

Alternativas de manejo In vitro de *Erwinia spp.* patogénica en *Saintpaulia ionantha*

In vitro management alternatives of *Erwinia spp.* pathogenic in *Saintpaulia ionantha*

Félix Reyes Marisol¹, Elorza Martínez Pablo¹✉, González Sánchez Arianna Rubí¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Campus Tuxpan.

✉ Autor para correspondencia: pelorza@uv.mx

Recibido: 15/07/2017

Aceptado: 10/12/2017

RESUMEN

El trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficacia in vitro de diferentes bactericidas para el control de *Erwinia sp.* aislada en plantas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*) procedentes de un invernadero en la localidad de Tenango de las Flores, Huachinango, Puebla. Después de realizar los postulados de Koch, el agente causal del tizón bacteriano fue identificado como *Erwinia sp.* Este patógeno daña principalmente en las hojas y puede llegar a destruir toda la planta ya que produce grandes cantidades de enzimas pectolíticas. En el bioensayo de laboratorio se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones y siete tratamientos, Oxicrop, Agri-Mycin® 100, Bactrol® 2x, Hidrobacter®, Terramicina® Agrícola 5%, Final Bacter y Agrobacter®, adicionándose además un testigo sin bactericida y evaluando el efecto de halos de inhibición producidos en un medio de agar de soya tripticaseína. El análisis estadístico indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, a las 48 horas de haber formado halos de inhibición por cada tratamiento (ANOVA $p < = 0.05$). La prueba de comparación de medias, mostro la existencia de diferencias significativas en lo que respecta a los halos de inhibición causados en cada uno de los tratamientos en estudio, siendo el tratamiento 4 (Hidrobacter®), el que presentó el mayor halo de inhibición siendo estadísticamente similar a los tratamientos 1 (Oxicrop) y 6 (Final Bacter). El tratamiento 2 (Agri-Mycin® 100) mostró el menor halo de inhibición lo que significa que el aislado bacteriano mostró tolerancia al efecto de los ingredientes activos (estreptomicina y oxitetraciclina) contenidos en el producto comercial y no sería recomendable su uso en campo a las dosis recomendadas.

Palabras clave: Violeta Africana, Bactericidas, Tuxpan.

ABSTRAC

The objective of the work was to evaluate the in vitro efficacy of different bactericides for the control of *Erwinia sp.* isolated on African violet plants (*Saintpaulia ionantha*) from a greenhouse in the town of Tenango de las Flores, Huachinango, Puebla. After realizing the postulates of Koch, the causal agent of the bacterial blight was identified as *Erwinia sp.* This pathogen mainly damages the leaves and can destroy the whole plant since it produces large amounts of pectolytic enzymes. In the laboratory bioassay, a completely randomized design was used with five repetitions and seven treatments, Oxicrop, Agri-

Mycin® 100, Bactrol® 2x, Hidrobacter®, Terramycin® Agrícola 5%, Final Bacter and Agrobacter®, adding a control without bactericide and evaluating the effect of halos of inhibition produced in a trypticasein soy agar medium. The statistical analysis indicated statistically significant differences between treatments, 48 hours after having formed inhibition halos for each treatment (ANOVA $p \leq 0.05$). The comparison of means test showed the existence of significant differences regarding the halos of inhibition caused in each of the treatments under study, being the treatment 4 (Hidrobacter®), the one that presented the highest halo of inhibition being statistically similar to treatments 1 (Oxicrop) and 6 (Final Bacter). Treatment 2 (Agri-Mycin® 100) showed the lowest halo of inhibition which means that the bacterial isolate showed tolerance to the effect of the active ingredients (streptomycin and oxytetracycline) contained in the commercial product and its use in the field would not be recommended. the recommended doses.

Keywords: African Violet, Bactericides, Tuxpan.

INTRODUCCIÓN

La violeta africana fue descubierta en 1982 en el este de África, por el Barón Walter von Saint Paul, el género fue nombrado en su honor, pertenece a la familia de las Gesneriaceae, siendo la especie más común la *Saintpaulia ionantha*. Este género está formado por seis especies de plantas herbáceas procedentes de África Tropical, siendo *S. ionantha* la especie más cultivada (Espinoza et al., 2007). Actualmente la producción de flores ornamentales ha tomado importancia económica, ya que en el 2007 en México se cultivaron 14,416 ha de especies ornamentales, de las cuales 11,159 ha se dedicaron a la flor de corte, 2,189 ha al cultivo de follajes y 1,068 ha al cultivo de flor en maceta. El 90% de la producción total se obtuvo a cielo abierto y solo el 10% bajo invernadero; se estima que el 87% se cultivó bajo riego y el 13% en temporal. El 90% de la superficie cultivada se encuentra principalmente en los estados de Puebla (32%), Michoacán (19%), México (16%), Morelos (12%) y Veracruz (11%) y del total cultivado, solo el 10% de la superficie se orienta al mercado externo. Las principales especies para

flor de corte producidas en invernadero y a cielo abierto son: rosa, clavel, crisantemo, gerbera, liliium, limonium y gladiola (Vázquez et al., 2003; SAGARPA, 2007). La horticultura ornamental es una actividad que requiere de conocimientos especializados para un buen manejo de las especies cultivadas y que satisfaga cada vez más los gustos y preferencias de los consumidores (García et al., 1999). El estudio de la patología de plantas ornamentales ha sido abordado con interés creciente en nuestro país debido a la importancia que en los últimos años ha representado, sobre todo en el sector florícola. Las prácticas de manejo de enfermedades en plantas se basan en anticipar la incidencia de la enfermedad y de atacar puntos vulnerables en el ciclo de la enfermedad (puntos débiles en la cadena de infección). Por ello se requiere de un diagnóstico adecuado de la enfermedad para identificar el patógeno, así como conocer el ciclo de la enfermedad, incluyendo los factores climáticos y ambientales que influyen en dicho ciclo y de las necesidades de manejo cultural que la planta requiere (Maloy, 2005). En el estado de Puebla, en la localidad de Tenango de las Flores, Huachinango, Puebla es reconocida por la producción de plantas de ornato. Una de las plantas producidas es la violeta africana, una

planta de ornato que es reconocida por su periodo de floración que abarca casi todo el año, por lo que su producción es intensiva. Una de las limitantes de la violeta africana es una enfermedad que daña principalmente las hojas, aunque en infecciones severas puede destruir toda la planta debido a su capacidad para producir grandes cantidades de enzimas pectolíticas, capaces de macerar tejido parenquimatoso de un amplio rango de especies. Entre los diferentes métodos de control utilizados contra las bacterias fitopatógenas, se encuentra el uso de bactericidas, los cuales han sido usados en la agricultura desde los años 50's, siendo la oxitetraciclina y la estreptomycinina de los más utilizados en la actualidad (McManus *et al.*, 2002). En estudios previos se ha relacionado como agente causal de esta enfermedad a una bacteria del género *Erwinia*; sin embargo, se desconoce algún producto químico que sea eficaz para controlar a esta bacteria. Por lo tanto, en el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la eficacia *in vitro* de diferentes bactericidas para el control de *Erwinia sp.* aislada de plantas de violeta africana procedentes de un invernadero en la localidad de Tenango de las Flores, Huachinango, Puebla.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en la localidad de Tenango de las Flores es 20°12'16.5" de latitud norte y los 97°59'14.8" de longitud oeste, que se encuentra situada en el municipio de Huachinango, Puebla, a 1300 msnm.

La colecta de material enfermo se llevó a cabo en las plantaciones comerciales de un vivero, ubicado en la comunidad Tenango de las Flores, Huachinango, Puebla. Se recolectaron plantas de violeta africana con síntomas de tizón bacteriano en las hojas. Las plantas enfermas se trasladaron en bolsas de plástico al laboratorio de

Parasitología Agrícola de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana que se encuentra localizada entre los 21° 08" y 20° 44" de latitud norte y los 97° 13" y 97° 36" de longitud oeste, ubicada en la carretera Tuxpan-Tampico km 7.5. Las plantas enfermas se trasladaron al laboratorio con el fin de analizar los síntomas en hojas para el aislamiento de la bacteria responsable la enfermedad. En el laboratorio, con condiciones asépticas se tomaron muestras del tejido infectado. Se cortaron secciones de 0.5 cm², se desinfectó el material con hipoclorito de sodio al 1 % durante 1 minuto, enseguida se mantuvieron en agua destilada estéril durante 1 minuto para eliminar el exceso de hipoclorito de sodio, después se secó con papel filtro estéril. El tejido seco se sometió a cortes más finos, los cuales se depositaron en un tubo de ensaye que contenía 5 ml de agua destilada esterilizada. Cinco minutos después de haber depositado los tejidos en agua destilada, con un asa bacteriológica se tomó una alícuota, la cual se sembró en cajas Petri que contenían medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Anexo1). Las cajas Petri se incubaron a temperatura ambiente por 48 h.

Después de observar el desarrollo de colonias bacterianas en la placa de PDA, a partir del material vegetal, se procedió a purificarlas mediante la transferencia de colonias a nuevas placas de medio de cultivo para efectuar la prueba de patogenicidad.

Para determinar si la bacteria aislada era el agente causal de tizón bacteriano en hojas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), se procedió a verificar los postulados de Koch. Con la bacteria aislada se realizaron las pruebas de patogenicidad correspondientes, para lo cual se suspendieron en agua destilada esterilizada

colonias bacterianas purificadas y se inocularon en plantas de violeta africana sanas por medio de infiltración en hojas con la ayuda de una jeringa. La planta inoculada se mantuvo en un ambiente de alta humedad relativa y se observó durante varios días el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Una vez desarrollado los síntomas se realizó un reaislamiento de las bacterias que estuvieron afectando el tejido vegetal y se corroboró si éstas fueron similares a las que se inocularon al principio del experimento de patogenicidad.

El aislado bacteriano que reaccionó positivamente a las pruebas de patogenicidad, se procedió a identificarlos a nivel de género, considerando sus características morfológicas. Para el caso del aislado bacteriano que resultó positivo se realizó la caracterización de la cepa, para ello se tomó en cuenta características como: la pureza del cultivo, morfología de la colonia, tinción de Gram, la prueba de oxidasa y la inoculación sobre rodajas de papa para determinar la capacidad de ocasionar pudrición de papa (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

El aspecto general del crecimiento bacteriano en medios de cultivo, y sus características de forma, tamaño, color, aspecto y consistencia de las colonias, son variables entre las especies de bacterias fitopatógenas; sin embargo, con frecuencia en los medios donde se desarrollan dan una idea acerca de su identidad, por lo que es conveniente tomar en cuenta las características de las colonias bacterianas, sobre todo al realizar el aislamiento a partir del material enfermo (Valencia, 2011).

La determinación del Gram de las bacterias, también se puede realizar de una forma más rápida y sencilla, empleando únicamente

solución acuosa de KOH al 3%. Si se forma un “hilo bacteriano”, la reacción se considera positiva y significa que la bacteria pertenece al grupo de las Gram negativas. Por el contrario, si después de unos minutos no se forma el hilo, las bacterias se catalogan como Gram positivas (Gilchrist-Saavedra *et al.*, 2005).

Bioensayo: Prueba de eficiencia de bactericidas para el control *in vitro* de *Erwinia sp.* El ensayo se realizó en un diseño completamente al azar, con siete tratamientos (bactericidas-dosis) y cinco repeticiones por tratamiento (1 repetición = una placa Petri). Las dosis utilizadas correspondieron a las dosis comerciales establecidas en las etiquetas de los productos utilizados, se incluyó un testigo absoluto.

Para evaluar la susceptibilidad a bactericidas se desarrolló el método de difusión en disco, conocido como Kirby-Bauer, los resultados se interpretaron comparando el diámetro de la zona con el criterio publicado por el comité Nacional para estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS por sus siglas en inglés). El criterio interpretativo para las pruebas de difusión en disco categoriza los resultados como susceptible, intermedio o resistente (Jorgensen *et al.*, 1998).

Se utilizaron 7 bactericidas de uso comercial a diferentes concentraciones. Los productos químicos se diluyeron en agua esterilizada para obtener la concentración deseada, para el testigo se utilizó agua destilada esterilizada.

Se tomaron colonias aisladas de *Erwinia sp.* incubadas durante 48 horas en agar de soya tripticaseína se pusieron y se colocaron en un tubo con 9 mL de agua destilada estéril, se agitó en un vórtex y se ajustó

visualmente a la escala turbidimétrica No. 3 de McFarland (3 X10⁸ UFC/mL). De la suspensión bacteriana, se tomaron 200 µL y se depositaron en cajas Petri con agar tripticaseína de soya. Posteriormente, la solución se dispersó usando perlas de vidrio esterilizadas. Después, se colocaron sobre la superficie del agar 4 discos de papel filtro de 4mm de diámetro estériles, previamente impregnados en una solución con el antibiótico, según las dosis recomendadas en las etiquetas comerciales. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Finalmente, se midió con un vernier el diámetro de los halos de inhibición (Kunz y Moellering, 1971; Faria y Maringoni, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La bacteria aislada a partir de tejido vegetal de violeta africana con síntomas de tizón bacteriano fue identificada como *Erwinia sp.* ya que la bacteria mostró reacción de Ryu o KOH positivo, reacción que es usual en bacterias Gram negativo; adicionalmente, las colonias desarrolladas en medio de cultivo fueron las típicas del género *Erwinia*: colonias de color blanco, crema, translúcidas con bordes ligeramente onduladas; además mostraron reacciones de oxidasa negativa y pudrición de papa positiva.

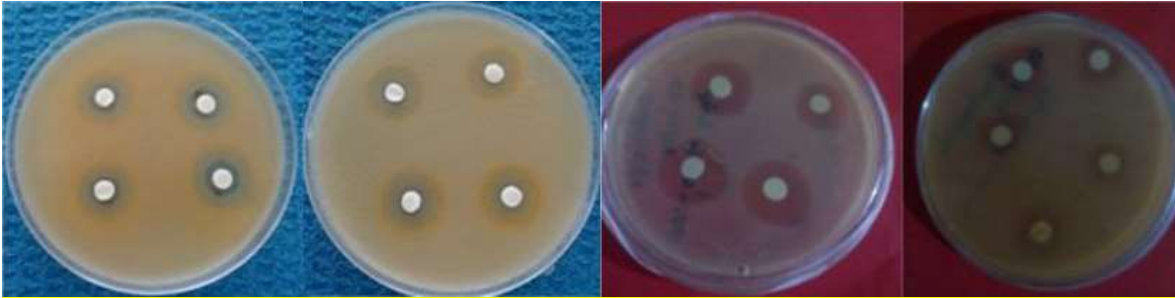
De acuerdo con Perombelon y Kelman (1980), consideran que la pudrición blanda causada por *Erwinia sp.* en violeta africana se debe a la producción de enzimas pectolíticas que maceran los tejidos vegetales y es una de las principales enfermedades a nivel mundial.

En la prueba de patogenicidad el aislado bacteriano identificado como *Erwinia sp.* produjo pudrición en plantas de violeta africana sanas. Los síntomas iniciales se observaron a los 5 días e incluyeron la aparición de zonas de apariencia acuosa; posteriormente, a los 10 días se observó una pudrición acuosa de consistencia blanda a partir del sitio de inoculación.

Los resultados antes mencionados concuerdan con González et al., (2013) quienes señalan que *Erwinia sp.* es capaz de infectar a un elevado número de especies de plantas cultivadas, además reportan que esta bacteria ha sido aislada, entre otras especies, en maíz, papa, clavel y violeta africana (*Saintpaulia ionantha*). *Erwinia sp.* resulta particularmente agresiva debido a su capacidad de causar infecciones latentes que se activan en post-cosecha en diferentes hortalizas, por lo que las consecuencias negativas no se limitan a la mera disminución del rendimiento, sino que afectan a la comercialización del producto.

En este trabajo pudimos observar que en las plantas de violeta africana, las infecciones latentes que existen en viveros se encuentran plantas en el periodo de comercialización, lo que ocasiona mayores pérdidas por los costos involucrados en empaque y transporte a los sitios de venta.

Evaluación de bactericidas para el control in vitro de *Erwinia sp.* Los bactericidas evaluados causaron distintitos halos de inhibición en el bioensayo realizado (Figura 1).

Figuras 1. Halos de inhibición con diferentes bactericidas para el control in vitro de *Erwinia sp.*

El análisis de varianza realizado para el rango de inhibición por tratamiento indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados con un nivel de confianza del 95%.

La prueba de comparación de medias de Tukey al 5% mostro la existencia de diferencias significativas en lo que respecta a los halos de inhibición causados cada uno de los tratamientos en estudio, siendo el tratamiento 4 (Hidrobacter®), el que presentó el mayor halo de inhibición siendo estadísticamente similar a los tratamientos 1 (Oxicrop) y 6 (Final Bacter) (Cuadro 1). El tratamiento 2 (AgriMycin® 100) mostró el menor halo de inhibición lo que significa que el aislado bacteriano mostró tolerancia al efecto de los ingredientes activos

(estreptomicina y oxitetraciclina) contenidos en el producto comercial y no sería recomendable su uso en campo a las dosis recomendadas. La Oxitetraciclina, junto con la Estreptomicina, son los antibióticos más comúnmente utilizados en la agricultura (McManus et al., 2002), aunque en un estudio hecho por Sivaprakasam (1995) fue la Estreptomicina, quedando en segundo lugar de eficiencia, la que registró el mayor halo de inhibición al confrontarse con una cepa de *Erwinia* causante de la pudrición suave de la cebolla; contrariamente, un producto comercial conteniendo Oxitetraciclina fue poco efectiva en un trabajo in vitro realizado con bacterias fitopatógenas aisladas de *Eucalyptus* (Cunha et al., 2006).

Cuadro 1. Comparación de medias de la variable halo de inhibición en cada uno de los tratamientos con prueba de Tukey 5%.

Tratamientos	Medias (cm)	Grupo estadístico
4	2.0000	A
1	1.9132	AB
6	1.8687	AB
7	1.8000	BC
5	1.6850	C
3	1.6500	C
2	1.2500	D
8	0.0000	E

Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p < =0.05$).

La sensibilidad in vitro, se determinó mediante el método de difusión de antibiótico en discos de papel filtro (Método de Kirby Bauer) en medio de cultivo agar tripticaseína de soya. Los antibióticos inhibieron el crecimiento en agar sobre el aislamiento de *Erwinia sp.* (Cuadro 1). Los siete antibióticos evaluados causaron halos de inhibición del crecimiento del aislamiento de *Erwinia sp.* La reacción del aislamiento de *Erwinia sp.* a la mayoría de los antibióticos representaron una categoría de susceptibilidad intermedia y mostró la categoría de resistente a uno de los antibióticos comerciales evaluado. Chinedum (2005) quien señala que posiblemente, la resistencia a antibióticos podría atribuirse al desarrollo de mecanismos de supervivencia eficaces ante diferentes tipos de principios activos de antibióticos. La eficacia de los antibióticos para inhibir o destruir microorganismos consiste en atravesar las membranas de las células bacterianas y después fijarse sobre los sitios de acción; por el contrario, en los aislados que muestran cierto grado de resistencia, ésta podría deberse a la inhibición enzimática del antibiótico, la impermeabilidad de la membrana o la modificación de rutas metabólicas (Farfan et al., 2014). Los resultados con este trabajo coinciden con estudios de sensibilidad de bacterias fitopatógenas de varias áreas del Brasil, donde indicaron que los huertos de manzano que habían recibido numerosos tratamientos con estreptomycin tenían una mayor proporción de aislamientos resistentes (Farfán et al., 2014).

CONCLUSIÓN

El Sulfato de kanamicina + Clorhidrato de oxitetraciclina (Hidrobacter®), Clorhidrato de oxitetraciclina (Oxicrop) y Sulfato de gentamicina + clorhidrato de oxitetraciclina (Final Bacter) fueron altamente efectivos en la

inhibición del crecimiento de *Erwinia sp.*, a una concentración de 3g/l, 2.0 g/l y 2.0 g/l respectivamente de manera in vitro. El Sulfato de estreptomycin + clorhidrato de oxitetraciclina mostró el menor halo de inhibición sobre *Erwinia sp.* por lo cual no sería recomendable para una aplicación en condiciones de campo.

LITERATURA CITADA:

- Chinedum E. 2005. Microbial resistance to antibiotics. Afr. J. Biotechnol. 4 (13), 1606-1611.
<https://doi.org/10.4314/ajfand.v4i13.717>
- Cunha, J.F., E. A. Toledo-Picoli., A. Couto-Alfenas and R. Coelho-Gonçalves. 2006. "In vitro" effect of antibiotics and rhizobacteria on the control of phytopathogenic bacteria in Eucalyptus spp. Rev. Ávore. 30:1-9.
<https://doi.org/10.1590/S0100-67622006>
- Espinoza, R. A., Silva, P. J., González, P. O., Fajardo, R. L. y Pérez, P. J. (2007). Multiplicación in vitro de *Violeta Africana (Saintpaulia ionantha)*. Revista Electrónica Gramma Ciencia.
- Farfán, L. M., Benítez S. V., y Hoyos-Carvajal, L. M. 2014. Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 8:20-33.
<https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2>
- Faria G. T y Maringoni A. C. 2000. Ação de produtos químicos in vitro e in vivo sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal do cancro bacteriano do tomateiro. Scientia Agricola. 57(3): 439-443.
<https://doi.org/10.1590/S0103-90162000>
- García G., Hernández C. y Martínez L. 1999. Floricultura en México y entorno mundial. Proyecciones, Año 1 Número 1 junio-agosto de 1999.
<http://www.cem.itesm.mx/dacs/publicaciones/proy/n1/inveco1.html>. Consultado 23 de febrero del 2017.

- Gilchrist-Saavedra, L., Fuentes-Dávila, G., Martínez-Cano, C, M LópezAtilano, R.M., Duveiller, E., Singh, R. P., Henry, M., and García, A. I. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2ª edición. CYMMYT. México. 68 págs.
- González, C. J. C., Elorza, M. P., López, J. A., Mateos R. R. A., y González, A. A. 2013. Etiología de la pudrición foliar blanda de la Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendlan) en Tenango de las flores, Huachinango, Puebla. Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan 1:22-26.
- Jorgensen J. H. and Ferraro M. J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases.26:973-980.
<https://doi.org/10.1086/513938>
- Kunz L. J. y Moellering R. C. 1971. Mechanical method of inoculating plates for antibiotic sensitivity testing. Applied microbiology. 22(3): 476-477.
<https://doi.org/10.1128/AEM.22.3.476-4>
- McManus PS, VO Stockwell, GW Sundin, and AL Jones. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. Annu. Rev. Phytopathol.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40>
- Perombelon, M. C. M. and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot Erwinias. Annu. Rev. Phytopathol. 18:361-387.
<https://doi.org/10.1146/annurev.py.18.09>
- SAGARPA, 2007. Sembrando soluciones. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
<http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/sembrando/2007/07-2007.pdf>. Consulta: 1 de febrero de 2017
- Sivaprakasam AD. 1995. Antibiotics and garlic clove extract-inhibitory of cell wall degrading enzymes. Hindustan Antibiot. Bull. 37:44-47.
- Valencia, V. J. 2011. Caracterización e identificación de la bacteria que causa la pudrición del maíz. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. 46 págs.
- Vázquez, G. L. M., García, F. A., Norman, M. T. 2003. Cultivo de crisantemo. Manual. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. 30 p.

Copyright (c) 2017 Marisol Félix Reyes, Pablo Elorza Martínez y Arianna Rubi González Sánchez



Este texto está protegido por una licencia licencia [Creative Commons 4.0](#).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)