

Escala cualitativa de severidad de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán

Qualitative severity scale of *Xanthomonas vesicatoria* in chile plants cultivar Becán

Juan Carlos Rico-Aguilar^{1,2}, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar², Gabriel Rincón-Enríquez², Cecilia Guizar-Gonzalez³, José Luciano Morales-García⁴, Nuria Gómez-Dorantes¹, Luis López-Pérez^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.; ²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México. ³CONACYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México. ⁴Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", UMSNH. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, C.P. 60170, Uruapan, Michoacán, México.

Resumen

La mancha bacteriana causada por el agente fitopatógeno *Xanthomonas vesicatoria*, representa una amenaza importante debido a que afecta la producción de diversos cultivos, entre ellos el chile; lo que conduce a graves pérdidas económicas. Por lo que, determinar la gravedad de la enfermedad en las plantas es fundamental para muchos estudios y aplicaciones prácticas donde se necesite el control de la enfermedad, toma de decisiones, estimación de la pérdida de rendimiento y la evaluación de germoplasma con fines de fitomejoramiento. La gravedad de la enfermedad se puede cuantificar de manera precisa mediante herramientas como programas bioinformáticos y plataformas móviles; sin embargo, el método que se usa más ampliamente es la evaluación visual. En este trabajo, a través de un bioensayo de patogenicidad, se elaboró una escala cualitativa ordinal de severidad para *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar "Becán". Se utilizó la cepa bacteriana Bv801 de *Xanthomonas vesicatoria* la cual se inoculó a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹, en plantas de chile 22 días después del trasplante. Se asperjaron dos mL de suspensión bacteriana por planta y posteriormente estas se mantuvieron en un invernadero, con una doble capa de malla sombra, a una temperatura de 32 ± 3 °C, 12 h de luz diurna y una humedad relativa superior al 70%. Se registró la sintomatología

Abstract

The bacterial spot caused by the phytopathogenic agent *Xanthomonas vesicatoria*, represents a significant threat due to the affectation of the production of various crops, including chili; which leads to graves economic losses. Therefore, determining the severity of the disease in plants is essential for many studies and practical applications where disease control, decision making, performance loss specification and germplasm evaluation with plant breeding fines are required.

The severity of the disease can be precisely quantified using tools such as bioinformatics programs and mobile platforms; however, the most modified method used is visual evaluation. In this work, through a pathogenicity bioassay, an ordinal qualitative severity scale for *Xanthomonas vesicatoria* was developed in chili plants cultivar "Becán". The bacterial strain Bv801 of *Xanthomonas vesicatoria*, was considered, which was inoculated at a concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹, in chili plants 22 days after transplantation.

Two mL of bacterial suspension was sprayed per plant and subsequently they were kept in a greenhouse, with a double layer of shade mesh, a temperature of 32 ± 3 °C, 12 h of day light and a relative humidity greater than 70%. Based on the observations, a scale was

mediante observación visual y de las plantas. Con base en las observaciones, se generó una escala con siete niveles desde A (planta sana) hasta G (planta defoliada), mostrando las distintas fases de severidad de la enfermedad.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, mancha bacteriana, severidad, clorosis, defoliación.

*** Autor de correspondencia:**

lexquilax@yahoo.com.mx

Introducción

Entre las enfermedades que atacan al cultivo del chile, la mancha bacteriana es una de las más importantes y es causada por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas vesicatoria*. Esta enfermedad representa una seria amenaza al cultivo (Potnis *et al.*, 2015), ya que conduce a pérdidas económicamente importantes (Thieme *et al.*, 2005). *Xanthomonas vesicatoria* ataca a hojas, tallos, frutos y flores; causa manchas foliares inicialmente pequeñas, pero cuando las manchas son numerosas el follaje se vuelve amarillo y finalmente muere, lo que lleva a la defoliación de las plantas (Jones *et al.*, 2004). Por lo anterior, determinar la gravedad de la enfermedad en las plantas es fundamental en muchos aspectos, principalmente en estudios de patología vegetal. La evaluación del daño causado por una enfermedad tiene aplicaciones desde el punto de vista práctico, donde se necesita tomar decisiones para el control de la enfermedad, estimar la pérdida de rendimiento y evaluar germoplasma tolerante con fines de mejoramiento de cultivos, entre otros (Burdon *et al.*, 2006; Cooke, 2006; Bock *et al.*, 2010b; Pethybridge y Nelson, 2018). Desde el punto de vista operativo, la gravedad de la enfermedad se puede cuantificar de manera precisa mediante programas de análisis de imágenes personalizados disponibles en plataformas estacionarias como Evaluation (Lamari, 2002), CUANT (Barbedo, 2014), programas gratuitos como ImageJ (Schneider *et al.*, 2012); además de plataformas móviles como Leaf Doctor (Pethybridge y Nelson, la

generated with seven levels from A (healthy plant) to G (defoliated plant), showing the different phases of disease severity.

Keywords: *Capsicum annuum*, bacterial spot, severity, chlorosis, defoliation.

Introduction

Among the diseases that attack chili cultivation, the bacterial spot is one of the most important and is caused by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas vesicatoria*.

This disease represents a serious threat to the crop (Potnis *et al.*, 2015), as it leads to economically significant losses (Thieme *et al.*, 2005).

Xanthomonas vesicatoria attacks leaves, stems, fruits and flowers; it causes initially small leaf spots, but when the spots are numerous the foliage turns yellow and eventually dies, which leads to defoliation of plants (Jones *et al.*, 2004). Therefore, determine the severity of the disease in plants is essential in many aspects, mainly in studies of plant pathology. The evaluation of the damage caused by a disease has practical applications, where decisions are needed to control the disease, estimate the loss of yield and evaluate tolerant germplasm for crop improvement purpose among others (Burdon *et al.*, 2006; Cooke, 2006; Bock *et al.*, 2010b; Pethybridge and Nelson, 2018).

From an operational point of view, the severity of the disease can be precisely quantified by means of customized image analysis programs available on stationary platforms such as Evaluation (Lamari, 2002), CUANT (Barbedo, 2014), free software such as ImageJ (Schneider *et al.*, 2012); In addition to mobile platforms such as Leaf Doctor (Pethybridge and Nelson, 2015).

The limitation of these bioinformatics packages is the need for specific equipment

limitante de estos paquetes bioinformáticos es la necesidad de equipos específicos (computadoras o dispositivos móviles), además de cierto nivel de conocimiento para su uso.

El método más usado para evaluar la gravedad de una enfermedad de las plantas es la evaluación visual. Por medio de ésta, es posible estimar de forma visual el área enferma o una sintomatología específica en una hoja u otro órgano vegetal respecto a una planta sana.

La evaluación visual es no destructiva y a menudo es la opción menos costosa, rápida y práctica para evaluar la severidad de la enfermedad en las plantas (Bock *et al.*, 2010). Por otro lado, una desventaja en la estimación de la severidad por este método es el potencial de error (Bock *et al.*, 2008a); por lo que se requieren de métodos estandarizados de cuantificación. Dentro de los métodos para medir la agresividad o daño del patógeno, el uso de escalas logarítmicas diagramáticas es el más ampliamente utilizado. Estas escalas, consisten en la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de plantas mostrando los síntomas de una enfermedad en diferentes grados de severidad (Nascimento *et al.*, 2005).

El uso de estas escalas o métodos estandarizados, ha sido evaluado en otros cultivos y ha demostrado ser confiable. Hernández-Ramos y Sandoval-Islas (2015), comprobaron que el uso de sistemas estandarizados para la cuantificación de enfermedades en maíz, y en cualquier otro cultivo, resulta ser una poderosa herramienta dado que permite la comparación, con resultados fácilmente reproducibles, con altos niveles de exactitud y precisión entre diversos evaluadores; demostrando así su aplicabilidad en la evaluación de la severidad de una enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue, elaborar una escala cualitativa ordinal de virulencia de *Xanthomonas vesicatoria* en plantas de chile cultivar Becán, que permita identificar la severidad y sintomatología de la enfermedad.

(computers or mobile devices), in addition to a certain level of knowledge for its use.

The method that is most widely used to assess the severity of a plant disease is visual evaluation. Through this, it is possible to visually estimate the diseased area or a specific symptomatology on a leaf or other plant organ with respect to a healthy plant.

Visual assessment is non-destructive and is often the least expensive, quick and practical option to assess the severity of disease in plants (Bock *et al.*, 2010).

On the other hand, a disadvantage in estimating the severity by this method is the potential for error (Bock *et al.*, 2008); therefore, standardized quantification methods are required. Within the methods to measure the aggressiveness or damage of the pathogen, the use of logarithmic diagrammatic scales is the most widely used.

These scales consist of the illustrated representation of a series of plants or parts of plants showing the symptoms of a disease in different degrees of severity (Nascimento *et al.*, 2005).

The use of these scales or standardized methods has been evaluated in other crops and has proven to be reliable. Hernández-Ramos and Sandoval-Islas (2015), verified that the use of standardized systems for the quantification of diseases in corn, and in any other crop, turns out to be a powerful tool since it allows comparison, with easily reproducible results, with high levels of accuracy and precision among various evaluators; thus demonstrating its applicability in the evaluation of the severity of a disease. Therefore, the objective of this work was to develop a qualitative ordinal scale of virulence of *Xanthomonas vesicatoria* in chili plants cultivar Becán, which allows identifying the severity and symptomatology of the disease.

Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento. Se produjeron plántulas a partir de semillas de chile cultivar Becán, en charolas de germinación dentro de una cámara de crecimiento a 26 °C. A 56 días de la siembra, las plantas se trasplantaron a bolsas de polietileno negras con capacidad de 2 L, rellenas con una hojarasca de bosque, arena, suelo, perlita, vermiculita y turba en proporción 9:4:4:3:3:1 (v/v) esterilizada a 120°C durante 6 h. Las plantas se mantuvieron en un invernadero, bajo una doble capa de malla sombra de color blanco, a una temperatura promedio de 32 ± 3 °C y 12 horas de luz. Las plantas se regaron cada tercer día con 100 mL de agua destilada. A los siete y 14 días después del trasplante se aplicaron 50 mL de solución nutritiva "Peters" (10-30-20), a una concentración de 1 gL⁻¹.

Bacteria fitopatógena

Se utilizó la cepa bacteriana Bv801 de *Xanthomonas vesicatoria* (aislada de tejido enfermo de chile poblano), la cual fue proporcionada por la Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar del Centro De Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, unidad Zapopan. La bacteria se reactivó a 30°C en medio nutriente-extracto de levadura-glicerol (NYG) (Daniels *et al.*, 1984), durante 24 h. La suspensión bacteriana se recuperó por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C; posteriormente se lavó con agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente. Las células bacterianas se suspendieron en buffer fosfato pH₈ 7, ajustándose a una concentración de 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹.

Pruebas de patogenicidad. Los bioensayos de patogenicidad se establecieron en un diseño unifactorial (planta enferma) y un control (planta sana), ambos con diez repeticiones. A 22 días después del trasplante, las plantas de chile se inocularon asperjando 2 mL de suspensión bacteriana por planta. La aspersión se aplicó a toda la planta en el haz y

Materials and Methods

Vegetal material and growth conditions. Seedlings were produced from chili seeds cultivar Becán, in germination trays inside a growth chamber at 26 °C. 56 days after planting, the plants were transplanted into black polyethylene bags with a capacity of 2 L, filled with a forest litter, sand, soil, perlite, vermiculite and peat in a ratio 9:4:4:3:3:1 (v/v) autoclaved at 120 °C for 6 h.

The plants were kept in a greenhouse under a double layer of white shade mesh, at an average temperature of 32 ± 3 °C and 12 hours of light. The plants were watered every third day with 100 mL of distilled water. At seven and 14 days after the transplant, 50 mL of "Peters" nutrient solution (10-30-20) was applied at a concentration of 1 gL⁻¹.

Phytopathogenic bacteria

The bacterial strain Bv801 of *Xanthomonas vesicatoria* (isolated from diseased tissue of poblano pepper) was used, which was provided by Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar of the Center for Research and Assistance in Technology and Design of the State of Jalisco, Zapopan unit. The bacterium was reactivated at 30 °C in nutrient medium-extract yeast-glycerol (NYG) (Daniels *et al.*, 1984), for 24 h.

The bacterial suspension was recovered by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C; it was subsequently washed with sterile distilled water and centrifuged again. Bacterial cells were suspended in pH 7 phosphate buffer, adjusting to a concentration of 1 x 10⁸ CFU mL⁻¹.

Pathogenicity tests. The pathogenicity bioassays were established in a unifactorial design (diseased plant) and a control (healthy plant), both with ten repetitions. At 22 days after transplantation, chili plants were inoculated by spraying 2 mL of bacterial suspension per plant. Spraying was applied to the entire plant in the beam and undersides of the leaves, to dew point

envés de las hojas, a punto de rocío con un atomizador. Las plantas control se asperjaron con 2 mL de agua destilada estéril para que tuvieran el mismo manejo. Posteriormente, todas las plantas se mantuvieron en un ambiente con una humedad relativa superior al 70 %, la cual se obtuvo mediante microaspersiones de cinco minutos cada hora, con el fin de favorecer el proceso infeccioso de la bacteria fitopatogena. Se registró visual y fotográficamente el daño por el patógeno, desde el momento de la aparición de síntomas que van de puntos o manchas cloróticas, hasta la presencia de necrosis, pérdida de turgencia en las hojas, clorosis generalizada y defoliación.

Resultados y Discusión

Antes del proceso infeccioso, las plantas de chile mostraron una apariencia sana, las hojas estaban turgentes, de color verde intenso, sin presencia de algún síntoma o daño en ninguna de sus hojas (Fig. 1A). Siete días después de la infección comenzaron los primeros síntomas de la enfermedad; puntos de tonalidad amarillo pálido, que mediante observación a contra luz se mostraron translucidos (Fig. 1B); estos síntomas se presentaron sólo en la tercera y cuarta hoja (contando del ápice hacia la base de la planta). A los dos días de la aparición del primer síntoma, los puntos cambiaron de tonalidad, pasando de amarillo pálido a amarillo intenso; mientras que en las hojas inferiores inició la aparición de síntomas (Fig. 1C). Tres días después, en las hojas intermedias aumentó el número de puntos de color amarillo pálido (Fig. 1D). Así mismo se presentó un aumento en la densidad y tamaño de los puntos amarillos, ocasionando la unión entre varios y formando una mancha clorótica en hojas intermedias e inferiores de la planta. Además, algunos puntos amarillos comenzaron a desarrollar un halo necrótico. Cuatro días después, la mayor parte de las hojas maduras perdieron turgencia; la planta en general empezó a perder su color verde natural y se presentó un color verde amarillento (Fig. 1E). Después la aparición de manchas necróticas, comenzó la defoliación de hojas intermedias, mientras que las hojas inferiores presentaron poca

with an atomizer. The control plants were sprinkled with 2 mL of sterile distilled water so that they had the same handling. Subsequently, all the plants were kept in an environment with a relative humidity greater than 70%, which was obtained by microaspersions of five minutes every hour, in order to favor the infectious process of the phytopathogenic bacteria.

The damage by the pathogen was recorded, from the moment of the appearance of symptoms ranging from chlorotic points or spots, to the presence of necrosis, loss of turgidity in the leaves, generalized chlorosis and defoliation.

Results and Discussion

Before the infectious process, the chili plants showed a healthy appearance, the leaves were turgid, of an intense green color, without the presence of any symptoms or damage in any of their leaves (Fig. 1A). Seven days after infection, the first symptoms of the disease began, dots of pale yellow hue, which by translucent observation were translucent (Fig. 1B); These symptoms appeared only on the third and fourth leaf (counting from the apex towards the base of the plant). Two days after the onset of the first symptom, the dots changed in hue, turning from pale yellow to deep yellow; while in the lower leaves the onset of symptom began (Fig 1C). Three days later, the number of pale yellow dots increased in the intermediate leaves (Fig 1D). Likewise, there was an increase in the density and size of the yellow dots, causing the union between several and forming a chlorotic spot in intermediate and lower leaves of the plant.

In addition, some yellow dots (we suppose the first to appear) began to develop a necrotic halo. Four days later, most of the mature leaves lost turgidity; the plant in general began to lose its natural green color and a yellowish green color appeared (Fig. 1E). After the appearance of necrotic spots, the defoliation of intermediate leaves began, while in the lower

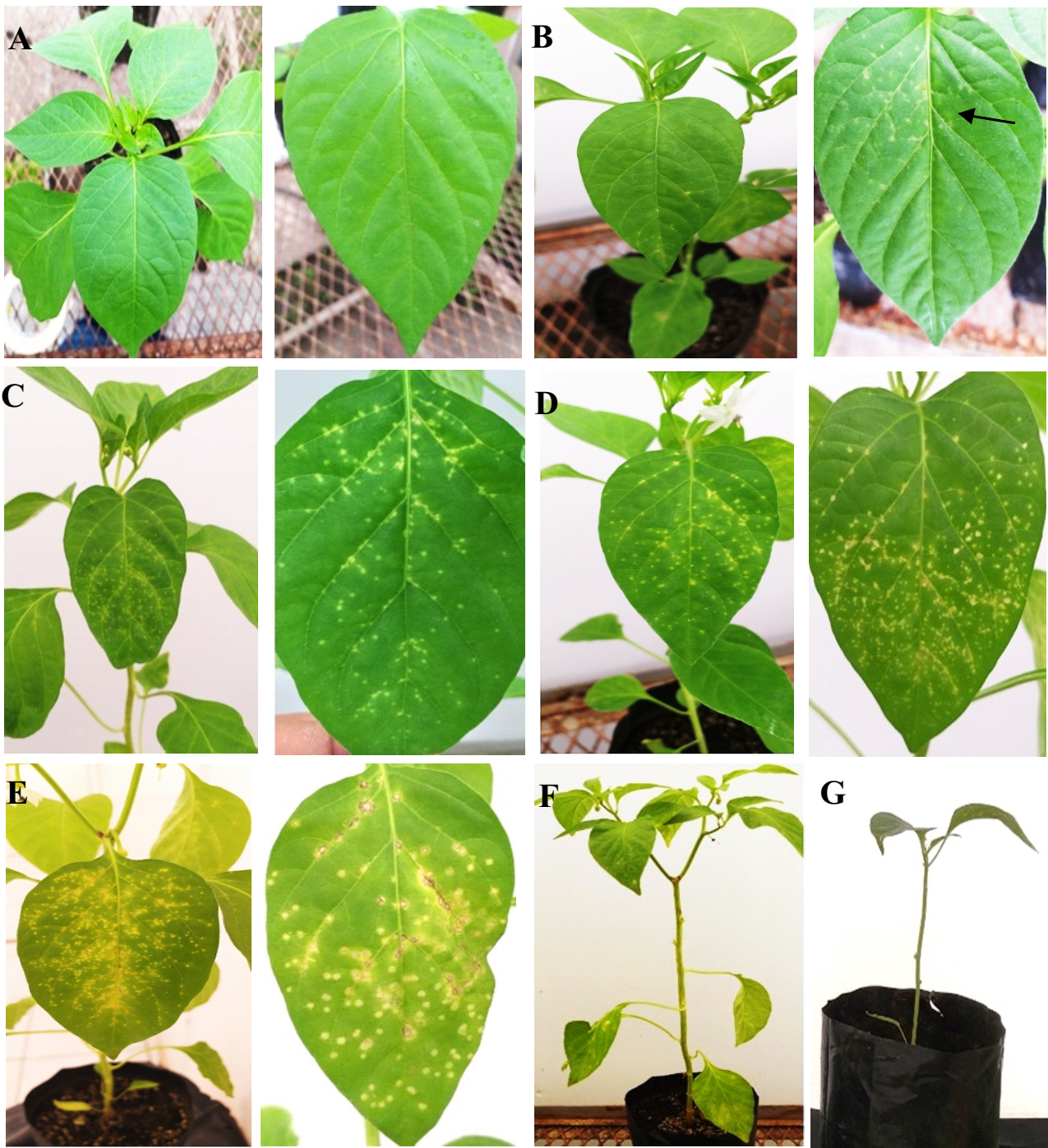


Figura 1. Desarrollo de síntomas en plantas de chile cultivar Becán, infectadas con la cepa Bv801 de *Xanthomonas vesicatoria*. A) Planta sana; B) Aparición de puntos de color amarillo pálido; C) Puntos con tonalidad amarillo intenso ; D) Incremento de puntos amarillos ; E) Aparición y unión de manchas cloróticas ; F) Inicio de defoliación y, G) Planta con defoliación.

Figure 1. Development of symptoms in chili plants cultivar Becán, infected with the Bv 801 strain of *Xanthomonas vesicatoria*. A) Healthy plant; B) Appearance of pale yellow dots; C) Dots with intense yellow hue; D) Increase of yellow dots; E) Appearance and union of chlorotic spots; F) Beginning of defoliation and G) Plant with defoliation.

turgencia; en las hojas jóvenes empezaron a aparecer puntos amarillos (Fig. 1F). Cuatro días después de la pérdida de la primera hoja la planta mostró una defoliación superior al 70% (Fig.1G). El progreso de la enfermedad fue resultado de la combinación de un aumento en número, tamaño y aspecto de las manchas foliares. Sin embargo, es probable que los síntomas puedan variar dependiendo de diferentes factores como condiciones de manejo, el tipo y concentración de inóculo, la variedad de chile, entre otros.

Conclusiones

Mediante la visualización y análisis del número, tamaño y forma de las lesiones, se puede caracterizar el avance de la mancha bacteriana en Chile. Con base en la sintomatología registrada se estableció una escala cualitativa ordinal de severidad de la enfermedad causada por *Xanthomonas vesicatoria*, la cual contempló siete niveles. El cultivar Becán, fue susceptible a la mancha bacteriana, debido a la presencia de abundantes manchas cloróticas y necróticas, y al desprendimiento de hojas.

Agradecimientos

El primer autor agradece al CONACYT la beca otorgada para realizar estudios de maestría. La presente investigación forma parte del proyecto CONACYT: “Desarrollo de bioproductos a base de actinomicetos para su uso en agricultura de bajo impacto” bajo la dirección de la Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, quien a su vez es codirectora de maestría del primer autor. También nuestro agradecimiento a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, por parte del financiamiento de este proyecto en el marco del programa de investigación científica 2019.

Referencias

Barbedo, J. G. A. (2014). Un método automático para detectar y medir los síntomas de la

leaves showed little turgidity, yellow spots began to appear on the young leaves (Fig. 1F). Four days after the loss of the first leaf, the plant showed defoliation greater than 70% (Fig. 1G). The progress of the disease was the result of the combination of an increase in number, size and appearance of leaf spots. However, it is likely that the symptoms may vary depending on different factors such as driving conditions, the type and concentration of inoculum, the variety of chili, among others.

Conclusions

Through the visualization and analysis of the number, size and shape of the lesions, the progress of the bacterial spot in Chile can be characterized. Based on the registered symptomatology, an ordinal qualitative scale of severity of the disease caused by *Xanthomonas vesicatoria* was established, which included seven levels. The Becán cultivar was susceptible to bacterial stain, due to the presence of abundant chlorotic and necrotic spots, and to the detachment of leaves.

Acknowledgements

The first author thanks CONACYT for the scholarship granted for master's studies. This research is part of the CONACYT project: “Desarrollo de bioproductos a base de actinomicetos para su uso en agricultura de bajo impacto” under the direction of Dra. Evangelina E. Quiñones Aguilar, who in turn is co-director of the first author's master's degree. Also our thanks to the Coordinación de la Investigación Científica of the UMSNH, for the financing of this project in the 2019 scientific research program.

References

enfermedad de la hoja mediante el procesamiento digital de imágenes. *Plant Diseases*, 98: 1709-1716.
Bock, C. H., Poole, G. H., Parker, P. E., y Gottwald, T. R. (2010). Gravedad de la

- enfermedad de la planta estimada visualmente, por fotografía digital y análisis de imágenes, y por imágenes hiperespectrales. *Crit. Rev. Plant Sci*, 29: 59-107.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. W., & Fielding, A. H. (1984). Clonación de genes implicados en la patogenicidad de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que utilizan el amplio rango de huéspedes cósmido pLAFR1. *The EMBO Journal*, 3: 3323-3328.
- Hernández-Ramos, L. y Sandoval-Islas, J. S. (2015). Escala diagramática de severidad para el Complejo Mancha de Asfalto del maíz. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33: 95-103.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., & Schaad, N. W. (2004). Reclasificación de las *Xanthomonas* asociadas con la enfermedad de manchas bacterianas de tomate y pimiento. *Syst. Appl. Microbiol*, 27: 755-762.
- Lamari, L. (2002). Evaluación: Software de análisis de imágenes para la cuantificación de enfermedades de las plantas. Sociedad Americana de Fitopatología, St. Paul, MN.
- Nascimento, R. P. A., Michereff, J. S., De la Rosa, L. R. y Gómez, M. A. A. (2005). Elaboración y validación de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. *Summa Phytopathol*, 31: 59-64.
- Pethybridge, S. J., y Nelson, S. C. (2015). Leaf doctor: una nueva aplicación portátil para cuantificar la gravedad de las enfermedades de las plantas. *Plant Dis*, 99: 1310-1316.
- Pethybridge, S. J., y Nelson, S. C. (2018). Estimate, una nueva aplicación para iPad para la evaluación de la gravedad de las enfermedades de las plantas utilizando diagramas de área estándar fotográficos. *Plant Dis*, 102: 276-281.
- Potnis, N., Timilsina, S., Strayer, A., Shantharaj, D., Barak, J. D., Paret, M. L., & Jones, J. B. (2015). Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 16: 907-920.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). Imagen de NIH para ImageJ: 25 años de análisis de imágenes. *Nature Methods*, 9: 671-675.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Büttner, D. & Kaiser, O. (2005). Información sobre la plasticidad del genoma y la patogenicidad de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revelada por la secuencia completa del genoma. *Revista de bacteriología*, 187: 7254-7266.