

FRUIT TEXTURE RELATED CHANGES AND ENHANCED SHELF-LIFE THROUGH TOMATO ROOT INOCULATION WITH *Bacillus subtilis* BEB-13BS

CAMBIOS RELACIONADOS CON TEXTURA DE FRUTOS Y MEJORAMIENTO DE LA VIDA DE ANAQUEL POR LA INOCULACIÓN DE RAÍCES DE TOMATE CON *Bacillus subtilis* BEB-13BS

Hortencia G. Mena-Violante¹, Adrés Cruz-Hernández², Octavio Paredes-López², Miguel Á. Gómez-Lim³, Víctor Olalde-Portugal^{2*}

¹Departamento de Biotecnología. Centro de Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, IPN. Unidad Michoacán. Justo Sierra # 28, Colonia Centro, CP 59510, Jiquilpan, Michoacán México. ²Departamento de Biotecnología y Bioquímica y ³Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Campus Guanajuato, Km 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato-León, Apartado Postal 629, CP 36500 Irapuato, Guanajuato, México. (volalde@ira.cinvestav.mx)

ABSTRACT

Bacillus subtilis BEB-13bs, a plant growth promoting rhizobacteria, has improved tomato firmness. Since firmer fruits are expected to be more resistant to spoilage microorganisms and to have a longer shelf-life, root inoculation with this strain could be an alternative to extend tomato shelf-life. Thus, fruit texture-related changes were studied in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculated with *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Treatments were: 1) non-inoculated control treatment (CTL); 2) PGPR inoculated treatment (BS13). Evaluation was made at different ripening stages. Pericarp firmness and activity of polygalacturonase (PG), the major cell wall polyuronide degrading enzyme in tomato, were measured. The expression pattern of ripening-related genes was also examined. Pericarp firmness was significantly greater in light red (LR) fruits in the BS13 treatment compared to those in the CTL treatment. PG activity was reduced significantly by the BS13 treatment in LR and red (R) fruits compared to the CTL treatment. The expression pattern of *Aco*, gene coding for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), an enzyme that has a regulatory role in ethylene production during fruit ripening, showed a significant decrease in accumulation of the transcript at the R stage in the BS13 treatment compared to that in the CTL treatment. A shelf-life test was performed storing fruits at 25-27 °C for 10 d at the end of this trial, and fruits in the BS13 treatment were significantly firmer than those in the CTL treatment. Moreover, the percentage decay (non-acceptable fruits) was significantly lower in the BS13 treatment than in the CTL treatment. Additionally, the BS13 treatment promoted a significant increase in fruit fresh weight, size and yield per plant, compared to the CTL treatment. The present results support the development of an environment-friendly production tool based on PGPR for improving fruit quality through enhanced firmness and shelf-life.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, *Aco* gene expression, firmness, PG activity, quality, ripening.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: February, 2008. Approved: July, 2009.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 43: 559-567. 2009.

RESUMEN

Bacillus subtilis BEB-13bs, una rizobacteria promotora de crecimiento en plantas, ha mejorado la firmeza del tomate. Dado que frutos más firmes tendrían más resistencia al deterioro por microorganismos y una mayor vida de anaquel, la inoculación de la raíz con esta cepa podría ser una alternativa para extender la vida anaquel del tomate. Así en el presente trabajo se estudiaron los cambios relacionados con la textura de frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) provenientes de plantas inoculadas con *Bacillus subtilis* BEB-13bs. Los tratamientos fueron: 1) tratamiento testigo sin inocular (CTL); 2) tratamiento inoculado con *Bacillus subtilis* BEB-13bs (BS13). Los frutos fueron evaluados en distintos estadios de maduración. Se midió la firmeza del pericarpio y la actividad de poligalacturonasa (PG), enzima mayoritaria de la pared celular implicada en la degradación de poliuronidos. También se realizó un análisis de expresión de genes relacionados con la maduración. La firmeza del pericarpio de los frutos en estadio rojo claro (LR) fue significativamente mayor en el tratamiento BS13 que aquella de los frutos del tratamiento CTL. El tratamiento BS13 redujo significativamente la actividad de PG de los frutos en los estados LR y rojo (R) comparado con el tratamiento CTL. El patrón de expresión de *Aco*, gen que codifica para la oxidasa del ácido aminociclopropano carboxílico (ACO), enzima reguladora de la síntesis de etileno durante la maduración, mostró una disminución significativa en la acumulación del transcrito en frutos en el estadio R del tratamiento BS13 comparado con aquel de los frutos del tratamiento CTL. Se realizó una prueba de vida de anaquel almacenando frutos a 25-27 °C por 10 d; al final de esta prueba; los frutos del tratamiento BS13 resultaron significativamente más firmes que los del tratamiento CTL. Además, el porcentaje de frutos no aceptables fue significativamente inferior en el tratamiento BS13 que en el tratamiento CTL. Adicionalmente, el tratamiento BS13 promovió un incremento significativo del peso fresco y la longitud del fruto, así como del rendimiento por planta, comparado con el tratamiento CTL. Los resultados apoyan el desarrollo de una alternativa de producción ambientalmente amigable basada en la aplicación de BPCV, para mejorar la calidad de frutos en términos de firmeza y vida de anaquel.

INTRODUCTION

Rhizobacteria that exert beneficial effects on plant development are referred to as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Kloepper *et al.*, 1980). PGPR strains promote plant growth by acting as biofertilizers improving nutrient status of host plants (Vessey, 2003), acting as bioprotectants via the suppression of plant disease (Whipps, 2001; Zehnder *et al.*, 2001) or as biostimulants through the production of phytohormones and peptides (Glick *et al.*, 1998; Bashan and de-Bashan, 2004; Jiménez-Delgado, 2004). According to Glick *et al.* (1998), ethylene, the gaseous phytohormone that influences plant growth and development, is implicated in the mode of action of some PGPR which produce 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, an enzyme which could cleave ACC, the immediate precursor to ethylene in the biosynthetic pathway for this hormone in plants. Ethylene controls fruit ripening (Alexander and Grierson, 2002; Alba *et al.*, 2005), a highly complex process characterized by a series of coordinated biochemical and physiological changes that lead to the development of a soft and edible fruit. Ripening influences sensory attributes of fruit quality, including texture. The main cause that reduces fruit quality is an excessive softening which influences shipping, storage and market value (Botella, 2000; Giovannoni, 2001). Fruit softening includes the expression of genes, such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (ACS) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene (ACO), involved in ethylene biosynthesis (Yang and Hoffman, 1984; Bleecker and Kende, 2000), and the polygalacturonase gene (PG).

A diverse range of biotic and abiotic factors can alter agricultural product quality (Schreiner *et al.*, 2000). Benefic rhizosphere microorganisms could be considered as a pre-harvest biotic factor that affects fruit and vegetable quality (Olalde-Portugal and Mena-Violante, 2008). In this sense, Mena-Violante and Olalde-Portugal (2007) reported the positive effects of a PGPR strain (*Bacillus subtilis* BEB-13bs) on tomato fruit quality, particularly on size and texture.

Based on the above information, the objective of our study was to determine the effect of tomato root inoculation with PGPR on fruit texture related changes (physical, biochemical and molecular).

MATERIALS AND METHODS

Plant culture

A greenhouse experiment was set up as follows: tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rio Fuego) was grown from seeds

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, expresión del gen Aco, firmeza, actividad de PG, calidad, maduración.

INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias que ejercen efectos benéficos en el desarrollo de las plantas se denominan bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Kloepper *et al.*, 1980). Las diferentes cepas de BPCV promueven el crecimiento vegetal al actuar como biofertilizantes que mejoran el estatus nutricional de las plantas huéspedes (Vessey, 2003), actuando como bioprotectores mediante la supresión de las enfermedades de la planta (Whipps, 2001; Zehnder *et al.*, 2001) o como bioestimulantes a través de la producción de fitohormonas y péptidos (Glick *et al.*, 1998; Bashan y de-Bashan, 2004; Jiménez-Delgado, 2004). De acuerdo con Glick *et al.* (1998), el etileno, la fitohormona gaseosa que influencia el crecimiento y el desarrollo de las plantas, está implicado en los mecanismos de acción de algunas BPCV que producen 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa, una enzima que actúa sobre el ACC, el precursor inmediato del etileno en la ruta biosintética de esta hormona en las plantas. El etileno regula la maduración del fruto (Alexander y Grierson, 2002; Alba *et al.*, 2005), un proceso sumamente complejo caracterizado por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos coordinados que conducen al desarrollo de un fruto suave y comestible. La maduración influencia los atributos sensoriales de la calidad del fruto, incluida la textura. El ablandamiento excesivo de los frutos es el principal factor que disminuye su calidad, influenciado el transporte, almacenamiento y valor en el mercado (Botella, 2000; Giovannoni, 2001). El ablandamiento implica la expresión de genes, tales como el gen de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACS) y el gen de la 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (ACO), involucrados en la biosíntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984; Bleecker y Kende, 2000), y el gen de la poligalacturonasa (PG).

Existen diversos factores bióticos y abióticos que pueden alterar la calidad de los productos agrícolas (Schreiner *et al.*, 2000). Los microorganismos rizosféricos benéficos podrían considerarse como un factor biótico pre-cosecha que afecta la calidad de frutos y vegetales (Olalde-Portugal y Mena-Violante, 2008). En este sentido, Mena-Violante y Olalde-Portugal (2007) reportaron los efectos positivos de la cepa promotora de crecimiento vegetal *Bacillus subtilis* BEB-13bs sobre la calidad de frutos de tomates, en particular sobre el tamaño y la textura.

Con base en lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio consistió en determinar el efecto de la

in a mixture of peat and perlite (1:1, v/v), seedlings were transplanted after 21 d separately into 3500 cm³ pots containing 5 kg of a mixture methyl bromide sterilized coarse sand and sandy loam soil (1:1 v/v). *Bacillus subtilis* BEB-13bs strain was grown for 12 h at 28 °C in modified potato-dextrose-agar medium (MPDA) in which agar was not added (Johnson and Curl, 1972). Bacterial suspension was adjusted to yield 1 × 10⁷ CFU mL⁻¹ using MPDA. Either 3 mL of MPDA medium (CTL treatment; control) or 3 mL of bacteria suspension (BS13 treatment) were applied into 8 cm deep holes made in pots for transplanting. Plants were irrigated as needed and fertilized weekly with 300 mL per pot of Long Ashton Solution (Hewitt, 1966). There were ten plants per treatment.

Fruits were harvested at different stages of ripeness: green (MG), breaker (B), pink (P), light red (LR) and red (R) (USDA, 1991).

Quality evaluation: size and firmness

Size was determined by measuring fruit fresh weight, size and diameter. All red fruits per plant were sampled and the average weight, length and diameter were calculated. Each plant was a single replication and there were 4 replications per treatment (n=4).

For pericarp tissue, firmness determination, fruits were harvested at B, LR and R stages. Discs were cut from the outer pericarp equatorial wall using a 15-mm cork borer. The discs were trimmed to a thickness of 5 mm by excising the peel and then compressed to 3 mm through the short axis. Compression was accomplished with a 7.6-cm diameter plate probe attached to a Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems). Crosshead speed was 20 cm min⁻¹. Peak heights over the path course were recorded and data were expressed as the reciprocal of N required for the standard compression. Tomato pericarp discs of two opposite points along the equatorial plane of each fruit were evaluated and the average force was recorded (Ahrens and Huber, 1990). Ten fruits from each of the treatments and ripening stages were measured (n=10).

Shelf-life test

Ten red fruits per treatment were harvested and stored at 25-27 °C for 10 d. Fruits were examined every 3 d to determine changes in external quality appearance. Fruits were considered decayed when spots of 1 mm in diameter appeared on their surface due to the natural incidence of spoilage microorganisms. Additionally, a whole fruit firmness evaluation was made at the end of the shelf-life test with a 15 mm conical probe using a Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems), measuring the force when loading at 1 mm s⁻¹ to a specified distance of 15 mm on two opposite points along the equatorial plane and the average force per fruit was recorded (Mena-Violante and Olalde-Portugal, 2007). Each fruit was a single replication and there were 10 replications per treatment (n=10).

PG activity assay

Fruits were harvested at G, B, P, LR and R ripening stages; they were sectioned, locular content was removed, the pericarp tissue

inoculación de raíces de tomate con BPCV sobre los cambios relacionados con la textura (e.g. físicos, bioquímicos y moleculares) de los frutos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de plantas

Se cultivó tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rio Fuego) en invernadero a partir de semillas germinadas en una mezcla de turba y perlita (1:1, v/v); las plántulas se trasplantaron después de 21 d a macetas de 3500 cm³ que contenían 5 kg de una mezcla de suelo limoso-arena (1:1, v/v) previamente esterilizada con bromuro de metilo. La cepa de *Bacillus subtilis* BEB-13bs se cultivó a 28 °C por 12 h, en medio papa-dextrosa-agar modificado (MPDA) al cual no se agregó agar (Johnson and Curl, 1972). La suspensión bacteriana se ajustó una concentración final 1 × 10⁷ CFU mL⁻¹ usando MPDA.

Los tratamientos CTL (tres ml de medio de cultivo estéril) y BS13 (tres ml de la suspensión bacteriana), fueron aplicados directamente al momento del trasplante para lo cual se hicieron cavidades de 8 cm de profundidad en el centro de cada una de las macetas. Se tuvieron 10 plantas por tratamiento. Las plantas se fertilizaron semanalmente con 300 mL (por maceta) de Solución Long Ashton (Hewitt, 1966).

Los frutos se cosecharon en distintos estadios de maduración: verde (MG), breaker o pintón (B), rosa (P), rojo claro (LR) y rojo (R) (USDA, 1991).

Evaluación de calidad: tamaño y firmeza

El tamaño se determinó midiendo peso fresco, longitud y diámetro del fruto. Estas determinaciones se hicieron en todos los frutos rojos frescos de cada planta, obteniendo así el peso promedio, largo promedio y diámetro promedio por planta. Cada planta constituyó una repetición y se tuvieron cuatro repeticiones por tratamiento (n=4).

Para determinar la firmeza del pericarpio, los frutos se cosecharon en los estadios B, LR y R. Se cortaron discos de la zona ecuatorial del fruto utilizando un sacabocado de 15 mm de diámetro. El espesor de los discos se ajustó a 5 mm eliminando la cáscara. Se realizó una prueba de compresión con una sonda plana de 7.6 cm de diámetro (velocidad=20 cm min⁻¹) acoplada a un equipo Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems). Los discos fueron comprimidos hasta un espesor de 3 mm. Los puntos máximos alcanzados durante la trayectoria de la sonda se registraron y los datos se expresaron como el recíproco de N requerido para la compresión estándar. Se analizaron discos de dos puntos opuestos de la zona ecuatorial de cada fruto y se obtuvo el valor promedio de la firmeza (Ahrens y Huber, 1990). Diez frutos de cada tratamiento y cada estadio de madurez fueron evaluados (n=10).

Ensayo de vida de anaquel

Se cosecharon diez frutos rojos por tratamiento y se almacenaron a 25-27 °C durante 10 d. Los frutos se examinaron cada 3 d para

was frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Protein extraction was performed as described by Carrillo-López *et al.* (2002). Protein content was determined by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin as standard. The PG activity was assayed by the cyanoacetamide spectrophotometric method (Gross, 1982). Released reducing sugars were quantified using a standard calibration curve obtained with galacturonic acid (Aldrich Chem. Co.). There were two replicates per treatment and ripening stage and six fruit per replicate.

RNA extraction and Northern analysis

Fruits from each treatment were harvested at G, P, LR and R ripening stages. They were sectioned, the locular content was removed the pericarp tissue was frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C. Total RNA isolation was obtained using the reactive CONCERT, following the manufacturer procedure (Invitrogen). Total RNA (10 mg) was separated in 1 % agarose gel containing 1.1 % formaldehyde, then it was transferred to a Hybond N+membrane (Pharmacia Biosciences) and cross-linked with UV. Blots were hybridized at 55 °C with cDNA probes of *Aco* (pTOM13) or *Pg* (pTOM6), using the Rapid-hyb buffer (Amersham Biosciences). Probes were labeled with ³²P (Rediprime II, Amersham Biosciences). Filters were exposed for 12 h using Kodak Biomax films (Kodak). Band intensities were measured using the Quantity One 1D Analysis software; they were corrected for differences in loading by comparison to ribosomal RNA.

Experimental design and statistical analysis

Experiments were arranged in a completely randomized design with 20 plants per each treatment. Statistical significance of the data was determined using analysis of variance (ANOVA), and means were compared using minimum significant difference (MSD; $p \leq 0.05$) (FAUANL, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

Plant yield and fruit size were improved as reported by Mena-Violante and Olalde-Portugal (2007). PGPR improved fruit size in terms of weight, length and diameter (Table 1). BS13 treatment significantly increased fruit fresh weight (19 %), as well as fruit length (20 %) compared to the CTL treatment, whereas no effect was found on fruit diameter. Plant yield was 28 % higher in the BS13 treatment than that found in the CTL treatment (data not shown).

There is evidence that the mode of action of many PGPR is by increasing the availability of nutrients for the plant in the rhizosphere (Bar-Ness *et al.*, 1992; Richardson, 2001; Hernández-Díaz and Chailloux-Laffita, 2001). However, in our study plants were supplied with the proper amounts of all minerals, and no effect of PGPR inoculation was found on the

determinar cambios en la apariencia. El porcentaje de decaimiento (% Dec) definido como el porcentaje de frutos no aceptables fue determinado considerando como fruto no aceptable aquel en cuya superficie hubiera aparecido al menos una mancha de 1 mm de diámetro debido al ataque natural de microorganismos. Asimismo, se realizó una evaluación de la firmeza del fruto entero al final del ensayo de vida de anaquel. Se realizó una prueba de penetración utilizando una sonda cónica (velocidad=1 mm s⁻¹) acoplada a un equipo Texture Analyzer TA-XT2 (Stable Micro Systems). Se registró la fuerza máxima requerida para penetrar el fruto a una distancia especificada de 15 mm en dos puntos opuestos de la zona ecuatorial. Se obtuvo la fuerza promedio de ambas lecturas por fruto. Cada fruto constituyó una repetición y se tuvieron diez repeticiones por tratamiento (n=10).

Ensayo de la actividad de PG

Los frutos se cosecharon en los estadios de maduración G, B, P, LR y R; se seccionaron, se removió su contenido locular, el tejido del pericarpio se congeló en N₂ líquido y se almacenó a -80 °C. La extracción de proteínas se realizó conforme a lo descrito por Carrillo-López *et al.* (2002). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como estándar. La actividad de PG se ensayó con el método espectrofotométrico de cianoacetamida (Gross, 1982). Los azúcares reductores libres se cuantificaron usando una curva de calibración estándar de ácido galacturónico (Aldrich Chem. Co.). Los ensayos se realizaron por duplicado para cada tratamiento y estadio de maduración usando seis frutos por repetición.

Extracción de RNA y análisis tipo Northern

Los frutos de cada tratamiento se cosecharon en los estadios G, P, LR y R. Se seccionaron, se removió su contenido locular, el tejido del pericarpio se congeló en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C. Se extrajo el RNA total usando el reactivo CONCERT conforme al procedimiento del fabricante (Invitrogen). El RNA total (10 mg) se separó en un gel de agarosa al 1% con formaldehído al 1 %; posteriormente se transfirió a una membrana de nylon Hybond N⁺ (Pharmacia Biosciences) y se fijó con luz UV. Las membranas se hibridaron a 55°C con sondas de cDNA de *Aco* (pTOM13) o *Pg* (pTOM6), usando un buffer de hibridación (Rapid-hyb buffer de Amersham Biosciences). Las sondas se marcaron con ³²P (Rediprime II, Amersham Biosciences). Los filtros se expusieron durante 12 h con películas Kodak Biomax (Kodak). Las intensidades de las bandas se midieron usando el software Quantity One 1D Analysis; estas se corrigieron usando RNA ribosomal como control de carga.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos fueron establecidos con un arreglo completamente al azar con 20 plantas por tratamiento. La significancia estadística de los datos se determinó con un análisis de varianza (ANOVA) y la separación de medias mediante la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS; $p \leq 0.05$) (FAUANL, 1994).

Table 1. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (*B. subtilis*) on tomato fruit size.**Cuadro 1. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (*B. subtilis*) sobre el tamaño de frutos de tomate.**

Treatments	Weight (g)	Length (cm)	Diameter (cm)
CTL	60.2 ± 6.6 b	4.9 ± 0.1 b	4.6 ± 0.2 a
BS13	71.8 ± 9.0 a	5.9 ± 0.3 a	4.8 ± 0.2 a

CTL: Non-inoculated control plants; BS13: BEB-13bs -inoculated plants. Means followed by different letter in a column are significantly different ($p \leq 0.05$; $n=4$) ♦CTL: Plantas testigo sin inocular; BS13: BEB-13bs -plantas inoculadas. Medias seguidas por letras distintas en cada columna difieren significativamente ($p \leq 0.05$; $n=4$).

concentration of macronutrients in fruit (data not shown). Although improved mineral uptake by plants was suggested as an important contribution of PGPR to the positive effects on commercial crops (Vessey, 2003), to attribute a phenomenon of quality enhancement by PGPR was due to a nutritional effect is an oversimplified point of view. In fact, positive effects on plant growth independent on mineral content of the host plants have been found using P-solubilizing *Bacillus* sp. isolates (de Freitas *et al.*, 1997).

Superior tomato shelf-life due to the PGPR root treatment was reflected in the significant lower decay (%) presented by the BS13 treatment (Table 2).

Both treatments showed decay after 10 d of storage at 25-27 °C, but the incidence was 25 % lower in the BS13 treatment than that in the CTL treatment (Table 2). At the end of the shelf-life test, fruits in the BS13 treatment were 22 % firmer than those in the CTL treatment. Although weight loss of tomatoes in the CTL treatment was higher than that in tomatoes from the BS13 treatment, the differences were not significant (data not shown). This is the first report of fruit shelf-life enhanced due to PGPR root inoculation. Since weight was not significantly affected by PGPR treatment, those positive effects in fruits might be derived from fruit morphological changes such as thickness of the outer fruit wall, which delay the attack of microorganisms during storage. Moreover, a significant greater whole fruit firmness in tomatoes from PGPR-inoculated plants has been reported (Mena-Violante and Olalde-Portugal, 2007), and those changes might be also related to possible changes in the locule material and carpel morphology.

The importance of measuring tissue rather than whole fruit firmness, when attempting to relate enzyme activity localized in a specific tissue to changes in texture of that tissue, should be emphasized. PG activity is moderately correlated with firmness of the whole fruit, but is highly correlated with pericarp tissue firmness (Ahrens and Huber, 1990); thus, pericarp tissue firmness

Table 2. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (*B. subtilis*) on fruit tomato shelf-life.**Cuadro 2. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (*B. subtilis*) sobre la vida de anaquel de frutos de tomate.**

Treatment	Shelf -life	
	% Decay	Whole fruit firmness (N)
CTL	67	4.97 ± 0.87 b
BS13	42	6.08 ± 0.55 a

CTL: Non-inoculated control plants; BS13: BEB-13bs -inoculated plants. Shelf-life was determined by % of decay and whole fruit firmness after 10 d of storage at 25-27 °C. Means followed by different letter in a column are significantly different ($p \leq 0.05$; $n=10$) ♦ CTL: Plantas testigo sin inocular; BS13: BEB-13bs -plantas inoculadas. La vida de anaquel se determinó como el % de deterioro y la firmeza del fruto entero después de 10 d de almacenamiento a 25-27 °C. Medias seguidas por letras distintas en cada columna difieren significativamente ($p \leq 0.05$; $n=10$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento y el tamaño de fruto mejoraron de acuerdo a lo reportado por Mena-Violante y Olalde-Portugal (2007). Las BPCV mejoraron el tamaño del fruto en lo que concierne a peso, longitud y diámetro (Cuadro 1). El tratamiento BS13 incrementó significativamente el peso fresco (19 %) y la longitud del fruto (20 %) comparado con el tratamiento CTL, mientras que no se encontró efecto sobre el diámetro. El rendimiento por planta en el tratamiento BS13 fue 28 % mayor que en el del tratamiento CTL (datos no mostrados).

Existe evidencia de que el modo de acción de muchas BPCV consiste en el incremento en la disponibilidad de nutrimentos en la rizosfera para las plantas (Barness *et al.*, 1992; Richardson, 2001; Hernández-Díaz y Chailloux-Laffita, 2001). Sin embargo, en este estudio las plantas fueron provistas con las cantidades apropiadas de todos los minerales y no se observó ningún efecto de la inoculación de BPCV sobre la concentración de macronutrientes en los frutos (datos no mostrados). Aunque se ha sugerido que el aumento en la capacidad de absorción de minerales en las plantas es una contribución importante de las BPCV a los efectos positivos sobre cultivos comerciales (Vessey, 2003), señalar que el aumento de la calidad del fruto por las BPCV se debe a un efecto nutricional es una visión por demás simplista. De hecho, al usar bacterias solubilizadoras de fosfato, se han observado efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas huéspedes que no dependen del contenido mineral de las mismas (de Freitas *et al.*, 1997).

El incremento en la vida de anaquel del tomate por la aplicación de BPCV en las raíces se reflejó en el

was measured in our work. Given that fruit softening increases with ripening (Brady, 1987), in our study the pericarp firmness evaluation was made at different ripeness stages.

Fruits in both treatments showed the typical texture changes during ripening (Table 3) reported by Hobson and Grierson (1993) and Barret *et al.* (1998). The LR fruits in the BS13 treatment showed a significant increase in pericarp firmness compared to that in the CTL treatment (20 %). The B and R fruits did not show significant differences in pericarp firmness between treatments. The fact that fruits in the PGPR-treated plants were firmer in LR fruits suggests a role of PGPR in the ripening process. However, more research must be performed in this area to learn about it.

Firmer fruits are expected to be more resistant to spoilage microorganisms attack (Cooper *et al.*, 1998); in this sense, PGPR treatment not only enhanced whole fruit firmness but also reduced the incidence of spoilage in our study. These findings might be related to PG activity. The PG activity of LR and R fruits in the BS13 treatment was significantly lower (15 and 9 %), than that of fruits in the CTL treatment (Figure 1).

Our results suggested that PGPR could enhance tomato fruits shelf-life through the reduction of PG activity resulting in increased pericarp tissue firmness and increased resistance to fruit pathogen damage (Kramer *et al.*, 1992). As expected, we found that the activity of the PG enzyme became detectable as the fruits initiated color change and increased progressively as ripening proceeded, with peak activity at the red ripe stage (Hobson and Grierson, 1993). Fruits in both treatments showed the same PG activity pattern;

decaimiento significativamente menor (%) presentado por el tratamiento BS13 (Cuadro 2).

Ambos tratamientos mostraron decaimiento después de 10 d de almacenamiento a 25-27 °C, pero la incidencia fue 25 % menor en el tratamiento BS13 que en el tratamiento CTL (Table 2). Al final del ensayo de vida de anaquel los frutos del tratamiento BS13 fueron 22 % más firmes que los del tratamiento CTL. Aunque la pérdida de peso de los tomates del tratamiento CTL fue mayor que la de aquéllos del tratamiento BS13, las diferencias no fueron significativas (datos no mostrados). Este es el primer reporte sobre vida de anaquel del fruto mejorada por la inoculación de raíces con BPCV. Puesto que el tratamiento con BPCV no produjo efectos significativos sobre el peso, tales efectos positivos podrían provenir de los cambios morfológicos del fruto, como el espesor de la pared externa del fruto, lo cual podría retrasar el ataque de microorganismos durante el almacenamiento. Además, se ha reportado una firmeza del fruto entero significativamente mayor en los tomates provenientes de plantas inoculadas con BPCV (Mena-Violante y Olalde-Portugal, 2007) y dichos cambios también podrían estar relacionados con posibles modificaciones en el tejido locular y la morfología del carpelo.

Se debe enfatizar la importancia de medir la firmeza de un tejido en lugar de la firmeza del fruto completo cuando se pretende relacionar la actividad enzimática localizada en un tejido específico con los cambios en la textura del mismo. La actividad de PG se correlaciona moderadamente con la firmeza del fruto entero, pero está altamente correlacionada con la firmeza del tejido del pericarpio (Ahrens y Huber, 1990); por tanto, en este trabajo se midió la firmeza del tejido del pericarpio. Dado que el ablandamiento del fruto aumenta con la maduración (Brady, 1987), en nuestro estudio la evaluación de la firmeza del pericarpio se hizo en distintos estadios de maduración.

En ambos tratamientos los frutos mostraron los cambios de textura típicos de la maduración (Cuadro 3) reportados por Hobson y Grierson (1993) y Barret *et al.* (1998). Los frutos LR del tratamiento BS13 mostraron un incremento significativo en la firmeza del pericarpio comparados con aquéllos del tratamiento CTL (20%). Los frutos B y R no mostraron diferencias significativas de la firmeza del pericarpio entre tratamientos. El hecho de que los frutos de las plantas tratadas con BPCV hayan sido más firmes en el estadio LR sugiere que las BPCV desempeñan una función en el proceso de maduración. Sin embargo, es necesario investigar más al respecto para determinarlo.

Los frutos más firmes parecen ser más resistentes al ataque de microorganismos responsables del decaimiento (Cooper *et al.*, 1998); en este sentido, el tratamiento

Table 3. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (*B. subtilis*) on firmness of tomato pericarp at different ripening stages.

Cuadro 3. Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (*B. subtilis*) sobre la firmeza del pericarpio de tomate en distintos estadios de maduración.

Treatment	Pericarp firmness F (N)		
	Ripening stages		
	B	LR	R
CTL	149.94 ± 34.3 a	67.09 ± 8.6 b	27.76 ± 8.8 a
BS13	163.40 ± 31.5 a	82.25 ± 10.6 a	38.77 ± 9.7 a

CTL: Non-inoculated control plants; BS13: BEB-13bs -inoculated plants. Ripening stages: B: breaker; LR: light red; R: red. Means followed by different letter in a column are significantly different ($p \leq 0.05$; $n = 10$) *CTL: Plantas testigo sin inocular; BS13: BEB-13bs -plantas inoculadas. Estadios de maduración: B: breaker o pintón; LR: rojo claro; R: rojo. Medias seguidas por letras distintas en cada columna difieren significativamente ($p \leq 0.05$; $n = 10$).

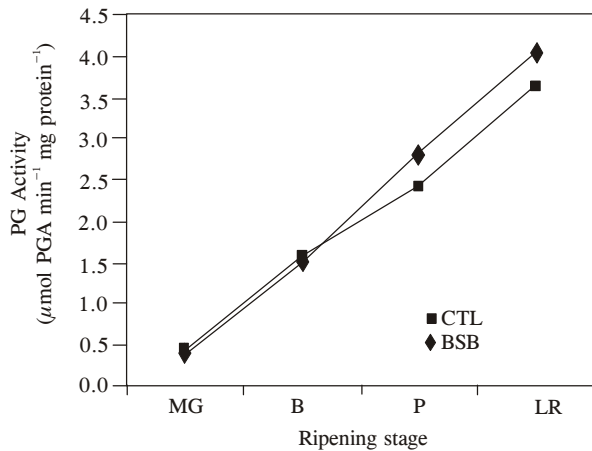


Figure 1. Polygalacturonase activity extracted from individual fruit at various stages of ripeness. Mature green (MG), breaker (B), pink (P), light red (LR), red (R). Values with different letters for each line indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$). (◆) Control treatment; (■) BS13 treatment.

Figura 1. Actividad de poligalacturonasa de frutos en varios estadios de maduración. Verde (MG), breaker o pintón (B), rosa (P), rojo claro (LR) y rojo (R). Los valores mostrados con letras distintas en cada línea indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). (◆) Tratamiento testigo; (■) Tratamiento BS13.

however, root inoculation with PGPR promoted a significant decreased of PG activity in fruits at the later ripeness stages (LR and R) when compared to those from non-inoculated plants.

Regarding PG expression, we were not able to relate the above results with the PG transcript accumulation. Fruits in both treatments showed the expected PG transcript accumulation appearing at the onset of ripening (DellaPena *et al.*, 1986) achieving high levels in ripe fruit (DellaPenna *et al.*, 1987, Fischer and Bennett 1991). However, BS13 treatment did not show any effect on the level of PG expression (data not shown). Although PG plays a significant role in texture changes during ripening, it is not the only factor influencing softening.

Fruits in the CTL treatment showed the characteristic pattern of ACO transcript accumulation during fruit ripening, with a basal level at the mature green stage, exponentially increasing till reaching a peak and declining thereafter at the latest ripening stages (Nakatsuka *et al.*, 1998). The *Aco* transcripts accumulated during ripening in both treatments and showed a drop at the R stage (Figure 2). Interestingly, R fruits in the BS13 treatment presented a decrease in accumulation of the *Aco* transcript compared to those in the CTL treatment.

Changes in the expression pattern of this ripening-related gene, added to the changes in PG enzyme

con BPCV no sólo aumentó la firmeza del fruto entero, sino que además redujo la incidencia de deterioro. Estos hallazgos pueden estar relacionados con la actividad de PG. La actividad de los frutos LR y R del tratamiento BS13 fue significativamente inferior (15 y 9%) que la de los frutos del tratamiento CTL (Figura 1).

Nuestros resultados indicaron que las BPCV podrían aumentar la vida de anaquel de los frutos del tomate mediante la reducción de la actividad de PG, al provocar un incremento en la firmeza del tejido del pericarpio y en la resistencia al daño de patógenos (Kramer *et al.*, 1992). Como era de esperarse, la actividad de la enzima PG fue detectable en el momento en que los frutos comenzaron a cambiar de color y aumentó progresivamente al continuar la maduración, alcanzando su actividad máxima en el estadio rojo maduro (Hobson y Grierson, 1993). Los frutos de los dos tratamientos mostraron el mismo patrón de actividad de PG; sin embargo, la inoculación de las raíces con BPCV fomentó una disminución significativa de dicha actividad en los frutos en los estadios tardíos de maduración (LR y R) al compararlos con los provenientes de plantas no inoculadas.

En lo que concierne a la expresión de PG, no fue posible relacionar los resultados anteriores con la acumulación del transcrito de PG. Los frutos de ambos tratamientos mostraron la acumulación de transcritos de PG esperada que aparece al comienzo de la maduración (Della Pena *et al.*, 1986), alcanzando altos niveles en frutos maduros (DellaPena *et al.*, 1987, Fischer y Bennet, 1991). Sin embargo, el tratamiento BS13 no mostró efecto alguno en el nivel de la expresión de PG (datos no mostrados). Aunque la PG desempeña una función importante en los cambios de textura durante la maduración, no es el único factor que influye el ablandamiento.

Los frutos del tratamiento CTL mostraron el patrón característico de la acumulación de transcritos de ACO durante la maduración del fruto, con un nivel basal en el estadio de maduración verde, incrementándose exponencialmente hasta alcanzar un nivel máximo y disminuir después en los últimos estadios de maduración (Nakatsuka *et al.*, 1998). Los transcritos de ACO se acumularon durante la maduración en ambos tratamientos y registraron un descenso en el estadio R (Figura 2). De modo interesante, los frutos en estadio R del tratamiento BS13 registraron una disminución en la acumulación de los transcritos de ACO comparados con los del tratamiento CTL.

Los cambios en el patrón de expresión de este gen relacionado con la maduración, aunados a los cambios en la actividad enzimática de PG, muestran la influencia de las BPCV sobre el proceso de maduración, lo

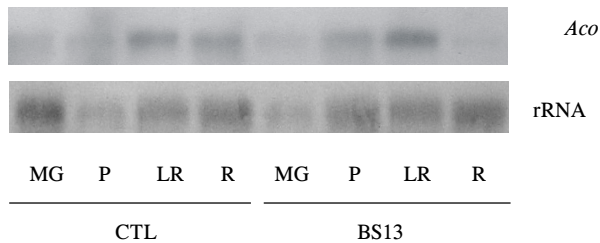


Figure 2. RNA from tomato pericarp tissue from plants (*L. esculentum*) inoculated with: *B. subtilis* BEB-13bs (BS13) or not inoculated (CTL), was isolated for northern analysis. Blots were probed with the ³²P labeled cDNA insert of pTOM13 for *Aco* expression analysis. Ripening stages were: Mature green (G), pink (P), light red (LR) and red (R).

Figura 2. RNA del pericarpio de frutos de plantas de tomate (*L. esculentum*) inoculadas con: *B. subtilis* BEB-13bs (BS13) o sin inocular (CTL), fue aislado e hibridado con una sonda de cDNA de pTOM13 marcada con ³²P para el análisis tipo Northern. Los estadios de maduración fueron: Verde maduro (G), rosa (P), rojo claro (LR) y rojo (R).

activity, point out the influence of PGPR on the ripening process which results in enhanced fruit quality and shelf-life. The fact that bacteria which have those effects on fruit are present only in roots, suggested the involvement of signals that somehow influence the ethylene biosynthetic pathway. PGPR produce phytohormones that are believed to be related to their ability to stimulate plant growth (de Salamone *et al.*, 2001; Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001; Lucas-García *et al.*, 2004). Other growth-regulating substances (Jiménez-Delgadillo, 2004) and volatile organic compounds could be involved (Ryu *et al.*, 2004). The exact mechanism implicated in promoting the reported changes requires further investigation.

CONCLUSIONS

Plant root inoculation with PGPR influences tomato texture in the latest fruit ripening stages. The whole fruit and pericarp firmness were increased by PGPR-root inoculation. Shelf-life improvement seemed to be favored by the reduction of PG activity, the main cell wall enzyme involved in fruit softening. These findings, together with the drop in the ACO transcript accumulation at the red ripening stage due to bacterial inoculation, suggest that PGPR influences somehow the ripening process.

ACKNOWLEDGMENTS

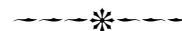
The authors thank Rosalinda Serrato Flores and Luis Jorge Saucedo Arias for technical assistance. Financial support for this

cual resulta en una mayor calidad del fruto y vida de anaquel. El hecho de que las bacterias que producen estos efectos en el fruto sólo estén presentes en las raíces sugirió la participación de señales que influyen de alguna manera en la ruta biosintética del etileno. Las BPCV producen fitohormonas que parecen estar relacionadas con su capacidad para estimular el crecimiento de las plantas (de Salamote *et al.*, 2001; Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001; Lucas-García *et al.*, 2004). Otras sustancias reguladoras del crecimiento (Jiménez-Delgadillo, 2004) y otros compuestos orgánicos volátiles (Ryu *et al.*, 2004) podrían estar involucrados. Se requiere investigar más sobre el mecanismo implicado en la estimulación de los cambios reportados.

CONCLUSIONES

La inoculación de raíces con BPCV influye la textura de tomate en los estadios tardíos de maduración del fruto. La firmeza del fruto entero y del pericarpio se incrementó con la inoculación de raíces con BPCV. El mejoramiento de la vida de anaquel pareció favorecerse con la reducción de la actividad de PG, principal enzima de la pared celular involucrada en el ablandamiento del fruto. Estos hallazgos, junto con el descenso en la acumulación del transcrito de ACO en el estadio rojo maduro debido a la inoculación bacteriana, indican que las BPCV influyen de algún modo el proceso de maduración.

—Fin de la versión en Español—



study was provided by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT).

LITERATURE CITED

- Ahrens, M. J., and D. J. Huber. 1990. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. *Physiolgia Plantarum* 78: 8-14.
- Alba, R., P. Payton, Z. Fei, R. McQuinn, P. Debbie, J. B. Martin, S. D. Tanksley, and J. J. Giovannoni. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell* 17: 2954-2965.
- Alexander, L., and D. Grierson. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53: 2039-2055.
- Bar-Ness, E., Y. Hadar, Y. Chen, V. Romheld, and H. Marschner. 1992. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. *Plant Physiol.* 100: 451-456.
- Barrett, D. M., E. Garcia, and J. E. Wayne. 1998. Textural modification of processing tomatoes. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 205-280.

- Bashan, Y., and L. E. de-Bashan. 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.* 8: 521-577.
- Bleecker, A. B., and H. Kende. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Ann. Rev. Cell Develop. Biol.* 16: 1-40.
- Botella, J. R. 2000. Biotechnological approaches to control postharvest problems. *In: Quality assurance in agricultural products.* Austr. Center Int. Agric. Res. Proc. 100: 175-183.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- Brady, C.J. 1987. Fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 155-178.
- Carrillo-Lopez, A., A. Cruz-Hernandez, A. Carabez-Trejo, F. Guevara-Lara, and O. Paredes-Lopez. 2002. Hydrolytic activity and ultrastructural changes in fruit skins from two prickly pear (*Opuntia* sp.) varieties during storage. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1681-1685.
- Cooper, W., M. Bouzayen, A. Hamilton, C. Barry, S. Rossall, and D. Grierson. 1998. Use of transgenic plants to study the role of ethylene and polygalacturonase during infection of tomato fruit by *Colletotrichum loeospoides*. *Plant Pathol.* 47: 308-316.
- de Freitas, J. R., M. R. Banerjee, and J.J. Germida. 1997. Phosphatesolubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. and Fertility of Soils* 24: 358-364.
- DellaPenna, D., D. C. Alexander, and A. B. Bennet. 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygalacturonase: analysis of polygalacturonase mRNA levels during ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 6420-6424.
- DellaPenna, D., D. S. Kates, and A. B. Bennett. 1987. Polygalacturonase gene expression in Rutgers, rin, nor and Nr tomato fruits. *Plant Physiol.* 85: 502-507.
- de Salamone, I. E. G., R. K. Hynes, and L. M. Nelson. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47: 404-411.
- FAUANL 1994. Paquete de Diseños Experimentales. Versión 2.5. Olivares-Sáenz E. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N.L.
- Fischer, R. L., and A. B. Bennett. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.* 42: 675-703.
- Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. P. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190: 63-68.
- Giovannoni, J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *An. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biol.* 52: 725-749.
- Gross, K.C. 1982. A rapid and sensitive method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortscience* 17: 933-934.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F. R. Tadeo, and M. Talon. 2001. The plant-growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111: 206-211.
- Hernández-Díaz M. I., and M. Chailloux-Laffita. 2001. La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas de Ciencia y Tecnología* 5: 11-27.
- Hewitt, E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *In: Technical Communication*, 2nd Edition. No. 22. Commonwealth Agricultural Bureaux, London, UK.
- Hobson, G., and D. Grierson. 1993. Tomato. *In: Seymour, G., J. Taylor, and A. Tucker (eds). Biochemistry of Fruit Ripening.* Chapman & Hall, London, UK. pp: 405-442.
- Jiménez-Delgado, M. R. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que codifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Ph.D. Thesis, CINVESTAV, Unidad Irapuato, MX.
- Johnson, L. F., and E. A. Curl. 1972. Methods for Research on the Ecology of Soil Born Plant Pathogens. Burgess Publishing Company, Auburn, USA. 247 p.
- Kloepper, J. W., J. Leong, M. Teintze, and M. N. Scroth. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- Kramer, M., R. Sanders, H. Bolkan, C. Waters, R. E. Sheehy, and W. R. Hiatt. 1992. Post-harvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biol. Technol.* 1: 241-255.
- Lucas-García J. A., A. Probanza, B. Ramos, M. Ruiz-Palomino, and F. J. Gutiérrez Mañero. 2004. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie* 24: 169-176.
- Mena-Violante H. G., and V. Olalde-Portugal. 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientia Horticulturae* 113: 103-106.
- Nakatsuka, A., S. Murachi, H. Okunishi, S. Shiomi, R. Nakano, Y. Kubo, and A. Inaba. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-amino cyclopropane-1-carboxylate synthase, of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology* 118: 1295-1305.
- Olalde-Portugal, V., and H. G. Mena-Violante. 2008. Symbiotic associations with bacteria and fungi and its effect on fruit quality. *In: Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa, and S. Lurie. (eds). Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers.* Wiley- BlackWell, Canada.
- Richardson, A. E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Austr. J. Plant Physiol.* 28: 897-906.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, X. H. Wei, W. P. Pare, and J. W. Kloepper. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 100: 4927-4932.
- Schreiner M., S. Huyskens-Keil, A. Krumbein, I. Schonhof, and M. Linked. 2000. Environmental effects on product quality. *In: Shewfelt, R.L, and B. Brückner (eds). Fruits and Vegetables Quality: An Integrated View.* Technomic Publishing, Co., Lancaster. pp: 85-94.
- USDA 1991. United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52: 487-511.
- Yang, S. F., and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.
- Zehnder, G. W., J. F. Murphy, E. J. Sikora, and J. W. Kloepper. 2001. Application to rhizobacteria for induced resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 39-50.