al laboratorio de Fitopatología del Campo Experimental Zacatepec, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, donde se procesaron para realizar el diagnóstico de los agentes etiológicos de la enfermedad.

#### **Aislamiento de cepas bacterianas de plantas ornamentales enfermas**

De cada planta enferma, se tomó una muestra de 0.1 g de la base de tallos o de hojas con alguna mancha necrótica. Se lavaron con agua de la llave y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 2 % por 1 min y se enjuagaron con agua destilada por 2 min removiendo el agua excedente con papel absorbente estéril. Cada muestra se colocó en una caja Petri con agar papa dextrosa (PDA), las muestras así tratadas se incubaron a 25 °C por 48 h. Las bacterias crecidas en este medio se re-aislaron tomando masa bacteriana con un asa de siembra y se depositaron en cajas Petri con medio NBY con nistatina a 28 °C por 48 h. Los cultivos puros se guardaron en una solución de glicerol-agua destilada 80 %, a -80 °C.

#### **Obtención de ADN bacteriano y amplificación con PCR**

De las colonias bacterianas obtenidas de las plantas ornamentales desarrolladas crecidas y aisladas

symptoms of blackening during the phase of acclimatization, were transported in sterile plastic bags to the Plant Pathology laboratory of the Zacatepec experimental field, which belongs to the National Forestry, Agricultural and Livestock Research Center, and where they were processed to carry out the diagnosis of the etiologic agents of the disease.

#### **Isolation of bacterial strains from diseased ornamental plants**

From every diseased plant, a 0.1 g sample was taken from the base of the stem or leaves with some necrotic spot. They were washed with tap water and disinfected with a 2 % sodium hypochlorite solution for 2 min, removing the excess water with sterile absorbent paper. Each sample was placed in a Petri dish with potato dextrose agar (PDA), and the samples treated in this way were incubated at 25 °C for 48 h. The bacteria grown in this medium were re-isolated, taking bacterial mass with an inoculating loop and placed in Petri dishes with an NBY medium with nystatin at 28 °C for 48 h. Pure cultures were kept in an 80 % glycerol-distilled water solution at -80 °C.

#### **Obtaining bacterial DNA and amplification with PCR**

Of the bacterial colonies obtained from the ornamental plants developed and isolated in a solid NBY-N medium for 48 h at ambient temperature (25-28 °C), a sample of bacterial mass was taken using the inoculating loop and moved into a 2 mL test tube with NBY liquid medium. The tubes were incubated while shaking for 12 h at ambient temperature. At the end of the incubation period, 1 mL of the suspension obtained was taken and centrifuged in Eppendorf tubes at 13 000 rpm for

en medio sólido NBY-N por 48 h a temperatura ambiente (25-28 °C), se tomó una muestra de masa bacteriana con el asa de siembra y se transfirió a un tubo con 2 mL de medio líquido NBY. Los tubos se incubaron en agitación por 12 h a temperatura ambiente. Al término del período de incubación, se tomó 1 mL de la suspensión obtenida, la cual se centrifugó en tubos Eppendorf a 13 000 rpm durante 1 min. Posteriormente, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en agua destilada estéril para la extracción de ADN. La extracción se realizó con un paquete de PCR (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega®, Cat. A1120) siguiendo el protocolo del fabricante. La extracción e integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa a 1 %.

Los iniciadores de la reacción de PCR fueron rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') y fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') para la amplificación de un fragmento del gen 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1991), el DNA genómico se usó como template. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Techne® PHC-3), en un volumen final de 25 µL, los cuales contenían buffer 1 X, 200 µM de dNTP's, 1,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada oligonucleótido, 1 U de enzima GoTaq (Promega, Cat. M8295) y 1 µg de DNA genómico. El programa de PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s y 72 °C 15 s, y un paso final de 72 °C por 5 min. El análisis de la PCR se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa a 1.2 % a 80 V por 35 min, utilizando 5 µL de cada muestra. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y observado en un transiluminador.

### Secuenciación de las cepas bacterianas

Todas las reacciones de PCR dispuestas para secuenciación se trataron con DNA Clean & Con-

1 min. Later, the supernatant was poured out and the pellet was resuspended in sterile distilled water for DNA extraction. The extraction was carried out with a PCR (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega®, Cat. A1120) package, following the factory protocol. The DNA extraction and integrity was verified in a 1 % agarose gel.

The initiators of the PCR reaction were rP2 (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3') y fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') for the amplification of a fragment of gene 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1991); the genomic DNA was used as a template. The reaction took place in a thermocycler (Techne® PHC-3), in a final volume of 25 µL, which contained buffer 1 X, 200 µM of dNTP's, 1,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM of each oligonucleotide, 1 U of GoTaq enzyme (Promega, Cat. M8295) and 1 µg of genomic DNA. The PCR program consisted of an initial denaturation stage at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 15 s, and 72 °C 15 s, as well as a final step of 72 °C for 5 min. The analysis of PCR was carried out by electrophoresis in agarose gel at 1.2 % a 80 V for 35 min, using 5 µL of each sample. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and observed in a transilluminator.

### Sequencing the bacterial strains

LI the PCR reactions for sequencing were treated with DNA Clean & Concentrator™-25 Kit by Zymo (Cat. D4033). Afterwards, The DNA was quantified in a nanodrop (Epoch, BioTek). The sequencing reaction consisted of 10 ng of DNA for every 100 pb, 1 µL of oligo (10 pmol), in a final volume of 16 µL. Sequencing was carried out in the UNAM Biotechnology Institute, using Perkin equipment (Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730), with the method Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el

centrator™-25 Kit de Zymo (Cat. D4033). Posteriormente, se cuantificó el DNA en un nanodrop (Epoch, BioTek). La reacción de secuenciación consistió en 10 ng de DNA por cada 100 pb, 1 µL de oligo (10 pmol), en un volumen final de 16 µL. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el equipo Perkin (Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730), mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Chromas Lite® y posteriormente, con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). De los valores cuantitativos observados, sólo se consideraron los de mayor identidad (Cuadro 1).

De las plantas ornamentales muestreadas y con síntomas de necrosis en hojas y tallos, se obtuvieron 12 aislamientos bacterianos, la mayoría de los cuales se caracterizaron por tener color blanco o crema y solo una mostró pigmentos de color rojo. Después de secuenciarlas (Figura 1) se identificaron ocho especies: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici* (Cuadro 1).

Las especies bacterianas identificadas fueron: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Erwinia rhapontici*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans* y *Pectobacterium cypripedii*. La mayoría de los géneros identificados excepto *Burkholderia*, pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que comprende varios géneros de bacterias patógenas importantes de humanos, animales y plantas (Hauben *et al.*, 1998; Young y Park, 2007). Por otra parte, *Burkholderia* pertenece a la familia

programa Chromas Lite® y posteriormente, con BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su alineamiento con la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Of the quantitative values observed, only those with the greatest identity were considered (Table 1).

Out of the ornamental plants sampled and with symptoms of necrosis on stems and leaves, 12 bacterial isolations were obtained, most of which were characterized by having a white or creamy color, and only one showed a red pigment. After sequencing them (Figure 1), eight species were identified: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans*, and *Erwinia rhapontici* (Table 1).

The bacterial species identified were: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Erwinia rhapontici*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea agglomerans*, and *Pectobacterium cypripedii*. Most of the genera identified, except for *Burkholderia*, belong to the Enterobacteriaceae family, which comprises several genera of important pathogenic human, animal, and plant bacteria (Hauben *et al.*, 1998; Young and Park, 2007). On the other hand, *Burkholderia* belongs to the *Burkholderiaceae* family. This genus is known for its adaptability to diverse habitats such as freshwater sediments and plant, animal, and human tissues. It is also used to promote plant growth, the biocontrol of plant pathogens, phytoremediation, and xenobiotic degradation (Paganin *et al.*, 2011).

*K. oryzae*, synonymous with *Enterobacter guangdongense*, *Enterobacter oryzae* (UniProt Taxonomy, 2014), has also been reported as a bacteria that fixates nitrogen in roots of rice plants (Peng *et al.*, 2009), and so far it has not been reported

**Cuadro 1.** Resultados de la identificación molecular de las bacterias aisladas en plantas ornamentales producidas *in vitro* en fase de aclimatación.

**Table 1.** Results of the molecular identification of the bacteria isolated in ornamental plants produced *in vitro* in the phase of acclimatization.

| Planta de la que se aisló    | No. Accesoión | Descripción                                                                             | Máxima identidad (%) |
|------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Singonio                     | KF479042.1    | <i>Kosakonia oryzae</i> strain P-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence             | 99                   |
| Orquídea                     | KF479042.1    | <i>Kosakonia oryzae</i> , strain P-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | 99                   |
| Cuna de moisés var. Maunaloa | FJ823047.1    | <i>Pectobacterium cypripedii</i> strain gx-104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 99                   |
| Filodendro                   | JQ659926.1    | <i>Burkholderia tropica</i> strain R8-139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence      | 100                  |
| Cuna de moisés               | KF528829.1    | <i>Serratia marcescens</i> strain JASM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence        | 99                   |
| Cuna de moisés var. Chopan   | JX215555.1    | <i>Erwinia rhapontici</i> strain ARB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence          | 100                  |
| Cuna de moisés var. Chopan   | JQ917111.1    | <i>Pantoea dispersa</i> strain B-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | 100                  |
| Helecho Boston               | JF430157.1    | <i>Pectobacterium cypripedii</i> strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence     | 100                  |
| Helecho Boston               | HM582877.1    | <i>Pantoea agglomerans</i> strain AR PSBH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence     | 99                   |
| Helecho Boston               | JF430157.1    | <i>Pectobacterium cypripedii</i> strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence     | 99                   |
| Helecho Boston               | JQ659926.1    | <i>Burkholderia tropica</i> strain R8-139 16S ribosomal RNA gene, partial sequence      | 100                  |

*Burkholderiaceae*. Este género es conocido por su adaptabilidad a diversos hábitats tales como sedimentos de agua fresca, tejidos de plantas, animales y seres humanos. También se usa para promover el crecimiento de plantas, biocontrol de patógenos de plantas, fitorremediación y degradación xenobiótica (Paganin *et al.*, 2011).

*K. oryzae* con sinónimos *Enterobacter guangdongense*, *Enterobacter oryzae* (UniProt Taxonomy, 2014), se ha reportado como una bacteria que fija nitrógeno en las raíces de arroz (Peng *et al.*, 2009), y por el momento no se tiene reportada como fitopatógena. En este mismo sentido, la bacteria *Burkholderia tropica*, también es considerada fijadora de nitrógeno, con importantes aplicaciones

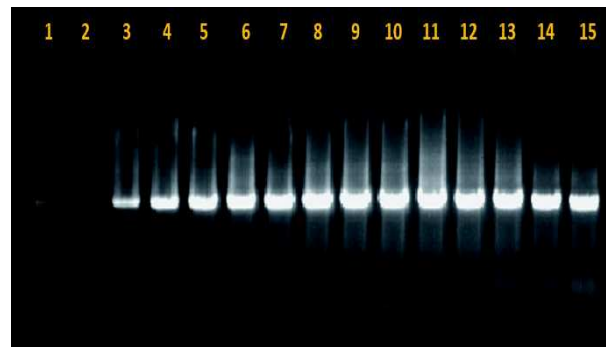
as phytopathogenic. In this same sense, the bacteria *Burkholderia tropica* is also considered nitrogen fixating, with important agro-biotechnological applications such as antifungal activity for the biocontrol of phytopathogenic fungi of agricultural interest (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013).

*P. cypripedii*, the previous name for which was *Erwinia cypripedii* (UniProt Taxonomy, 2014), produces the disease called orchid brown rot (Plantwise, 2014); it is a bacteria that affects plants such as the papaya tree (*Carica papaya*) and different types of orchids, such as the lady slipper or Venus's slipper (*Paphiopedilum*), the orchid var. Luna (*Phalaenopsis amabilis*), and others (Plantwise, 2014). It causes dark brown foliar spots,

agro biotecnológicas como la actividad antifúngica para el biocontrol de hongos fitopatógenos de interés agrícola (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013).

*P. cyripedii*, cuyo nombre anterior era *Erwinia cyripedii* (UniProt Taxonomy, 2014), produce la enfermedad llamada podredumbre café de las orquídeas (Plantwise, 2014), es una bacteria que afecta plantas como el papayo (*Carica papaya*) y diferentes tipos de orquídeas, como la zapatilla de dama o sandalia de Venus (*Paphiopedilum*), y la orquídea var. Luna (*Phalaenopsis amabilis*) entre otras (Plantwise, 2014). En la que causa manchas foliares de color café oscuro, amarillamientos de hojas, decoloración de tallos, y la muerte de la planta. En el caso de las orquídeas, la enfermedad comienza a manifestarse en forma de pequeñas lesiones húmedas, de color café con aspecto grasiento y ligeramente hundidas (Plantwise, 2014).

También se identificaron dos géneros de *Pantoea*: *P. dispersa* y *P. agglomerans*. La primera tiene potencial para usarse como control biológico contra otras bacterias como *Xanthomonas albilineans*, la cual produce escaldadura foliar en caña de azúcar (Zhang y Birch, 1997); o contra algunos hongos como *Fusarium* o *Macrophomina*, cuando la bacteria se somete a los tratamientos adecuados (Gohel *et al.*, 2004), además actúa como bioestimuladora del crecimiento vegetal (Fernández *et al.*, 2008). Mientras que *P. agglomerans*, es más conocida por infectar a varios géneros de plantas como *Alocasia cucullata*, en la cual produce manchas necróticas sobre las hojas y sus márgenes. Las manchas aparecen inicialmente como lesiones irregulares que se agrandan para formar áreas necróticas (Romeiro *et al.*, 2006). En maíz y sorgo causa tizón en la hoja y síntomas de marchitez vascular (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). En cápsulas de algodón infectadas, las fibras no maduran completamente y el tejido de la semilla muestra una coloración marrón (Ren *et al.*, 2008). En arroz causa



**Figura 1.** Fragmento amplificado de 1,500 pb del gen 16S con los oligos rP2 y fD1 con PCR. 1. Marcador de peso molecular #SM1373 (Fermentas); 2. Control negativo (reacción de PCR con agua destilada estéril); 3. Control positivo (templado del genoma de *Clavibacter* sp.); 4. *K. oryzae*; 5. *K. oryzae*; 6. *P. cyripedii*; 7. *B. tropica*; 8. *S. marcescens*; 9. *E. rhapontici/Pantoea dispersa*; 10. *P. dispersa*; 11. *P. cyripedii*; 12. *P. agglomerans/P. cyripedii*; 13. *P. cyripedii*; 14. *B. tropica*; 15. *B. tropica*.

**Figure 1.** Amplifies fragment of 1,500 pb of the gene 16S with the oligos rP2 and with PCR. 1. Molecular weight marker #SM1373 (Fermentas); 2. Negative control (reaction of PCR with sterile distilled water); 3. Positive control (genomic DNA from *Clavibacter* sp.); 4. *K. oryzae*; 5. *K. oryzae*; 6. *P. cyripedii*; 7. *B. tropica*; 8. *S. marcescens*; 9. *E. rhapontici/Pantoea dispersa*; 10. *P. dispersa*; 11. *P. cyripedii*; 12. *P. agglomerans/P. cyripedii*; 13. *P. cyripedii*; 14. *B. tropica*; 15. *B. tropica*.

the yellowing of leaves, the bleaching of stems, and the death of the plant. In the case of orchids, the disease begins presenting itself as small moist, greasy-looking, brown, and slightly sunken lesions (Plantwise, 2014).

Two genres of *Pantoea* were also identified: *P. dispersa* and *P. agglomerans*. The former has the potential to be used as a biological control against other bacteria such as *Xanthomonas albilineans*, which produces foliar scalding in sugar cane (Zhang and Birch, 1997) or against some fungi such as *Fusarium* or *Macrophomina*, when the bacteria is placed under the proper treatments (Gohel *et al.*, 2004); it also acts as a biostimulant of plant growth (Fernández *et al.*, 2008). *P. agglomerans*, on the other hand, is better known for infecting several

tizón foliar y pudrición del tallo (Lee *et al.* 2010). En el nogal (*Carya* o *Juglans*) provoca la caída prematura del fruto (Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, las dos bacterias pueden comportarse como patógenas de humanos (Cruz *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2003; Holden *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2007).

En este mismo contexto, *Serratia marcescens*, otra bacteria identificada en el presente trabajo, se caracteriza por su pigmentación de color rojo debido a la prodigiosina, un pigmento de color rojo brillante que producen ciertas cepas de *Serratia* (Gerber, 1975). Anteriormente, se consideraba solo como un patógeno oportunista que causa enfermedades en los seres humanos, como cistitis (Liu *et al.*, 2004), conjuntivitis (Hume y Willox, 2004), queratinitis (Schaefer *et al.*, 2001), meningitis (Zaidi *et al.*, 1989) y neumonía (Carlson *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1997), entre otras. Sin embargo, recientemente algunos informes muestran que esta bacteria puede provocar la enfermedad de la vid amarilla en cucurbitáceas, donde coloniza el floema de las plantas y les produce un aspecto amarillento y marchitamiento del follaje (Wick *et al.*, 2001; Bruton *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2012).

Finalmente, aunque no se observó una diferenciación al 100 % de confiabilidad, de acuerdo a la identificación molecular entre *Erwinia rhapontici* y *Pantoea dispersa*, se considera que es necesario completar más pruebas para su correcta identificación. Debido a que mientras *P. dispersa* no se considera un fitopatógeno, *E. rhapontici* si lo es, ya que causa la coloración rosa en la cubierta de algunas semillas (Schroeder *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003a; Wise *et al.*, 2008) así como la pudrición de la corona en otras plantas (Huang *et al.*, 2003b).

## CONCLUSIONES

Se detectaron ocho bacterias asociadas a plantas ornamentales enfermas en fase de aclimatación *in vitro*: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypri-*

plant genres such as *Alocasia cucullata*, in which it produces necrotic spots on leaves and their edges. The spots appear initially as irregular lesions that grow to form necrotic areas (Romeiro *et al.*, 2006). In maize and sorghum, it causes smut and symptoms of vascular wilting (Morales-Valenzuela *et al.*, 2007). In infected cotton capsules, fibers do not mature completely and the seed tissue shows a brown coloring (Ren *et al.*, 2008). In rice, it causes leaf smut and stem rotting (Lee *et al.* 2010). In walnut trees (*Carya* or *Juglans*), it causes the premature falling of the fruit (Yang *et al.*, 2011). However, the bacteria can behave as pathogens for humans (Cruz *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2003; Holden *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2007).

In this same context, *Serratia marcescens*, another bacteria identified in this study, presents a characteristically red color due to prodigiosin, a bright red pigment produced by certain strains of *Serratia* (Gerber, 1975). It used to be considered an opportunist pathogen that causes diseases in humans, such as cystitis (Liu *et al.*, 2004), conjunctivitis (Hume and Willox, 2004), keratitis (Schaefer *et al.*, 2001), meningitis (Zaidi *et al.*, 1989), pneumonia (Carlson *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1997), and others. However, some reports show that this bacterium can cause yellow vine disease in cucurbits, in which it colonizes the phloem of plants, producing a yellow color and wilting of leaves (Wick *et al.*, 2001; Bruton *et al.*, 2003; Sikora *et al.*, 2012).

Finally, although no differences were observed with 100 % reliability, according to the molecular identification between *Erwinia rhapontici* and *Pantoea dispersa*, further tests are considered necessary for its correct identification. Because *P. dispersa* is not considered a phytopathogen, *E. rhapontici* is, since it produces a pink color in the coating of some seeds (Schroeder *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003a; Wise *et al.*, 2008), as well as the rotting of the corona in other plants (Huang *et al.*, 2003b).

*pedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans* y *Erwinia rhapontici*. Las tres últimas representan un riesgo fitosanitario.

## LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth ed. Elsevier Aca. Press. 948 p.
- Bruton, B. D., F. Mitchell, J. Fletcher, S. D. Pair, A. Wayadande, U. Melcher, J. Brady, B. Bextine, and T. W. Popham. 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug-transmitted bacterium: Causal agent of cucurbit yellow vine disease. Plant Dis. 87:937-944. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.8.937>
- Carlson, G. C., P. T. Dickinson, P. L. Goldiner, A. D. Turnbull, and W. S. Howland. 1977. *Serratia marcescens* pneumonia. Arch. Surg. 112:1220-1224. <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.1977.01370100074015>
- Corona Nava-Esparza, V. y A. Chimal-Hernández. 2006. Plantas mexicanas con potencial ornamental. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), división de ciencias biológicas y de la salud. No. 60. 626 p.
- Cruz, A. T., A. C. Cazacu, and C. H. Allen. 2007. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. J. Clin. Microbiol. 45:1989-1992. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00632-07>
- Daughtrey, M. L., R. L. Wick, and J. L. Peterson. 2001. Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores. The American Phytopathol. Soc. 90 p.
- Fernández, A. I., M. Villaverde, J. A. Nicolás, A. García-Gómez, and J. Malo. 2008. *Pantoea dispersa*. Rhizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR). In VII Congreso SEAE Bullas (Murcia). [http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/ eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae\\_bullas/verdepsters/9%20P.%20FER/16%20FER%20Pantoea.pdf](http://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/ eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verdepsters/9%20P.%20FER/16%20FER%20Pantoea.pdf)
- Gerber, N. N. 1975. Prodigiosin-like pigments. CRC critical reviews in microbiology, 3: 469-485.
- Gohel, V., C. Megha, P. Vyas and H. S. Chatpar. 2004. Strain improvement of chitinolytic enzyme producing isolate *Pantoea dispersa* for enhancing its biocontrol potential against fungal plant pathogens. Ann Microbiol 54:503-515.
- Hauben, L., E. R. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Merckaert, L. Verdonck, and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. Syst. and Appl. Microbiol. 21:384-97. [http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020\(98\)80048-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0723-2020(98)80048-9)
- Holden, N., L. Pritchard, and I. Toth. 2009. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. FEMS Microbiol Rev 33: 689-703. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x>
- Huang, H. C., R. S. Erickson, L. J. Yanke, T. F. Hsieh, and R. A. A. Morrall. 2003a. First report of pink seed of

## CONCLUSIONS

Eight bacteria were found to be related to diseased ornamental plants in the phase of *in vitro* acclimatization: *Kosakonia oryzae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Burkholderia tropica*, *Serratia marcescens*, *Pantoea dispersa*, *Erwinia cypripedii*, *Pantoea agglomerans*, and *Erwinia rhapontici*. The three latter represent a phytosanitary hazard.

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

lenteil and chickpea caused by *Erwinia rhapontici* in Canada. Plant Dis. 87:1398. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2003.87.11.1398a>

- Huang, H. C., T. F. Hsieh, and R. S. Erickson. 2003b. Biology and epidemiology of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed and crown rot of plants. Plant Pathol Bull. 12:69-76. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2002.86.8.921c>
- Hume, E., and M. Willox. 2004. Aparición de *Serratia marcescens* como un patógeno de superficie ocular. Arch. Soci. Española de Oftalmol. [online]. 2004, vol.79, n.10 [citado 2014-03-24], pp. 475-481. <http://dx.doi.org/10.4321/s0365-66912004001000002>
- Khan, E. A., L. S. Wafelman, J. A. Garcia-Prats, and L. H. Taber. 1997. *Serratia marcescens* pneumonia, empyema and pneumatocele in a preterm neonate. The Pediatr Infect. Dis. J. 16:1003-1005. <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-199710000-00021>
- Lee, H. B., J. P. Hong, and S. B. Kim. 2010. First report of leaf blight caused by *Pantoea agglomerans* on rice in Korea. Plant Dis. 94:1372. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-05-10-0374>
- Liu, J. W., Y. M. Hsu, and Y. F. Huang. 2004. Independent prognostic factors for fatality in patients with urinary tract infection caused by *Serratia marcescens*. Infect. Control and Hospital Epidemiol 25:80-82. <http://dx.doi.org/10.1086/502297>
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 1997. Biología de los Microorganismos. 8a ed. Prentice Hall. Madrid, España. 1064 p. [http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924\(97\)83479-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0962-8924(97)83479-4)
- Morales-Valenzuela, G., H.V. Silva-Rojas, D. Ochoa-Martínez, E. Valadez-Moctezuma, B. Alarcón-Zúñiga, L. X. Zelaya-Molina, L. Córdova-Téllez, L. Mendoza-Onofre, H. Vaquera-Huerta, A. Carballo-Carballo, A. Farfán-Gómez, and G. Ávila-Quezada. 2007. First report of *Pantoea agglomerans* causing leaf blight and vascular wilt in maize and sorghum in Mexico. Plant Dis. 91:1365. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-91-10-1365a>
- Paganin, P., S. Tabacchioni, and L. Chiarini. 2011. Pathogenicity and biotechnological applications of the genus *Burkholderia*. Central Europ. J. of Biol. 6:997-1005. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-91-10-1365a>

- [org/10.2478/s11535-011-0072-2](http://dx.doi.org/10.2478/s11535-011-0072-2)
- Peng, G., W. Zhang, H. Luo, H. Xie, W. Lai, and Z. Tan. 2009. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *Internati. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 59:1650-1655. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-59-10-2646-b>
- Plantwise, 2014. <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=21918>.
- Ren, Y. Z., Y. Q. Liu, S. L. Ding, G. Y. Li, and H. Zhang. 2008. First report of boll rot of cotton caused by *Pantoea agglomerans* in China. *Plant Dis.* 92:1364. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-9-1364b>
- Romeiro, R. S., D. Macagnan, H. L. Mendonça, and N. J. Rodrigues. 2006. Bact. spot of Chinese taro (*Alocasia cucullata*) in Brazil induced by *Pantoea agglomerans*. *New Dis. Rep.* 14:51. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01631.x>
- Rout, G. R., A. Mohapatra, and S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 24:531-560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>
- Schaefer, F., O. Bruttin, L. Zografos, and Y. Guex-Crosier. 2001. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Brit. J. Ophthalmol.* 85:842-847. <http://dx.doi.org/10.1136/bjo.85.7.842>
- Schmid, H., S. Schubert, C. Weber, and J. R. Bogner. 2003. Isolation of a *Pantoea dispersa*-like strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Infection* 31: 66-67. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-002-3024-y>
- Schroeder, B. K., S. L. Lupien, and F. M. Dugan. 2002. First report of pink seed of pea caused by *Erwinia rhapontici* in the United States. *Plant Dis.* 86:188. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2002.86.2.188a>
- Sikora, E. J., B. D. Bruton, A. C. Wayadande, and J. Fletcher. 2012. First Report of the yellow vine disease caused by *Serratia marcescens* in watermelon and yellow squash in Alabama. *Plant Dis.* 96:761. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-09-11-0739-pdn>
- Tenorio-Salgado, S., R. Tinoco, R. Vazquez-Duhalt, J. Caballero-Mellado, and E. Pérez-Rueda. 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4:236-243. <http://dx.doi.org/10.4161/bioe.23808>
- UniProt Taxonomy. 2014. Disponible en línea: <http://www.uniprot.org/taxonomy>
- Wick R. L., J. Lerner, S. D. Pair, J. Fletcher, F. Mitchell, and B.D. Bruton. 2001. Detection of cucurbit yellow vine disease in squash and pumpkin in Massachusetts. *Plant Dis.* 85:1031. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2001.85.9.1031c>
- Wise, K. A., Y. F. Zhao, C. A. and Bradley. 2008. First Report of Pink Seed of Pea Caused by *Erwinia rhapontici* in North Dakota. *Plant Dis.* 92:315. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-2-0315a>
- Yang, K. Q., W. W. Qu, X. Liu, H. X. Liu, and L. Q. Hou. 2011. First report of *Pantoea agglomerans* causing brown apical necrosis of walnut in China. *Plant Dis.* 95:773. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-11-0060>
- Young, J. M., and D. C. Park. 2007. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial atpD, carA, and recA as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. *Syst. and Appl. Microbiol.* 30:343-354. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.002>
- Zaidi, M., J. Sifuentes, M. Bobadilla, D. Moncada, and D. L. S. Ponce. 1989. Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia and meningitis in a neonatal unit in Mexico City. *P. 14-20 In: Infection control and hospital epidemiology: The official J. of the Soc. of Hosp. Epidemiol. of America.* <http://dx.doi.org/10.1086/645909>
- Zhang, L., and R. G. Birch. 1997. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *J. of Appl. Microbiol.* 82:448-54. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00135.x>

Identification and Phylogenetic Analysis of the Leaf-galling Nematode *Orrina phyllobia* affecting *Solanum elaeagnifolium* Cav. in Guanajuato, Mexico

Identificación y Análisis Filogenético del Nematodo Foliar *Orrina phyllobia* afectando *Solanum elaeagnifolium* Cav. en Guanajuato, México

Edgar Medina Gómez, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, Distrito Federal, CP 0496, México; **Angel Ramírez Suárez***, Catedrático CONACYT-Centro Nacional de Metrología (CENAM), Km 4.5 Carretera a Los Cués, El Marqués, Querétaro, C.P. 76246, México; **Juventino Cuevas Ojeda**, Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; **Daniel Martínez Gómez**, Laboratorio de Microbiología, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, Distrito Federal, CP 0496, México.*Correspondencia: angelrasu75@huskers.unl.edu

Recibido: 11 de Enero, 2016

Aceptado: 28 de Marzo, 2016

Medina Gómez E, Ramírez Suárez A, Cuevas Ojeda J y Martínez Gómez D. 2016. Identificación y análisis filogenético del nematodo foliar *Orrina phyllobia* afectando *Solanum elaeagnifolium* Cav. en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fito patología* 34: 184-199

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1601-2](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1601-2)

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2016.

First DOI published: March 29th, 2016.

Resumen. El trompillo *Solanum elaeagnifolium* es una maleza de importancia económica afectada por enemigos naturales que podrían ser empleados como agentes de control biológico. Se detectó al nematodo agallador *Orrina phyllobia* parasitando *S. elaeagnifolium* en San Luis de la Paz, Guanajuato. Se realizó la identificación morfotaxonomica

Abstract. The silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium* is an economic importance weed affected by natural enemies that would be used as biological control agent. The leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* was detected parasitizing *S. elaeagnifolium* in San Luis de la Paz, Guanajuato. Morphotaxonomic and molecular analysis was performed on specimens extracted from foliar galls and distorted leaves. The morphometric values were in agreement with those reported by the original species description except with de Man ratios: *a* and *b*. The Polymerase Chain Reaction amplification products of two molecular markers ITS1-5.8S-ITS2 and the D2-D3 expansion segments of 28S gene were 850 and 900 bp respectively. The homology by BLASTING of the mexican population genetic sequences together with those from NCBI database showed 99% similarity with

y molecular de especímenes extraídos de agallas y deformaciones foliares. Los valores de las características morfológicas y morfométricas concordaron con los rangos reportados en la descripción original de la especie a excepción de los índices de Man: *a* y *b'*. Los productos de la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de dos marcadores moleculares ITS1-5.8S-ITS2 y los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S fueron 850 y 900 pb respectivamente. La homología por BLASTING de secuencias genéticas de la población mexicana junto con secuencias de la base de datos del NCBI mostró un 99 % de identidad con *Ditylenchus phyllobius* ($E=0.0$). La inferencia bayesiana de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal con secuencias de géneros y especies de anguinidos depositados en el GenBank indicó una clara afinidad de agrupamiento con *D. phyllobius*. La combinación de caracteres morfométricos y genéticos permitió confirmar la identidad de *Orrina phyllobia* afectando *S. elaeagnifolium* en México.

Palabras Clave: Biocontrol, nematodos, malezas, secuenciación, filogenia.

El trompillo, *Solanum elaeagnifolium* es una planta perenne de la familia Solanaceae, endémica del noreste de México y el sureste de EE.UU. (Texas y Florida) (Cuda *et al.*, 1988), se considera una planta invasora y se distribuye en casi todo el mundo (EPPO, 2007). Se considera a la región de Monterrey, Nuevo León, México, como centro de origen y evolución de esta planta con base a la gran diversidad, distribución y frecuencia de enemigos naturales que presenta (Wapshere, 1988). Es una maleza de importancia económica en varios cultivos sobre todo en agricultura intensiva del norte de la República Mexicana. También, se considera una especie ruderal como resultado de los habitats al-

Ditylenchus phyllobius ($E=0.0$). The bayesian inference of the ribosomal DNA marker ITS1-5.8S-ITS2 with sequences of genus and anguinid species uploaded in GenBank displayed a clear grouping affinity with *Ditylenchus phyllobius*. The combination of morphometric and genetic characters allowed to confirm the identity of *O. phyllobia* attacking *S. elaeagnifolium* in Mexico.

Key words: Biocontrol, nematodes, weeds, sequencing, phylogeny

The silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium* is a perennial plant from the Solanaceae family, endemic of northeast Mexico and southeast U.S.A. (Texas and Florida) (Cuda *et al.*, 1988); it is considered an invasive plant and it is distributed in almost all over the world (EPPO, 2007). The area of Monterrey, Nuevo Leon, Mexico is considered the center of origin and evolution of this plant, based on the huge diversity, distribution, and frequency of natural enemies it displays (Wapshere, 1988). It is a weed of economic importance in several crops, particularly in intensive agriculture in northern Mexico. It is also considered a ruderal species as a result of the habitats altered by human activity, and can be commonly found alongside roads, abandoned agricultural fields, and even in urban areas (Vibrans, 2009). Due to its capacity as pests and diseases reservoir, cultural management measures have been taken as part of the plant health regulation to restrict its establishment and spreading of insects and other phytophagous (DOF, 1997). Among the organisms associated to *S. elaeagnifolium* and that could be used as possible biological control agents, different orders and families of insects stand out, along with gall mites, and nematodes. The leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* (Thorne,

terados por el hombre y comúnmente se puede encontrar en orillas de carreteras, campos de cultivo abandonados, inclusive en zonas urbanas (Vibrans, 2009). Debido a la capacidad que tiene como reservorio de plagas y enfermedades, se han establecido medidas de manejo cultural como parte de la regulación fitosanitaria para restringir su establecimiento y dispersión de insectos plaga y otros fitófagos (DOF, 1997). Dentro de los organismos asociados a *S. elaeagnifolium* y que pudieran ser utilizados como posibles agentes de control biológico destacan diferentes órdenes y familias de insectos, ácaros eriófidos y nematodos. El nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* (Thorne, 1934) Brzeski, 1981 fue reportado inicialmente como *Ditylenchus phyllobius* sin. *Nothanguina phyllobia* (Orr.) y está distribuido en el sur de EE.UU. y sur de la India afectando esta maleza (Brzeki, 1991). Es un parásito obligado e induce agallas sobre las hojas, por lo que puede utilizarse como un potencial método de control biológico de *S. elaeagnifolium* (Cuda *et al.*, 1988, Wapshere, 1988, Sforza y Jones, 2007, Kwong y Sagliocco, 2012). La identificación de *O. phyllobia* está basada principalmente en caracteres morfológicos de hembras y machos (Siddiqi, 2000, Subbotin y Riley, 2012), sin embargo, debido a que existe una gran variedad de especies de nematodos anguinidos que afectan las partes aéreas, es necesario confirmar su identidad mediante procedimientos de mayor precisión basados en su información genética. En México se carece de evidencia objetiva de la presencia de este nematodo afectando esta maleza por lo que en esta investigación se propuso identificar por morfotaxonomía, su confirmación molecular y la reconstrucción filogenética de poblaciones del nematodo agallador foliar *O. phyllobia* de Guanajuato, México.

En el mes de julio del 2015 se realizó un muestreo dirigido a plantas de *S. elaeagnifolium* con deformaciones o agallas en hojas (Figura 1) presentes

1934) Brzeski, 1981, was initially reported as *Ditylenchus phyllobius* sin. *Nothanguina phyllobia* (Orr.) and is distributed in southern U.S.A and southern India, affecting this weed (Brzeki, 1991). It is an obligate parasites and induces galls on the leaves, therefore it could be used as a potential method of biological control for *S. elaeagnifolium* (Cuda *et al.*, 1988; Wapshere, 1988; Sforza, 2007; Kwong and Sagliocco, 2012). The identification of *O. phyllobia* is based mainly on morphological characters of females and males (Siddiqi, 2000, Subbotin and Riley, 2012). However, due to the large existing number of anguinid nematodes that affect the aerial parts, it is necessary to confirm its identity using more accurate procedures based on their genetic information. In Mexico there is not enough evidence of the presence of this nematode affecting this weed, therefore this research set out to identify by morphotaxonomy, its molecular confirmation and the phylogenetic reconstruction populations of leaf-galling nematode *O. phyllobia* from Guanajuato, Mexico.

In July, 2015, *S. elaeagnifolium* plants with deformations or galls on leaves were sampled (Figure 1) in random maize plots (<5 ha) and specific points in urban areas such as highways and roadsides. A total of 12 samples were taken in the municipal area of San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico between coordinates: 21° 16' 24.39" N, 100° 29' 35.17" W, and 21° 18' 33.41" N, 100° 31' 39.32" W. Samples were kept in damp paper to preserve the humidity and the integrity of the specimens and kept in refrigeration at 4 °C ± 2. *S. elaeagnifolium* leaves with deformities and galls were dissected and incubated in sterile distilled water at 22 °C ± 2 to promote the emergence of the different biological stages (eggs, second-stage juveniles (J₂), males and females). For the morphological study, the nematodes (males and females) were transferred onto a drop of water on a



Figura 1. Síntomas causados por el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* en trompillo *Solanum elaeagnifolium*. (A), (B) y (C) distorsión y agallamiento de hojas; (D) Agallamiento en la inflorescencia.

Figure 1. Symptoms caused by the leaf-galling nematode *Orrina phyllobia* in silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium*. (A), (B) and (C) leaf distortion and galling; (D) Galling in inflorescence.

en parcelas aleatorias de maíz (< de 5 ha) y puntos localizados de zonas urbanas como orillas de carreteras y caminos. Se colectaron un total de 12 muestras en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México entre las coordenadas geográficas: 21° 16' 24.39" N, 100° 29' 35.17" W y 21° 18' 33.41" N, 100° 31' 39.32" W. Las muestras se conservaron en papel humedo para conservar la humedad e integridad de los especímenes y mantenidas en refrigeración a 4 °C ± 2. Las hojas deformadas y con agallas de *S. elaeagnifolium* se disectaron e incubaron en agua destilada estéril a 22 °C ± 2 para

microscope slide, were heated with an alcohol burner and mounted in a 2 % water-agar medium (Esser, 1986). The specimens were examined in a Carl Zeiss compound microscope with a phase contrast adapted with a micrometer and a digital camera, measures were taken of the main morphometric characters of males and females. The following characters were considered: L=body length; stylet length, spicule, bursa, and gubernaculum, as well as the De Man ratio: a =body length/maximum body width; b =body length/oesophagous length; b' =body length/distance of the anterior region to

favorecer la emergencia de los diferentes estadios biológicos (huevos, juveniles de segundo estadio (J_2), machos y hembras). Para el estudio morfológico, los nematodos (machos y hembras) se transfirieron a una gota de agua sobre un porta objetos, se relajaron en calor con la ayuda de un mechero de alcohol y se montaron en medio agua-agar 2 % (Esser, 1986). Los especímenes se examinaron en un microscopio compuesto con contraste de fases Carl Zeiss adaptado con un micrómetro y cámara digital, se tomaron mediciones de los principales caracteres morfométricos de machos y hembras. Se consideraron los siguientes caracteres: L=longitud del cuerpo; longitud del estilete, espícula, bursa y gobernáculo así como los índices De Man: a =longitud del cuerpo/anchura máxima del cuerpo; b =longitud del cuerpo/longitud del esófago; b' =longitud del cuerpo/distancia de la región anterior al post corpus; c = longitud del cuerpo/longitud de la cola; c' =longitud de la cola/ancho del cuerpo a nivel del ano; V =distancia región anterior-vulva; V' =distancia de la región anterior a la vulva/región anterior al ano X 100. Se realizó una comparación morfotaxonomía de los valores obtenidos con los reportados por Brzeski, 1991; Nickle, 1991; Subbotin and Riley, 2012. Para la realización de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), machos y hembras se fijaron en solución formol-glicerol 8:2, por un periodo mínimo de 24 h y se realizaron cinco lavados con solución sorensen (cacodilato de sodio 0.1 M y pH=7.0) cada 15 min. En una campaña de extracción se colocaron 500 μ l de tetraóxido de osmium 1 % por 2 h, se decantó y se volvieron a efectuar cinco lavados con solución sorensen (Eisenback, 1985). Posteriormente se deshidrataron en gradientes de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %). Se colocaron los especímenes en sobres de papel filtro y se introdujeron a una cámara de secado de punto crítico Quorum-Emitech K850 (Eisenback, 1986). Una vez terminado el proceso de secado se colocan los especímenes en discos porta

the post corpus; c = body length/anus level; c' =tail length/width of body at anus level; V =distance region anterior-vulva; V' =distance of region anterior to vulva/region anterior to the anus X 100. A morphotaxonomic comparison was carried out of the values reported by Brzeski, 1991; Nickle, 1991; Subbotin and Riley, 2012. To perform the Scanning Electron Microscopy (SEM), males and females were fixed in a formalin-glycerol solution 8:2 for a period of at least 24 h and washed five times with Sorensen's buffer (sodium cacodylate 0.1 M and pH=7.0) every 15 min. In an fume extraction, 500 μ l 1 % osmium tetroxide were placed and kept for 2 h; it was poured out and washed another five times with Sorensen's buffer (Eisenback, 1985). Later, they were dehydrated in gradients of ethanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %). The specimens were placed in filter paper envelopes and placed in a Quorum-Emitech K850 critical point dryer (Eisenback, 1986). Once the drying process was completed, the specimens were placed on disc-shaped sample carriers and observed under a Zeiss Sigma VP scanning electron microscope.

The DNA extraction from individual J_2 , male and female specimens was carried out using the method proposed by Williams *et al.*, 1992 and Thomas *et al.*, 1997 using the specimens previously analyzed by morphotaxonomy. The nematodes were placed individually in 10 μ l of lysis buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05 % gelatin) over a coverslip. The specimen was macerated with the tip of a micropipette with the aid of a stereoscopic microscope and the buffer extraction-nematode solution was mixed. The solution was recovered and transferred into a 200 μ l microcentrifuge tube and frozen at -40 °C for 30 min. After the time of freezing, samples were incubated at 65 °C for 1 h, shaking at least once, and then adding 0.1 μ l of Proteinase K (60 μ g/m) in the final 10-15 min. It was incubated at 95 °C for 15 min, to make the

muestra y se observaron en un microscopio de barrido marca Zeiss Sigma VP.

La extracción de ADN a partir de especímenes individuales de J_2 , machos y hembras se realizó a través del método propuesto por Williams *et al.*, 1992 y Thomas *et al.*, 1997 utilizando los especímenes previamente analizados por morfotaxonomía. Los nematodos se colocaron individualmente en 10 μ l de solución amortiguadora de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.45 % Tween 20; 0.05% gelatina) sobre un cubreobjetos. Se maceró el espécimen con una punta de micropipeta con ayuda del microscopio estereoscópico y se mezcló la solución amortiguadora de extracción-nematodo. Se recuperó la solución y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 200 μ l y congeló a -40 °C por 30 min. Pasado el tiempo de congelación, las muestras se incubaron a 65 °C por 1 h agitando al menos una vez y se agregó 0.1 μ l de Proteinasa K (60 μ g/m) en los últimos 10-15 min. Se incubó a 95 °C por 15 min para inactivar la Proteinasa K y se conservó a -20 °C. Para la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) se amplificaron dos marcadores moleculares: 1. La región del ITS1-5.8S-ITS2 del ADN utilizando los iniciadores AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) y TW81 (3'-ATATGCTTAAAGTTCAGCGGGT-5') (Howlett *et al.*, 1992). 2. La amplificación de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S con los iniciadores D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') y D3B (3'-TCGGAAGGAAC-CAGCTACTA-5') (Nunn,1992). La reacción de la PCR para los iniciadores AB28 y TW81 se realizó en un volumen final de 50 μ l con los siguientes componentes: 5 μ l de solución amortiguadora de PCR 10X, 3 μ l de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l mix de DNTP's 10 mM, 2 μ l de cada iniciador a 10 μ M, 0.5 μ l de Taq polimerasa 5 U/ μ l, 5 μ l de extracción de ADN y 31.5 μ l de H_2O libre de ADNAsas y ARNAsas.

Proteinase K inactiva, and stored at -20 °C. For the polymerase chain reaction (PCR), two molecular markers were amplified: 1. The region of the ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA using the primers AB28 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') (Joyce *et al.*, 1994) and TW81 (3'-ATATGCTTAAAGTTCAGCGGGT-5') (Howlett *et al.*, 1992). 2. The amplification of the expansion segments D2-D3 of gene 28S with the primers D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') and D3B (3'-TCGGAAGGAAC-CAGCTACTA-5') (Nunn,1992). The PCR reaction for primers AB28 and TW81 was carried out in a final volume of 50 μ l with the following components: 5 μ l of PCR buffer solution PCR 10X, 3 μ l of $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ l mix of DNTP's 10 mM, 2 μ l of each primer 10 μ M, 0.5 μ l of Taq polymerase 5 U/ μ l, 5 μ l of DNA extraction, and 31.5 μ l of H_2O , free of DNAses and RNAses. The thermocycling conditions included an initial stage of denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 0.45 min, 57 °C for 0.30 min, and 72 °C for 1.30 min, finishing with one cycle at 72°C for 5 min (Skantar *et al.*, 2007). The PCR reaction for primers D2A and D3B included 5 μ l of PCR buffer solution 10X, 3 μ l of $MgCl_2$ 50mM, 1 μ l mix of DNTP's 10mM, 2 μ l of each initiator 10 μ M, 0.5 μ l of Taq polymerase 5U/ μ l, 5 μ l of DNA extraction ADN and 31.5 μ l of H_2O , free of DNAses and RNAses. The conditions for the amplification were as follows: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 0.45 min, 55 °C for 0.45 min, and 72 °C for 1 min, and finally, one cycle at 72 °C for 5 min (Vovlas *et al.*, 2011). An i-Cycler (BIORAD) thermocycler was used for all reactions. The amplified products were analyzed by horizontal electrophoresis 1.4 % using agarose gels in a buffer solution 1X TAE, dyed with GelRed and visualized in a Gel Doc EZ (BIORAD) photodocumentation. The PCR products were sequenced using Sanger

Las condiciones de termociclaje incluyeron una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 0.45 min, 57 °C durante 0.30 min y 72 °C durante 1.30 min, y finalizando con un ciclo a 72 °C durante 5 min (Skantar *et al.*, 2007). La reacción de la PCR para los iniciadores D2A y D3B comprendió 5 µl de solución amortiguadora de PCR 10X, 3 µl de MgCl₂ 50mM, 1 µl mix de dNTP's 10mM, 2 µl de cada iniciador 10 µM, 0.5 µl de Taq polimerasa 5U/µl, 5 µl de extracción de ADN y 31.5 µl de H₂O libres de ADNAsas y ARNAsas. Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 0.45 min, 55 °C durante 0.45 min y 72 °C durante 1 min, y finalmente con un ciclo a 72 °C durante 5 min (Vovlas *et al.*, 2011). Se utilizó un termociclador i-Cycler (BIO-RAD) para todas las reacciones. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis horizontal utilizando geles de agarosa al 1.4 % en solución tampón 1X TAE, teñidos con GelRed y visualizados en un fotodocumentador Gel Doc EZ (BIORAD). Los productos de la PCR fueron secuenciados mediante tecnología Sanger, ensamblados y editados con el programa CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Corporation, Centerville, Massachusetts). Durante la edición de los electroferogramas fue importante revisar manualmente los posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia de ADN y se eliminaron los iniciadores.

Obtenidas las secuencias de poblaciones mexicanas, se realizó la búsqueda de homología con secuencias del GenBank (NCBI), utilizando el algoritmo BLAST para comprobar si las secuencias generadas de los nematodos que causan agallas en *S. elaeagnifolium* pudieran ser similares o iguales a otras secuencias reportadas. Las secuencias de ambos marcadores moleculares de las poblaciones mexicanas junto con otras secuencias del GenBank se sometieron a una alineación múltiple con la op-

technology, assembled, and edited using the program CodonCode Aligner 4.2.7 (CodonCode Corporation, Centerville, Massachusetts). During the editing of the electroferograms, it was important to manually check for possible errors in the reading of the nitrogenated bases of the DNA sequence, and primers were eliminated.

Once the sequences were obtained for Mexican populations, the search was carried out for homology with sequences of GenBank (NCBI), using the BLAST algorithm to check if the sequences generated of the nematodes that cause galls in *S. elaeagnifolium* are similar or equal to other sequences reported. The sequences of both molecular markers of the Mexican populations and other GenBank were analyzed by multiple alignment with Clustal W (Thompson *et al.* 1994). The search for the best substitution model for both markers was performed with Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) and PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998). The phylogenetic analysis for both markers was carried out using Bayesian inference with MrBayes v3.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), with the model GTR+G, with a random starting tree and it was run with the Monte Carlo Markov Chain (MCMC) for 1x10⁶ generations, taking samples at intervals of 100. Two runs were performed for each analysis. After discarding burn-in samples and the evaluation of the convergence, the remaining samples were withheld for later analyses. The topologies were used to generate a 50% majority-rule consensus tree to determine the support values of the clades obtained. For both phylogenies, *Radopholus similis* (GQ281456) was used for region ITS1-5.8S-ITS2, and *Radopholus* spp. (HQ823572) for region D2D3 of the gene 28S as out groups. Phylogenetic trees were visualized using Fig Tree (Rambaut, 2009).

The characteristics and morphotaxonomic values of females and males partially agrees with descriptions made by Brzeski (1991), and those reported by Subbotin and Riley (2012) for the leaf-

ción de Clustal W (Thompson *et al.* 1994). La búsqueda del mejor modelo de sustitución para ambos marcadores se realizó a través de Mr Modeltest 2.3 (Nylander, 2004) y PAUP 4.0b10 (Swofford, 1998). El análisis filogenético para los dos marcadores se llevó a cabo mediante inferencia bayesiana con MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con el modelo GTR+G, con un árbol de arranque aleatorio y se corrió con la Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) para 1×10^6 generaciones, tomando muestras a intervalos de 100. Dos corridas se realizaron para cada análisis. Después de desechar muestras burn-in y la evaluación de la convergencia, las muestras restantes se retuvieron para análisis posteriores. Las topologías se utilizaron para generar un árbol con la regla de la mayoría de consenso 50 % de probabilidades posteriores para determinar los valores de soporte de los clados obtenidos. Para ambas filogenias se utilizó *Radopholus similis* (GQ281456) para la región ITS1-5.8S-ITS2 y *Radopholus* spp. (HQ823572) para la región D2D3 del gen 28S como grupos externos. Los árboles filogenéticos se visualizaron utilizando Fig Tree (Rambaut, 2009).

Las características y valores morfotaxonomícos de hembras y machos coinciden parcialmente con las descripciones hechas por Brzeski (1991), y las reportadas por Subbotin y Riley (2012) para el nematodo agallador foliar *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*). **Hembra:** Cuerpo corto y recto 692 μm (637-785); cápsula cefálica plana en forma de tapón (Figura 2A y Fig. 2D), estilete pequeño 9 μm (8-9) con nódulos grandes; esófago alargado, ausencia del bulbo medio; glándula esofágica sobrepuesta al intestino; campo lateral con cuatro incisuras (Figura 2E); Ovario extendido, oocitos en una o dos filas; saco post-uterino corto; cola aguda con punta redondeada. **Macho:** Cuerpo corto y delgado 700 μm (672-737), estilete delicado 9 μm (8-9) con nódulos grandes; capsula ce-

galling nematode *Orrina phyllobia* (= *Ditylenchus phyllobius*). **Female:** Short and straight body 692 μm (637-785); flat cephalic capsule, in the shape of a capful (Figure 2A and Figure 2D), small stylet 9 μm (8-9) with large stylet knobs; elongated oesophagus, absence of metacarpus; esophageal gland overlapped with intestine; lateral field with four incisures (Figure 2E); extended ovary, oocytes in one or two rows; short post-uterine sac; pointed tail with rounded tip. **Male:** Short body and thin 700 μm (672-737), delicate stylet 9 μm (8-9) with large knobs; cephalic capsule very similar to that of the female (Figure 2B); short spicule 19.8 μm (18-21); sub-terminal bursa 58.3 μm (48-66); tail with projection with pointy ending (Figure 2F). Table 1 shows the morphometric identification of *O. phyllobia* population in the state of Guanajuato, Mexico and its comparison with the populations of *Ditylenchus phyllobius* from Arizona, U.S.A., cited by Nickle (1991) and the population from Texas, U.S.A. Brzeski (1991). There are differences in De Man ratios: *a* (body length/the greatest diameter of the body) and *b'* (body length/distance of esophageal gland to the anterior end of body when overlapped), since the Mexican population has higher values than those reported. The higher morphometric values can be due to analyzed specimens did not undergo the effect of any chemical fixating agent, since were only anesthetized with heat.

The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA and expansion segments D2-D3 of the gene 28S produced a fragment of 850 bp and 900 bp, respectively, based on agarose gel electrophoresis (Figures 3 and 4). The search for homology using BLAST with NCBI sequences for the region ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA shows a 99 % de similarity ($E=0.0$) with *D. phyllobius* (AF363112), confirming the identity of the Mexican populations. Regarding the expansion segments D2-D3 of gene 28S, the number of genetic sequences of this group

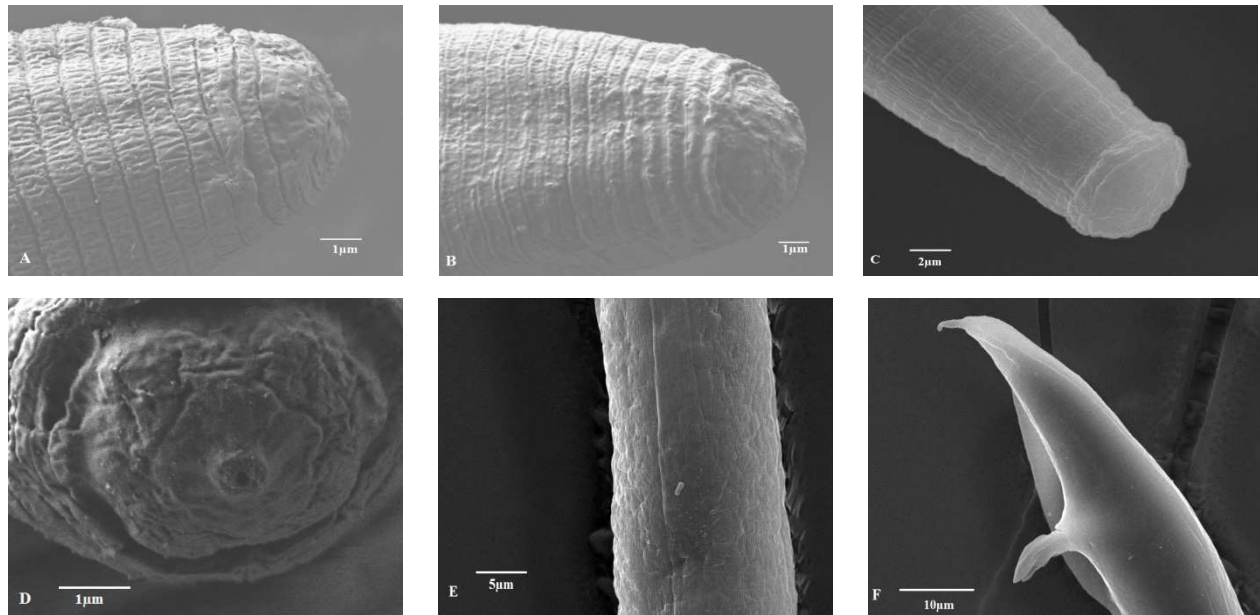


Figura 2. Imágenes en MEB de *Orrina phyllobia*; (A) Vista lateral de la cabeza de la hembra; (B) Vista lateral de la cabeza del macho; (C) Vista lateral de la cabeza del juvenil J₂; (D) Región labial de la hembra; (E) Campos laterales; (F) Cola del macho.

Figure 2. SEM images of *Orrina phyllobia*; (A) Side view of female's head; (B) Side view of male's head; (C) Side view of head of juvenile J₂; (D) Labial region of the female; (E) Lateral fields; (F) Tail of male.

fálica muy parecida a la de la hembra (Figura 2B); espícula corta 19.8 μm (18-21); bursa sub-terminal 58.3 μm (48-66); cola con proyección con terminación en punta (Figura 2F). El Cuadro 1 muestra la identificación morfométrica de la población de *O. phyllobia* del estado de Guanajuato, México y su comparación con las poblaciones de *Ditylenchus phyllobius* de Arizona, EE.UU., citado por Nickle (1991) y la población de Texas, EE.UU. Brzeski (1991). Existen diferencias en los índices: *a* (longitud del cuerpo/el diámetro mayor del cuerpo) y *b'* (longitud del cuerpo/distancia de las glándulas esofágicas al extremo anterior del cuerpo cuando está sobrepuesta) ya que la población mexicana posee valores más altos que los reportados. Los valores morfométricos relativamente más altos puede deberse a que los especímenes analizados no fueron

of anguinid nematodes in the NCBI database is very limited, although with the few that exist, a blasting was obtained with 78% similarity with Sequences from *Ditylenchus gallaeformans* (KF494346), a nematode that causes similar symptoms in weeds in tropical areas of the genus *Miconia* in Brasil and Costa Rica (Oliveira *et al.*, 2012). Although *D. gallaeformans* was the species with the highest similarity with sequences from Mexican *O. phyllobia* populations, the percentage of similarity was very low, and the only relation they have is that they belong to the family of Anguinidae and they cause alterations in the aerial sections of their hosts. The sequences of both molecular markers of the rDNA were deposited in the genetic database of the NCBI (GenBank) with access numbers KT192615 and KT192616 for ITS1-5.8S-ITS2 and KT192617

Cuadro 1. Características morfométricas comparativas de hembras y machos de *Orrina phyllobia* de la población de Guanajuato, México con especies reportadas por Nickle, (1991) y Brzeski, (1991). Todas las medidas están en μm , media (rango).
Table 1. Comparative morphometric characteristics of *Orrina phyllobia* females and males of the population from Guanajuato, Mexico with species reported by Nickle (1991) and Brzeski (1991). All measures are in μm , average (range).

| Carácter | <i>Orrina phyllobia</i>
(Guanajuato, México) | | <i>Ditylenchus phyllobius</i>
(Nickle, 1991) | | <i>Ditylenchus phyllobius</i>
(Brzeski, 1991) | |
|-------------|---|------------------|---|-------------|--|------------------|
| | Hembra | Macho | Hembra | Macho | Hembra | Macho |
| n | 20 | 20 | - | - | - | - |
| L | 696.2 (637-785) | 700 (672-737) | (590-840) | (670-800) | 684 (592-838) | 750 (672-799) |
| a | 31.6 (22.5-39) | 32.8 (30-36.8) | (20-32) | (27-34) | 25 (20-32) | 29 (27-34) |
| b | 7.8 (7.5-10.1) | 8.6 (8.1-9) | (7.4-10.5) | (7.0-9.7) | 8.6 (7.4-10.5) | 8.5 (7-9.7) |
| b' | 7.7 (6.6-9.8) | 8.4 (7.9-8.7) | (4.1-6.5) | (4.7-7.5) | 5.5 (4.1-6.5) | 5.8 (4.7-7.5) |
| c | 18.3 (17-19.6) | 20.4 (19.7-22.4) | (11.4-17.6) | (16.3-19.2) | 14.6 (11.4-17.6) | 18.1 (16.3-19.2) |
| c' | 4.4 (3.5-5.6) | 4 (3.7-4.5) | (2.9-4.5) | (2.5-3.1) | 3.7 (2.9-4.5) | 2.8 (2.5-3.1) |
| Estilete | 9 (8-9) | 9 (8-9) | (9-10) | (9-10) | (9-11) | (9-10) |
| Espícula | - | 19.8 (18-21) | - | - | - | 20.5 (19-22) |
| Bursa | - | 58.3 (48-66) | - | - | - | - |
| Gubernáculo | - | - | - | - | - | - |
| V | 79.2 (78-81) | - | (78-85) | - | 81 (78-84) | - |
| V' | 89.5 (85-92) | - | (85-89) | - | 87 (85-89) | - |

L=longitud del cuerpo; a=longitud del cuerpo/anchura máxima del cuerpo; b=longitud del cuerpo/longitud del esófago; b'= longitud del cuerpo/distancia de la región anterior al post corpus; c= longitud/longitud de la cola; c'= longitud de la cola/ancho del cuerpo a nivel del ano; V= distancia región anterior-vulva; V'= distancia de la región anterior a la vulva/región anterior al ano X 100 / L=body length; a=body length/maximum body width; b=body length/oesophagus length; b'= body length/distance of the anterior region to the post corpus; c= body length/tail length; c'= tail length/width of body at the level of the anus; V= distance region anterior-vulva; V'= distance of region anterior to vulva/región anterior to anus X 100.

sometidos al efecto de ningún agente químico fijador, y sólo fueron anestesiados en calor.

La amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr y segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S produjeron un fragmento de 850 pb y 900 pb, respectivamente basado en electroforesis en gel de agarosa (Figuras 3 y 4). La búsqueda de homología por BLAST con secuencias del NCBI para la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr muestra un 99 % de similitud ($E=0.0$) con *D. phyllobius* (AF363112) lo que confirma la identidad de las poblaciones mexicanas. Respecto a los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, el número de secuencias genéticas de este grupo de nematodos anguinidos en la base de datos del NCBI es muy limitado sin embargo, con los pocos que existen se obtuvo un blasting de 78 % de similitud con secuen-

and KT192618 for the expansion segments D2-D3 of gene 28S as a contribution to the knowledge of Mexican population of this group of nematodes. The Bayesian phylogenetic reconstruction from the region ITS1-5.8S-ITS2 of a multiple alignment that included 37 sequences placed the Mexican *O. phyllobia* population in an independent clade with a support value of 96.96 % along with the American population of *D. phyllobius* (= *O. phyllobia*) AF363112 (Figure 5). This difference is due, in part, to the intraspecific variability between populations of the same species, and on the other hand, the sequenced region of the American *O. phyllobia* rDNA was partially different since it only included a partial fragment of the gene 18S, the region of the ITS1 and gene 5.8S. Regarding the inference of expansion segments D2-D3 of

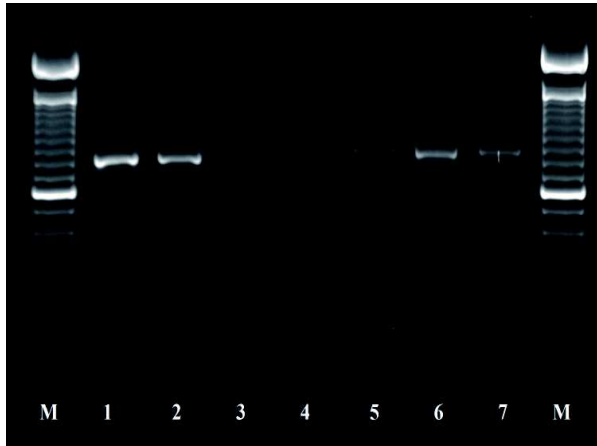


Figura 3. Productos de PCR usando los iniciadores AB28 y TW81; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-7 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

Figure 3. PCR products using primers AB28 and TW81; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Sterile distilled water; 5-7 population of *O. phyllobia*. M: Molecular marker 100 bp.

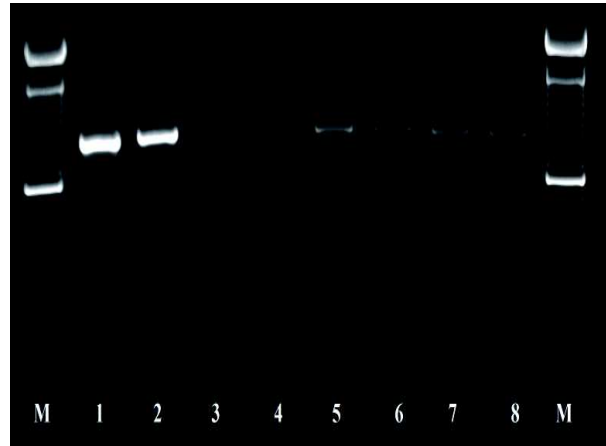


Figura 4. Productos de PCR usando los iniciadores D2A y D3B; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Agua destilada estéril; 5-8 población de *O. phyllobia*. M: Marcador molecular 100 pb.

Figure 4. PCR products using primers D2A and D3B; 1-2: Control (+) *Ditylenchus dipsaci*; 3-4 control (-) Sterile distilled water; 5-8 population of *O. phyllobia*. M: Molecular marker 100 bp.

cias de *Ditylenchus gallaeformans* (KF494346), un nematodo que ocasiona síntomas similares en maleza de zonas tropicales del género *Miconia* en Brasil y Costa Rica (Oliveira *et al.*, 2012). Si bien *D. gallaeformans* fue la especie que más similitud tuvo con las secuencias de las poblaciones mexicanas de *O. phyllobia*, el porcentaje de similitud fue muy bajo y la única relación de parentesco que tienen es que ambos, pertenecen a la familia Anguinidae y que ocasionan alteraciones en las partes aéreas de sus hospedantes. Las secuencias de ambos marcadores moleculares del ADNr se depositaron en la base de datos genético del NCBI (GenBank) con números de acceso KT192615 y KT192616 para ITS1-5.8S-ITS2 y KT192617 y KT192618 para los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S como aportación al conocimiento de las poblaciones mexicanas de este grupo de nematodos. La reconstrucción filogenética bayesiana a partir

the gene 28S, multiple alignment included 21 sequences. The data set included 807 nucleotidic characters. Because there are no sequences of this molecular marker in GenBank for this nematode, the Mexican *O. phyllobia* population and GenBank sequences of other species of anguinids formed independent groups with high support values (Figure 6). It is important to highlight that with both molecular markers, *O. phyllobia* concentrates on a monophyletic clade (high support value of 100%) and is phylogenetically related to *Ditylenchus destructor* and *D. arachidis* (ITS1-5.8S-ITS2) and to *D. gallaeformans* (D2-D3), all members of the Anguinidae family (Figures 5 and 6). These results coincide with those by Douda *et al.*, 2013.

Sequences of the region ITS1-5.8S-ITS2 of the rDNA helped to genetically confirm the identity of Mexican *O. phyllobia* populations as the causal agent of leaf galling in *S. elaeagnifolium*, taking as

de la región ITS1-5.8S-ITS2 de un alineamiento múltiple que incluyó 37 secuencias ubicó a la población mexicana de *O. phyllobia* en un clado independiente con un valor de soporte de 96.96 % junto con la población americana de *D. phyllobius* (= *O. phyllobia*) AF363112 (Figura 5). Esta diferen-

a reference the American *D. phyllobius* sequence (Powers *et al.*, 2001).

Although there is evidence of *O. phyllobia* being a prospective biological control agent for the silver-leaf nightshade, there is also the possibility that it affects other species of native solanaceae and

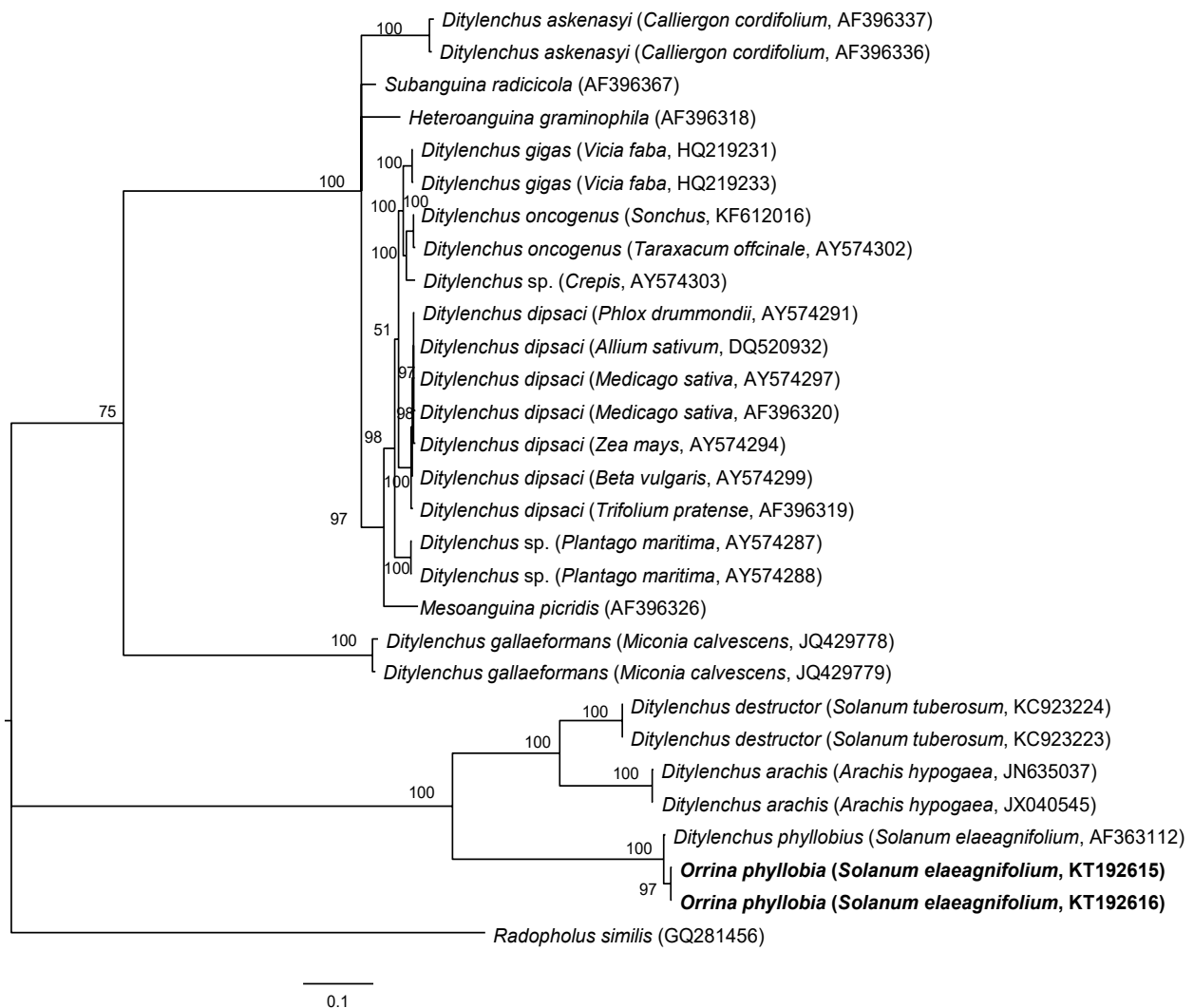


Figura 5. Inferencia bayesiana de nematodos afectando *S. elaeagnifolium*. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50 % de la alineación de secuencias de ITS1-5.8S-ITS2 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

Figure 5. Bayesian inference of nematodes affecting *S. elaeagnifolium*. A 50% majority-rule consensus tree of the sequences aligned of ITS1-5.8S-ITS2 generated from the complex model: GTR + G with sequences of anguinids deposited in GenBank.

cia se debe en parte a la variabilidad intraespecífica existente entre poblaciones de la misma especie y por otro lado a la región secuenciada del ADN de *O. phyllobia* de E.E.U.U. ya fue parcialmente diferente pues sólo incluyó un fragmento parcial del gen 18S, la región del ITS1 y el gen 5.8S. En lo que respecta a la inferencia de los segmentos de expansión D2-D3 del gen 28S, el alineamiento múltiple incluyó 21 secuencias. El conjunto de datos incluyó 807 caracteres nucleotídicos. Debido a que no existen secuencias de este marcador molecular en GenBank para este nematodo, la población mexicana de *O. phyllobia* y las secuencias del GenBank de otras especies de anguinidos formaron agrupaciones independientes con un valores altos de soporte (Figura 6). Es importante destacar que con ambos marcadores moleculares, *O. phyllobia* se concentra en un clado monofilético (alto valor de soporte 100 %) y está relacionada filogenéticamente con *Ditylenchus destructor* y *D. arachidis* (ITS1-5.8S-ITS2) y con *D. gallaeformans* (D2-D3) todos, miembros de la familia Anguinidae (Figura 5 y 6), resultados que coinciden con los reportados por Douda *et al.*, 2013.

Las secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN permitieron confirmar genéticamente la identidad de poblaciones mexicanas de *O. phyllobia* como el agente causal del agallamiento foliar de *S. elaeagnifolium*, utilizando como referencia la secuencia de *D. phyllobius* de EE.UU. (Powers *et al.*, 2001).

Si bien existe evidencia de *O. phyllobia* como un prospecto agente de control biológico para el trompillo, también existe la posibilidad de que pueda afectar algunas otras especies de solanáceas nativas y algunas cultivadas como la berenjena *Solanum melongena* (Field *et al.*, 2009). Se sugiere para estudios futuros determinar cuál es el comportamiento de *O. phyllobia* al ser inoculado en diferentes especies cultivadas para determinar la

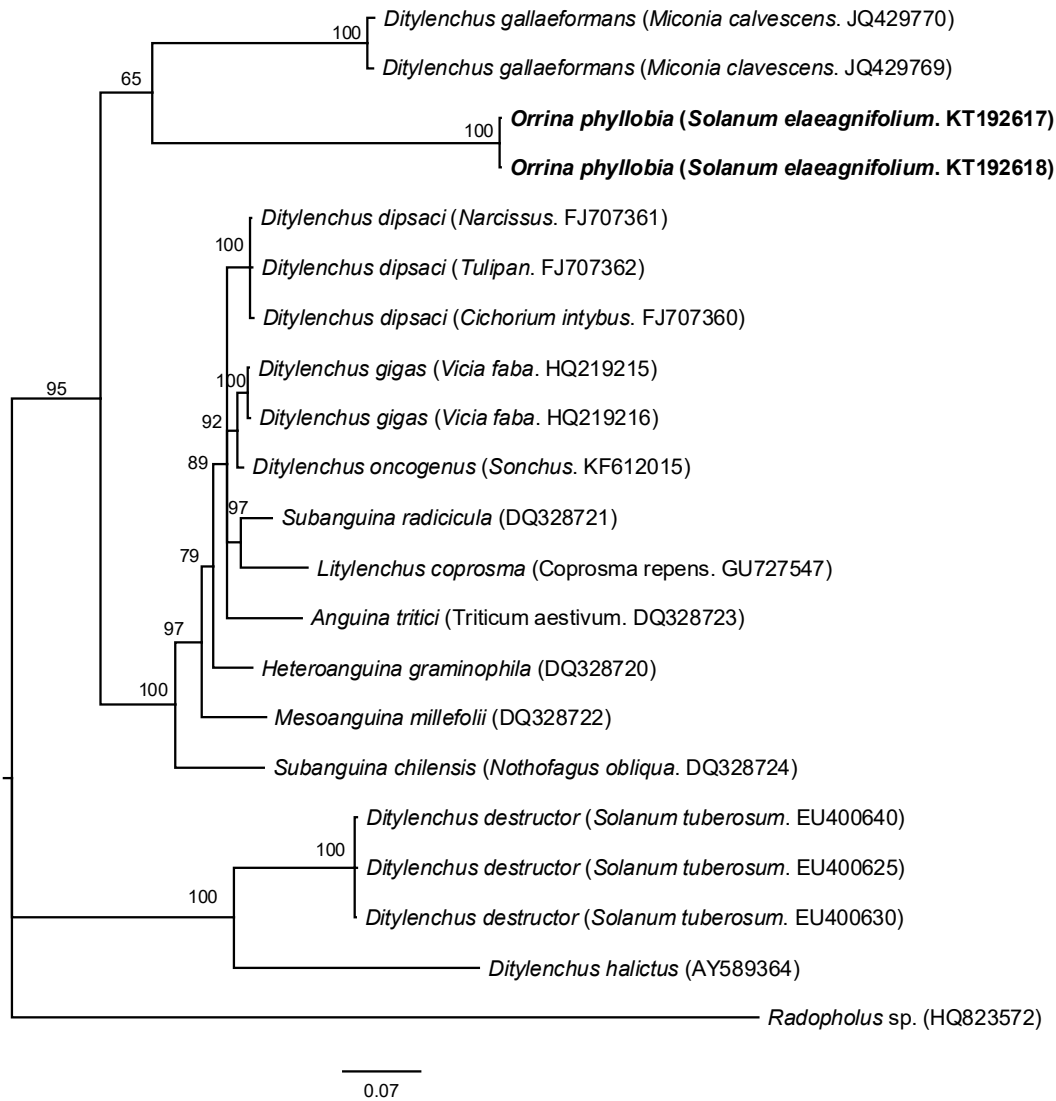
other crops such as eggplant *Solanum melongena* (Field *et al.*, 2009). For future studies, we suggest determining the behavior of *O. phyllobia* when inoculated in different crop species to determine the host range. The use of taxonomy with an integrated perspective for the identification of nematodes in *S. elaeagnifolium* was highly important, since it strengthened the benefits of traditional taxonomy. The morphotaxonomic and molecular study helped determine the presence of the foliar nematode *Orrina phyllobia* attacking silver-leaf nightshade *Solanum elaeagnifolium*, a weed of economic and ruderal importance in the municipal area of San Luis de la Paz, Guanajuato, Mexico.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our sincere gratitude goes to the Nematology Laboratory of the National Phytosanitary Reference Center (CNRF) of the General Plant Health Department, SENASICA-SAGARPA for having granted the support and helping us carry out and execute this project. To MSc. Jessica Berenice Valencia Luna and MSc. Ariana Guadalupe Robles Zárate of the Area of Electronic Microscopy of the CNRF. This research is part of the Master's Degree thesis of the first author.

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

gama de hospedantes. El empleo de la taxonomía con un enfoque integrativo para la identificación de nematodos en *S. elaeagnifolium* fue de gran importancia ya que fortaleció las bondades de la taxonomía tradicional. El estudio morfotaxonomico y molecular permitió determinar la presencia del nematodo foliar *Orrina phyllobia* atacando trompillo *Solanum elaeagnifolium*; maleza de importancia económica y ruderal en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato, México.



**Figura 6.** Inferencia bayesiana de secuencias de nematodos afectando *S. elaeagnifolium*. Árbol consenso de probabilidades superiores al 50 % de la alineación de los segmentos de expansión D2-D3 generados a partir del modelo complejo: GTR + G con secuencias de anguinidos depositadas en el GenBank.

**Figure 6.** Bayesian inference of sequences of nematodes affecting *S. elaeagnifolium*. A 50% majority-rule consensus tree of the expansion segments D2-D3 generated from the complex model: GTR + G with sequences of anguinids deposited in the GenBank.

**AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Laboratorio de Nematología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA por haber otorgado los apoyos y las facilidades para la realización y

ejecución de este proyecto. A la M. en C. Jessica Berenice Valencia Luna y la M. en C. Ariana Guadalupe Robles Zárate del área de Microscopia Electrónica del CNRF. Esta investigación es parte de la tesis de maestría del primer autor.

## LITERATURA CITADA

- Brzeski M. W. 1991. Review of the genus *Ditylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Anguinidae). *Revue de Nematologie* 14: 9–59. Disponible en línea: [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/fan/40309.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/fan/40309.pdf)
- Cuda, J. P., P. E. Parker, R. A. Goodson, and J. L. Gillmore. 1988. Evaluation of *Ditylenchus phyllobius* (Tylenchida: Anguinidae) as a potential biological control agent for *Solanum viarum* and *Solanum tampicense* (Solanaceae). *Nematropica* 28:107-111. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/64208/61876>
- DOF. 1997. Norma oficial mexicana NOM-026-FITO-1995. Por la que se establece el control de plagas del algodón. México. 13 p. Disponible en línea: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4893843&fecha=10/09/1997](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4893843&fecha=10/09/1997)
- Douda O., Marek, M., Zouhar, M. and Rysanek, P. 2013. Insights into the structure and phylogeny of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97. Disponible en línea: <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/view-File/11334/12198>
- Eisenback J. D. 1985. Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. pp:79-105. In: Barker, K. R., Carter, G. G. and Sasser, J. N. (eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume II: Methodology. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, U.S.A. 223p. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/234111942>
- Eisenback, J. D. 1986. A comparison of techniques useful for preparing nematodes for scanning electron microscopy. *Journal of Nematology* 18:479–487. Disponible en línea: <http://journals.fcla.edu/jon/article/view/69163/66823>
- EPPO. 2007. *Solanum elaeagnifolium* Cav. Data sheets on quarantine pests. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37: 236–245. Disponible en línea: [http://www.eppo.int/QUARANTINE/data\\_sheets/plants/Solanum\\_elaeagnifolium\\_DS.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/plants/Solanum_elaeagnifolium_DS.pdf)
- Esser R. P. 1986. A water agar en face technique. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 53: 254-255. Disponible en línea: <http://bionames.org/bionames-archive/issn/0018-0130/53/254.pdf>
- Field R. P., Kwong R. M., and Sagliocco, J. L. 2009. Host specificity of *Ditylenchus phyllobius*, a potential biological control agent of silver-leaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) in Australia. *Plant Protection Quarterly* 24:141-144. Disponible en línea: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20093353119.html>
- Howlett B. J., Brownlee A. G., Guest D. I., Adcock G. J., and McFadden G. I. 1992. The 5S ribosomal RNA gene is linked to large and small subunit ribosomal RNA genes in the oomycetes, *Phytophthora vignae*, *P. cinnamomi*, *P. megaspera* f. sp. *glycinae* and *Saprolegnia ferax*. *Current Genetics* 22:455–461. Disponible en línea: <https://www.researchgate.net/publication/21682896>
- Joyce S. A., Reid A., Driver F., and Curran J. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. Pp:178-187. In: Burnell A. M., Ehlers, R-U, and Masson J-P. (eds). *Biotechnology: Genetics of entomopathogenic nematodes-bacterium complexes*. Luxembourg: DG XII. European Commission Public. 277p.
- Kwong, R. M. and Sagliocco, J.L. 2012. *Solanum elaeagnifolium* Cav. – silverleaf nightshade. Pp.555-562. In: M. H. Julien, R. E. C. McFadyen and J. M. Cullen. (eds). *Biological control of weeds in Australia*. CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. 619p.
- Nickle WR. 1991. *Manual of agricultural nematology*. CRC Press. 1064p.
- Nunn GB. 1992. *Nematode molecular evolution*. Ph.D. dissertation, University of Nottingham, UK.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. Disponible en línea: <https://github.com/nylander/MrModeltest2>
- Rambaut A. 2009. FigTree. v1.3.1. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>
- Robinson A. F., Orr C. C., and Heintz C. E. 1978. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential as a biological control agent of silverleaf nightshade. *Journal of Nematology* 10: 361–366. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2617918/>
- Ronquist F. and Huelsenbeck J. P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574. Disponible en línea: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/19/12/1572.long>
- Siddiqi M. R. 2001. *Tylenchida: parasites of plants and insects*. 2nd edition. CABI Bioscience publishing, Wallingford, UK. 835p.
- Sforza R. and Jones, WA. 2007. Potential for classical biocontrol of silverleaf nightshade in the Mediterranean Basin. *EPPO Bulletin* 37:156–162. Disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2338.2007.01109.x>
- Skantar A. M., Handoo Z. A., Carta L. K., and Chitwood D. J. 2007. Morphological and molecular identification of *Globodera pallida* associated with potato in Idaho. *Journal of Nematology* 39:133-144. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586493/>
- Subottin, S. A. and Riley I. T. 2012. Stem and gall forming nematodes. Pp.:521-577. In: Manzanilla-López, R. H. and Marbán-Mendoza, N. (eds.). *Practical Plant Nematology*. Biblioteca Básica de Agricultura (BBA). Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. 883p.
- Swofford DL. 1998. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponible en línea: [http://paup.csit.fsu.edu/Command\\_ref\\_v2.pdf](http://paup.csit.fsu.edu/Command_ref_v2.pdf)
- Thomas W. K., Vida J. T., Frisse L. M., Mundo M., and Baldwin, J. G. 1997. DNA sequences from formalin-fixed nematodes: Integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29:250-254. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

- articles/PMC2619797/
- Thompson J. D., Higgins D. G., and Gibson T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>
- Vibrans H. 2009. Malezas de México. CONABIO. Fecha de consulta 08 diciembre del 2015. Disponible en línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.htm>
- Vovlas N., Troccoli A., Palomares-Rius J. E., De Luca F., Liebanas G., Landa B. B., Subbotin S. A., and Castillo P. 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. parasitizing broad bean: A new stem nematode singled out from the *Ditylenchus dipsaci* species complex using a polyphasic approach with molecular phylogeny. *Plant Pathology* 60:762-775. Disponible en línea: <http://www.readcube.com/articles/10.1111%2Fj.1365-3059.2011.02430.x>
- Wapshere, A. J. 1988. Prospects for biological control of silverleaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 39:187-97. Disponible en línea: doi:10.1071/AR9880187
- Williams B. D., Schrank B., Huynh C., Shownkeen R., and Waterston R. H. 1992. A genetic mapping system in *Caenorhabditis elegans* based on polymorphic sequence-tagged sites. *Genetics* 131:609-624. Disponible en línea: <http://www.genetics.org/content/genetics/131/3/609.full.pdf>



# Virus associated to yellowing of *Hibiscus sabdariffa* in Guerrero, Mexico

## Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México

Patricia Velázquez-Fernández, Erika Janet Zamora-Macorra, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez\*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México- Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230; Grisel Negrete-Fernández, Dirección General de Sanidad Vegetal, Departamento de Fitopatología, km 37.5 Carr. México-Pachuca, Tecámac, Estado de México, CP 51379; Javier Hernández-Morales. Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carr. México- Texcoco. Montecillo, Estado de México, CP 56230. \*Autor de Correspondencia: ldaniel@colpos.mx.

Recibido: 3 de febrero de 2016

Aceptado: 15 de abril de 2016

Velázquez-Fernández P, Zamora-Macorra EJ, Ochoa-Martínez DL, Hernández-Morales J. 2016. Virus asociados al amarillamiento de *Hibiscus sabdariffa* en Guerrero, México. Revista Mexicana de Fitopatología 34: 200-207.

DOI: [10.18781/R.MEX.FIT.1602-1](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1602-1)

Primera publicación DOI: 15 de abril 2016.

First DOI published: April 15th, 2016.

**Resumen.** En la zona productora de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) del estado de Guerrero en el ciclo otoño-invierno 2014 se observaron cinco parcelas con una incidencia de 90 a 100 % de plantas con aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento. Se colectaron plantas asintomáticas y con los síntomas antes descritos y se injertaron en plantas sanas de jamaica observándose clorosis de venas y mosaico 17 días después en las plantas injertadas con hojas que mostraban síntomas. Se extrajo DNA y RNA de tejido de las plantas colectadas en campo y de las injertadas que mostraron síntomas y se analizó para fitoplasmas,

**Abstract.** In the producing area of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in the state of Guerrero, five plots with an incidence of 90-100 % of plants showing vein chlorosis, mosaic and yellowing were observed in the autumn-winter 2014 crop cycle. Asymptomatic and symptomatic plants were collected and grafted onto healthy plants and at 17 days after inoculation vein chlorosis and mosaic were observed in plants grafted with leaves showing symptoms. DNA and RNA were extracted from plants collected in the field and those grafted that showed symptoms and analyzed for phytoplasmas, begomoviruses, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* (OkMV). No amplification were obtained for phytoplasmas, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* in plants collected in the field and grafted that showed symptoms; only they were positive for begomoviruses. Sequences from eighth plants with symptoms collected at field and one grafted showing symptoms had a similarity of 95 % and 91 %, respectively, with *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV). Two plants with symptoms

begomovirus, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* (OkMV). Los resultados para fitoplasmas, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* fueron negativos. Sólo se tuvo el amplicón esperado en el caso de begomovirus. Las secuencias de ocho plantas con síntomas colectadas en campo tuvieron una similitud del 95 % con *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV). Dos plantas con síntomas colectadas en campo mostraron un porcentaje de similitud menor a otros begomovirus. Los resultados obtenidos indican que el amarillamiento de la jamaica está asociado a un complejo de begomovirus en el que se encuentra presente el OkYMMV.

**Palabras clave:** jamaica, begomovirus, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, amplificación por círculo rodante.

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es un arbusto cuyos cálices deshidratados y tallos se utilizan para elaborar productos alimenticios, farmacéuticos, cosméticos y textiles. Los principales países productores de esta planta son China, India y Sudán (Galicía-Flores *et al.*, 2008). México ocupa el séptimo lugar, siendo el estado de Guerrero el mayor productor, con una superficie sembrada de 14 274 ha (SIAP, 2014). El principal problema fitosanitario de este cultivo en México es la “pierna negra” causada por *Phytophthora parasitica* y actualmente la mancha foliar y de cálices ocasionada por *Corynespora cassiicola* (Ortega *et al.*, 2015). A nivel mundial existen cuatro virus afectando jamaica: *Cotton leafcurl virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Malva vein clearing virus* (MVCV) y *Okra mosaic virus* (OkMV) (Fauquet *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2009). Durante los últimos años en algunos municipios del estado de Guerrero

collected at field showed a lower similarity with different begomoviruses. These results indicate that yellowing of *Hibiscus sabdariffa* is associated with a viral complex in which OkYMMV is present.

**Additional keywords:** roselle, begomoviruses, *Okra yellow mosaic Mexico virus*, rolling-circle amplification.

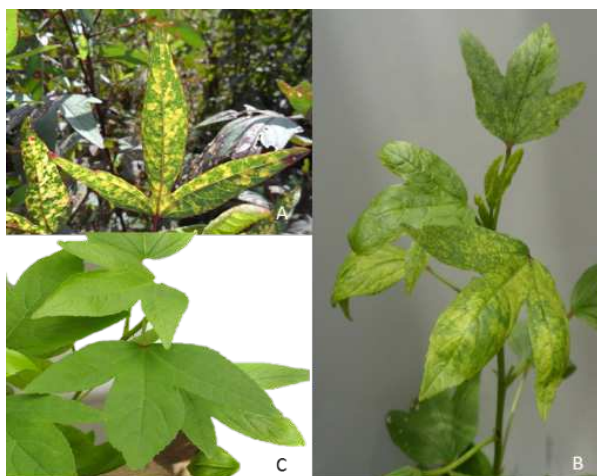
Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) is a shrub with calyces that, when dehydrated, are used to produce foods, medications, cosmetics, and textiles. The main producers of this plant are China, India, and Sudan (Galicía-Flores *et al.*, 2008). Mexico is seventh place, and the state of Guerrero is the main producer nationwide, with a planted surface of 14 274 ha (SIAP, 2014). The main phytosanitary problem of this crop in Mexico is “black shank,” caused by *Phytophthora parasitica*, and currently, spots on leaves and calyces caused by *Corynespora cassiicola* (Ortega *et al.*, 2015). Worldwide there are four viruses that affect roselle: *Cotton leafcurl virus* (CLCuV), *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV), *Malva vein clearing virus* (MVCV), and *Okra mosaic virus* (OkMV) (Fauquet *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2009). In recent years in some municipalities of the state of Guerrero, a disease has been found in roselle of an unknown etiology, known locally as “yellowing.” The plants affected show symptoms consisting of vein clearing mosaic, and yellowing, and its incidence had been very low. However, it has been increasing considerably, and in the 2014 autumn-winter cycle it reached values of 90 to 100 % on five plots, therefore the aim of this study was to know the agent related to this disease. Ten 2-month old roselle plants were sampled, showing vein clearing, mosaic, and yellowing, as well as three asymptomatic plants in a field in the municipality of Tecoaapa

se ha detectado una enfermedad en jamaica de etiología desconocida, denominada localmente como “amarillamiento”. Las plantas afectadas presentan síntomas consistentes en aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento y su incidencia había sido muy baja. No obstante, se ha venido incrementando de manera considerable y en el ciclo otoño-invierno 2014 alcanzó valores de 90 a 100 % en cinco parcelas por lo que el objetivo del presente estudio fue conocer al agente asociado a esta enfermedad. Se colectaron 10 plantas de jamaica de dos meses de edad que presentaban aclaramiento de nervaduras, mosaico y amarillamiento, así como tres plantas asintomáticas en una parcela del municipio de Tecoaapa y cuatro parcelas del municipio de Ayutla, Guerrero (Figura 1A). Se inocularon mecánicamente cinco plantas de jamaica sanas obtenidas de semilla utilizando como fuente de inóculo hojas de jamaica con síntomas colectadas en campo maceradas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 y carborundum 400 mallas (Dijkstra y de Jager, 1998). Como testigo se tuvieron tres plantas de jamaica sanas frotadas solamente con la solución amortiguadora y el carborundum. Hojas de plantas con síntomas colectadas en campo se injertaron en cinco plantas de jamaica sanas de dos meses de edad, obtenidas a partir de semilla, y se mantuvieron en invernadero para registrar la aparición de síntomas cada dos días durante un mes. Como testigo se tuvo una planta sana de jamaica obtenida a partir de semilla sin injertar. Se extrajeron ácidos nucleicos totales de hojas de las plantas de jamaica asintomáticas y con síntomas colectadas en campo y se analizaron para fitoplasmas (Teixeira *et al.*, 2008), virus de la familia *Potyviridae* (Chen *et al.*, 2001), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008) y begomovirus. En este último caso se utilizó el kit TempliPhi 100 Amplification<sup>®</sup> (Amersham Biosciences) que amplifica DNA circular por

and four fields in the municipality of Ayutla, Guerrero (Figure 1A). Five healthy roselle plants obtained from seed were mechanically inoculated, using roselle leaves with symptoms, as inoculum sampled on the field, grinding in a phosphate buffer solution pH 7.2 and carborundum 400 mesh (Dijkstra and de Jager, 1998). As a control, there were three healthy roselle plants rubbed only with the buffer solution and the carborundum. Leaves from plants with symptoms collected in the field were grafted onto five healthy two-month old roselle plants obtained from seed, and they were kept in a greenhouse to observe the appearance of symptoms every two days for one month. As a control, there was a healthy roselle plant obtained from seeds without grafting. Total nucleic acids were extracted from the leaves from asymptomatic and symptomatic roselle plants collected from the field, and they were analyzed for phytoplasmas (Teixeira *et al.*, 2008), *Potyviridae* family viruses (Chen *et al.*, 2001), *Okra mosaic virus* (OkMV) (Stephan *et al.*, 2008), and begomoviruses. For the latter, we used the TempliPhi 100 Amplification<sup>®</sup> kit (Amersham Biosciences) that amplifies DNA via rolling circle (RCA) following the manufacturer's instructions. For the DNA-A of the begomoviruses, we designed the primers *Sense* DNA-AC (AAACTCGAGGATGTGAAGGCCCATG) and *Antisense* DNA-AC (AAAAGGGAAGACGATGTGGGC), which amplify a fragment of approximately 1400 pb corresponding to genes AV1, AC3, AC2, and AC1. For DNA-B, we used the primers proposed by Rojas *et al.*, (1993), which amplify a fragment of 500 pb. The reaction mixture consisted of 1 µL of DNA obtained by RCA, PCR reaction buffer (1X), 0.20 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM of each primer, 0.5 U of Taq polymerase (PROMEGA<sup>®</sup>), adjusting to a final volume of 20 µL. The PCR was carried out with the following conditions: initial denaturation

círculo rodante (ACR) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el DNA-A de los begomovirus se diseñaron los iniciadores *Sense* DNA-AC (AAAACCTCGAGGATGTGAAGGCCCATG) y *Antisense* DNA-AC (AAAAGGGAAGACGATGTGGGC) que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400 pb correspondiente a los genes AV1, AC3, AC2 y AC1. Para el DNA-B se utilizaron los iniciadores propuestos por Rojas *et al.*, (1993) que amplifican un fragmento de 500 pb. La mezcla de reacción consistió en 1  $\mu$ L de DNA obtenido por ACR, buffer de reacción de PCR (1X), 0.20 mM dNTPs, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ M de cada iniciador, 0.5 U de Taq polimerasa (PROMEGA®) ajustando a un volumen final de 20  $\mu$ L. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturación inicial 94 °C por 4 min, 30 ciclos desnaturación de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1.5 min, un ciclo de extensión final de 72 °C por 3 min. Los productos amplificados de 1400 pb fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GenBank.

Después de 30 días, las plantas inoculadas mecánicamente no mostraron síntomas, lo cual pudo deberse a una baja concentración de virus así como la presencia de inhibidores, taninos por ejemplo, en el material vegetal utilizado como fuente de inóculo que afectan la proteína de la cápside provocando la precipitación de los virus (Dijkstra y de Jager, 1998), o bien, de un virus no transmisible de esta forma. De La Torre-Almaraz *et al.*, (2004) señalan que muchos virus con genoma RNA se transmiten fácilmente de forma mecánica y que la mayoría de los virus con genoma DNA no se transmiten de esta manera o su eficiencia de transmisión es muy baja. Cuatro de las plantas injertadas mostraron clorosis de venas y mosaico en las hojas más jóvenes a los 17 días después de realizado el injerto (Figura 1B). Los síntomas observados en invernadero fueron distintos de los



**Figura 1.** Plantas de jamaica mostrando A. Mosaico amarillo (planta colectada en Tecoaapa, Guerrero). B. Mosaico (planta injertada en invernadero con hojas de plantas colectadas en campo). C. Testigo: planta sana obtenida a partir de semilla sin injertar.

**Figure 1.** Roselle plants showing A. Yellow mosaic (plant sampled from Tecoaapa, Guerrero). B. Mosaic (plant grafted in greenhouse with leaves collected from field). C. Control: Healthy plant obtained from ungrafted seed.

94 °C for 4 min, 30 denaturation cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72 °C for 1.5 min, one final extension cycle of 72 °C for 3 min. The amplified products of 1400 pb were sequenced and compared with the GenBank data base.

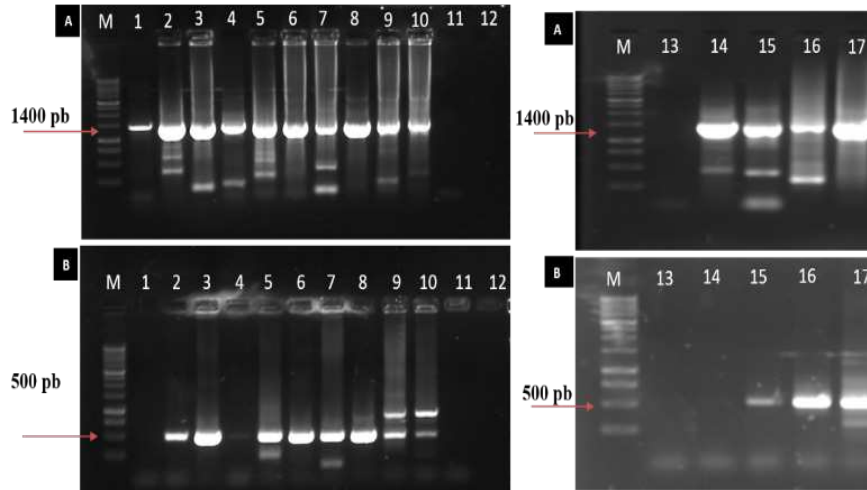
After 30 days, the mechanically inoculated plants showed no symptoms, possibly due to a low concentration of the virus, as well as the presence of inhibitors such as tannins in the plant material used as a source of inoculum that affect the protein of the capsid, causing the precipitation of the virus (Dijkstra and de Jager, 1998), or of a non-transmissible virus in this way. De La Torre-Almaraz *et al.*, (2004) point out that many viruses with an RNA genome are easily transmitted mechanically, and most viruses with a DNA genome are not transmitted in this way, or their transmission efficiency is very low. Four of the

registrados en campo debido posiblemente a las diferentes condiciones ambientales, edad en que se inocularon las plantas (se desconoce el momento de infección en campo), la forma de inoculación (no se sabe si en campo ocurre por vectores o semilla por ejemplo), la carga de inóculo o la presencia de otro(s) virus en campo. Tejido foliar de las cuatro plantas de jamaica injertadas que presentaron síntomas fue usado para hacer extracción de DNA total, amplificación por círculo rodante y PCR para begomovirus de la manera antes descrita.

No se tuvo la amplificación del producto esperado para fitoplasmas, virus de la familia *Potyviridae* y *Okra mosaic virus* (OkMV). Las diez plantas de jamaica con síntomas colectadas en campo y cuatro injertadas que mostraron síntomas en invernadero amplificaron el fragmento del componente A del genoma de begomovirus (1400

grafted plants displayed vein chlorosis and mosaic in younger leaves 17 days after grafting (Figure 1B). The symptoms observed in the greenhouse were different to those recorded on the field, due possibly to the different environmental conditions, age in which plants were inoculated (the moment of infection on the field is unknown), the means of inoculation (whether it occurs on the field by vectors or seed, for example, is unknown), the amount of inoculum, or the presence of other viruses in the field. Foliar tissue of the four grafted roselle plants that showed symptoms were used to carry out a total DNA extraction, rolling circle amplification and PCR for begomoviruses as described above.

The expected product amplification was not obtained for phytoplasmas, viruses of the family *Potyviridae* and *Okra mosaic virus* (OkMV). The ten roselle plants with symptoms obtained



**Figura 2.** Productos de PCR obtenidos con **A.** iniciadores *Sense* DNA-AC/*Antisense* DNA-AC (1400 pb) para el segmento A y **B.** PBL1v2040/PCRC1 (500 pb) para el segmento B de begomovirus bipartitas, respectivamente, a partir de DNA circular amplificado por círculo rodante. Carriles 1-7, 14-16: Plantas de jamaica con síntomas colectadas en campo; Carriles 8-10 y 17. Plantas injertadas que mostraron mosaico; Carril 11: Testigo negativo (planta asintomática); Carriles 12 y 13: Testigo negativo (agua); M: Marcador de peso molecular 1Kb (Promega®).

**Figure 2.** PCR products obtained with **A.** primers *Sense* DNA-AC/*Antisense* DNA-AC (1400 pb) for the segment A and **B.** PBL1v2040/PCRC1 (500 pb) for the segment B of bipartite begomovirus, respectively, from DNA obtained by circle amplification. Lanes 1-7, 14-16: Roselle plants with symptoms, collected from field; Lanes 8-10 and 17. Grafted plants that showed mosaic; Lane 11: Negative control (asymptomatic plant); Lanes 12 and 13: Negative control (water); M: Molecular weight marker 1Kb (Promega®).

pb) (Figura 2A). Siete plantas colectadas en campo y cuatro plantas injertadas que mostraron síntomas amplificaron el fragmento del componente B del genoma de begomovirus (500 pb) (Figura 2B). Estos resultados indican que la mayoría de las plantas muestreadas en Ayutla y Tecoaapa están infectadas con begomovirus bipartitas y que hay al menos uno monopartita. De las diez plantas con síntomas colectadas en campo, ocho tuvieron un porcentaje de similitud de 95 % con *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV), una tuvo un 91 % de similitud con el *Chino del tomate virus* (CdTV) y la restante tuvo un 88% de similitud con el *Malachra alceifolia virus* (MAV). Por otro lado, una de las plantas injertadas con síntomas tuvo un 91 % de identidad con el OkYMMV y las tres restantes un 86-87 % de similaridad con el *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCV). Los bajos porcentajes de similaridad obtenidos en el caso del CdTV, MAV y TbLCCV posiblemente se deban a que se trata de begomovirus no descritos hasta el momento. En México se ha reportado al *Hibiscus variegado virus* (HVV) en *Hibiscus sabdariffa* en la península de Yucatán (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), mientras que en la India, Roy *et al.*, (2009) encontraron al begomovirus *Mesta yellow vein mosaic virus* (MYVMV) en *Hibiscus cannabinus* e *H. sabdariffa*, causando reducción del crecimiento y pérdidas en la producción. Inicialmente el MYVMV ocasiona una clorosis en las nervaduras seguido de un amarillamiento de la lámina foliar. Estos síntomas difieren de los observados en plantas de jamaica colectadas en Guerrero, en las cuales inicialmente se observa un aclaramiento de nervaduras seguido de un mosaico que con el tiempo desaparece y la hoja se torna amarilla con algunas áreas color verde oscuro o blanco. En la península de Yucatán se ha reportado al OkYMMV ocasionando mosaico amarillo y distorsión foliar en *Abutilon permolle*; mosaico

on the field and four grafted plants that displayed symptoms in the greenhouse amplified the fragment of component A of the begomovirus genome (1400 pb) (Figure 2A). Seven plants collected in the field, and four grafted plants that showed symptoms amplified the fragment of the component B of the begomovirus genome (500 pb) (Figure 2B). These results indicate that most of the plants sampled in Ayutla and Tecoaapa are infected with bipartite begomoviruses and that there is at least one monopartite. Out of the ten plants sampled in the field, eight had a percentage of similarity of 95 % with *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV), one had a similarity of 91% with the *Chino del tomate virus* (CdTV), and the rest had a similarity of 88 % with the *Malachra alceifolia virus* (MAV). On the other hand, one of the grafted plants with symptoms had a similarity of 91 % with OkYMMV, and the three remaining, a similarity of 86-87 % with *Tobacco leaf curl Cuba virus* (TbLCCV). The low percentages of similarity obtained in the case of the CdTV, MAV, and TbLCCV are possibly due to yet undescribed begomoviruses. In Mexico there have been reports of the *Hibiscus variegado virus* (HVV) in *Hibiscus sabdariffa* in the Yucatan Peninsula (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007), while in India Roy *et al.* (2009) found the begomoviruses *Mesta yellow vein mosaic virus* (MeYVMV) in *Hibiscus cannabinus* e *H. sabdariffa*, causing a reduction in growth and losses in production. Initially, MeYVMV causes chlorosis in nervations, followed by the yellowing of leaves. These symptoms differ from those observed in roselle plants sampled in Guerrero, in which a clearing of nervations is initially observed, followed by a mosaic that disappears with time, and the leaf turns yellow with some dark green or white areas. There have been reports in the Yucatan Peninsula of OkYMMV causing yellow mosaic and foliar distortion in *Abutilon permolle*;

amarillo, distorsión y moteado foliar en *Corchorus siliquosus*; y mosaico amarillo y moteado en *Sida acuta* (Hernández-Zepeda, *et al* 2007). En 2009, el OkYMMV fue reportado en Texas en el cultivo de oca (*Abelmoschus esculentus*) causando manchas foliares irregulares de color amarillo, amarillamiento de los bordes de las hojas y clorosis en hojas maduras (Hernández-Zepeda *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el amarillamiento de la jamaica en Guerrero, México, está asociado con begomovirus entre los cuales se encuentra el *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV).

#### AGRADECIMIENTOS

Al Fideicomiso Revocable de Administración 2013 No. 167304 del Colegio de Postgraduados por el apoyo económico proporcionado para realizar parte de esta investigación. Al proyecto "Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento, tolerante a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentables" Clave: 163972. Financiado por el FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT por financiar parcialmente el presente estudio.

yellow mosaic, foliar distortion and spotting in *Corchorus siliquosus*; and yellow mosaic and mottling in *Sida acuta* (Hernández-Zepeda, *et al* 2007). In 2009, OkYMMV was reported in Texas in okra (*Abelmoschus esculentus*) crops causing irregular, yellow-colored foliar spots, yellowing of the edges of leaves, and chlorosis in mature leaves (Hernández-Zepeda *et al.*, 2010). The results obtained in this study indicate that the yellowing of roselle in Guerrero, Mexico, is associated to begomoviruses, including *Okra yellow mosaic Mexico virus* (OkYMMV).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To the Fideicomiso Revocable de Administración 2013 No. 167304 of the Colegio de Postgraduados for the monetary support provided to carry out part of this investigation. To the project "Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento, tolerante a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentables" Project code: 163972. Financed by the FONDO SECTORIAL SAGARPA-CONACYT for partially funding this study.

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

LITERATURA CITADA

- Chen J, Chen J and Adams M. 2001. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146:757-766. <https://www.doi.org/10.1007/s007050170144>
- De La Torre-Almaráz R, Monsalvo-Reyes AC, Méndez-Lozano J and Rivera-Bustamante RF. 2004. Caracterización de un nuevo geminivirus asociado con los síntomas de moteado amarillo de la Okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. *Agrociencia* 38: 227-238. <http://www.colpos.mx/agrociencia/Bimestral/2004/mar-abr/art-10.pdf>
- Dijkstra J and de Jager PC. 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*, Springer-Verlag, Berlin. 461 p. <http://www.springer.com/us/book/9783642720307>
- Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U and Ball L A. 2005. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, Academic Press, San Diego, California. 1259 p.
- Galicia-Flores LA, Salinas-Moreno Y, Espinoza-García BM and Sánchez-Feria C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) nacional e importada. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (2): 121-129. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rchsh/v14n2/v14n2a4.pdf>
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35:825-833. <http://www.doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>
- Hernández-Zepeda C, Isakeit T, Scott A Jr. and Brown JK. 2010. First Report of Okra yellow mosaic Mexico virus in

- Okra in the United States. *Plant Disease* 94 (7): 924. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0924B>
- Ortega A A S, Hernández M J, Ochoa M D L and Ayala E V. 2015. First report of *Corynespora cassiicola* causing leaf and calyx spot on roselle in Mexico. *Plant Disease* 99(7):1041. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0438-PDN>
- Roy A, Acharyya S, Das S, Ghosh R, Paul S, Srivastava RK and Ghosh SK. 2009. Distribution, epidemiology and molecular variability of the begomovirus complexes associated with yellow vein mosaic disease of mesta in India. *Virus Research* 141:237–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.022>
- Rojas MR, Gilberston RL, Russell DR and Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polimerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340-347. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-77-0340>
- SIAP, 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- Stephan D, Siddiqua M, Ta Hoang A, Engelmann J, Winter S and Maiss E. 2008. Complete nucleotide sequence and experimental host range of *Okra mosaic virus*. *Virus Genes* 36:231-240. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0181-1>
- Teixeira DC, Wuff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Sallard C and Bové JM. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches' broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98: 977-984. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-98-9-0977>