

Patogenicidad de *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) en cuatro genotipos de cebolla (*Allium* spp.)^{1,2}

Rodrigo O. Campo³ y Mildred Zapata⁴

J. Agric. Univ. P.R. 80(3):123-134 (1996)

RESUMEN

La cebolla constituye uno de los principales cultivos hortícolas en Puerto Rico. *Burkholderia cepacia* (= *Pseudomonas cepacia*) es la bacteria causal de la enfermedad conocida como piel avinagrada de la cebolla. En Puerto Rico se ha informado *B. cepacia* UPR-5C como biocontrolador de algunos hongos fitopatógenos. Sin embargo, se desconocen las características patogénicas de dicha cepa. Se realizó un estudio con cuatro genotipos comerciales de cebolla: tres de bulbo (amarilla, roja = escalonia, blanca = española) y una de hoja-cebollín, para determinar la patogenicidad de *B. cepacia* UPR-5C. Se empleó un diseño completamente aleatorizado en un arreglo de parcelas divididas. Los genotipos de cebolla se inocularon con células viables representativas de cada fase de crecimiento de *B. cepacia* UPR-5C en una concentración 10⁶ UFC/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro) y con filtrados sin células de cada fase. Los síntomas de severidad se evaluaron a los siete días. Solamente las inoculaciones con células viables de la bacteria causaron síntomas de pudrición en los bulbos amarillos. La cebolla roja, la blanca y el cebollín no mostraron susceptibilidad. Se concluye que el aislamiento de *B. cepacia* UPR-5C es patogénico en la cebolla amarilla. Sin embargo, hay diferentes niveles de resistencia en el huésped.

ABSTRACT

Pathogenicity of *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) in four onion genotypes (*Allium* sp.)

Onion is one of the major crops in Puerto Rico. The bacterium *Burkholderia cepacia* (basonym: *Pseudomonas cepacia*) is the causal agent of the onion disease sour skin. In Puerto Rico the strain *B. cepacia* UPR-5C has been reported as a biological control agent of various phytopathogenic fungi. At present, the pathogenic characteristics of this strain are unknown. The pathogenicity of *B. cepacia* UPR-5C was determined in four commercial onion genotypes, yellow, red scallions, white spanish and slip, by using a

¹Manuscrito sometido a la junta editorial el 9 de octubre de 1995.

²Este estudio se realizó como un problema especial graduado en el Departamento de Protección de Cultivos y fue financiado parcialmente por el proyecto 8-158 de la AID/PSTC/UPR/DR. Los autores agradecen al Sr. R. Echávez y al Dr. E. Schröder por el interés demostrado durante el curso de la investigación.

³Graduado del Programa de Maestría, Departamento de Protección de Cultivos.

⁴Profesora-Bacterióloga, Departamento de Protección de Cultivos, Recinto Universitario de Mayagüez, Apartado 5000, Mayagüez, P.R. 00681.

complete randomized design with split plots. The onion genotypes were inoculated with bacteria of 10^8 CFU/ml from each growth phase and with the filtrates corresponding to each phase. Symptoms were evaluated seven days after inoculation. Treatments with cells, but not filtrates, induced symptoms in the yellow onion genotype. The red, white and slip genotypes were not susceptible, but the bacterium is pathogenic to yellow onions. There are, however, different levels of resistance within the species.

Key words: *Burkholderia cepacia*, biological control, onion, *Pseudomonas cepacia*

INTRODUCCION

Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes) anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia* (Burkholder) ha sido estudiada en los pasados 20 años por sus características de biocontrolador de hongos patógenos (IJSB, 1993; Yabuuchi et al., 1992). Esta bacteria se encuentra comúnmente en el suelo y se ha aislado de la rizósfera de cultivos hortícolas, cereales, leguminosas y frutales inhibiendo a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* y a *Helminthosporium solani* (Hagedorn et al., 1987, Lambert et al., 1987).

Aspersiones con células vivas de *B. cepacia* en concentraciones de 10^3 - 10^5 protegen los frutos de manzanas y peras de mohos causados por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* (Janisiewicz y Roitman, 1988). También controla a *Cercospora zea*, *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, *Macrophomina phaseolina*, *Helminthosporium maydis*, *H. solani*, y *Septoria tritici* (Jayaswal et al., 1990; Lambert et al., 1987) en maíz. Plántulas de cebolla de bulbo amarillo y plántulas de guisantes se protegieron de la pudrición (damping-off) causada por *Fusarium oxysporum* y *Pythium* sp. (Kawamoto y Lorbeer, 1976; Parke, 1990) mediante inoculaciones artificiales con *B. cepacia*.

Además de sus características como biocontrolador, *B. cepacia* es también una bacteria fitopatógena. *B. cepacia* está reportada como patógeno desde 1950 por Burkholder. Este informó la bacteria como el patógeno causante de la pudrición de la cebolla de bulbo amarillo, enfermedad denominada piel avinagrada (sour skin) debido al sabor que causa en el bulbo (Burkholder, 1950). Se ha demostrado bajo condiciones in vitro que la actividad antifúngica de *B. cepacia* solamente es producida por las células vivas (Kawamoto y Lorbeer, 1976).

En la actualidad, el control biológico es una de las alternativas de mayor potencial en la agricultura porque no es nocivo al ambiente. Sin embargo, antes de utilizar un organismo como control biológico deben dilucidarse todas las características de potencial fitopatógeno.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar, en términos de patogenicidad en cebolla, la cepa de *B. cepacia* UPR-5C que inhibe el crecimiento micelial del hongo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid

(Campo, 1992; Parke, 1990; Perdomo, 1990), patógeno en habichuela y determinar la fase de crecimiento de la bacteria asociada a la enfermedad denominada piel avinagrada de la cebolla.

MATERIALES Y METODOS

El cultivo de *B. cepacia* UPR-5C utilizado en el estudio se obtuvo de la colección de bacterias del Dr. Eduardo C. Schroder localizada en el Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, del Recinto Universitario de Mayagüez. Dicho aislamiento se ha caracterizado por su poder biocontrolador de *Macrophomina phaseolina* (Campo, 1992; Perdomo, 1990; Sánchez, 1991).

Las fases de crecimiento de *B. cepacia* UPR-5C se determinaron bajo condiciones controladas de temperatura y aireación. El cultivo puro se activó en el medio sólido triptosa y levadura (TY) [5 g de triptosa, 3 g de extracto de levadura, 1.3 g de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y 17 g de agar en un litro de agua] por 24 horas para mantenerlo en la fase de crecimiento logarítmico. Se reactivó en medio líquido TY por 24 horas. Con el objetivo de disminuir el metabolismo, la suspensión se sometió a temperatura baja (5°C) durante tres horas antes de empezar la curva de crecimiento. En dos matraces Erlenmeyer que contenían 40 ml del medio líquido TY se vertió 0.5 ml de la suspensión bacteriana para obtener una densidad óptica de 0.02 de absorbancia a 360 nm. La incubación del cultivo se efectuó a 28°C en un agitador rotativo a 100 rpm.

Las etapas de crecimiento se determinaron mediante lecturas periódicas de absorbancia con un espectrofotómetro (Spectronic 20)⁵ durante 44 días. Se cuantificó el número de colonias presentes en cada fase haciendo diluciones en serie en medio líquido de TY preparado con una décima parte de sus componentes. Luego se dispersó 0.1 ml de las suspensiones de TY sólido y se incubó durante 48 horas a 28°C.

Se determinó la patogenicidad de *B. cepacia* en cuatro genotipos comerciales de cebolla; tres de bulbo (amarilla, roja (escalonia) y blanca (española)) y una de hoja cebollín. Estos genotipos los distribuye Garden Rich Produce Corporation de Bradfurd, Ontario, Canada. Los genotipos se inocularon con células viables representativas de cada fase de crecimiento en una concentración de 10^8 UFC/ml según se describen los tratamientos más adelante. También se hicieron inoculaciones con sus respectivos filtrados sin células.

Las células viables de cada fase de crecimiento se sedimentaron por centrifugación a 4250 rpm durante 15 minutos, se lavaron y se resus-

⁵Las marcas registradas sólo se usan para proveer información específica y su uso no constituye garantía por parte de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico ni endoso sobre otros productos o equipo que no se mencionan.

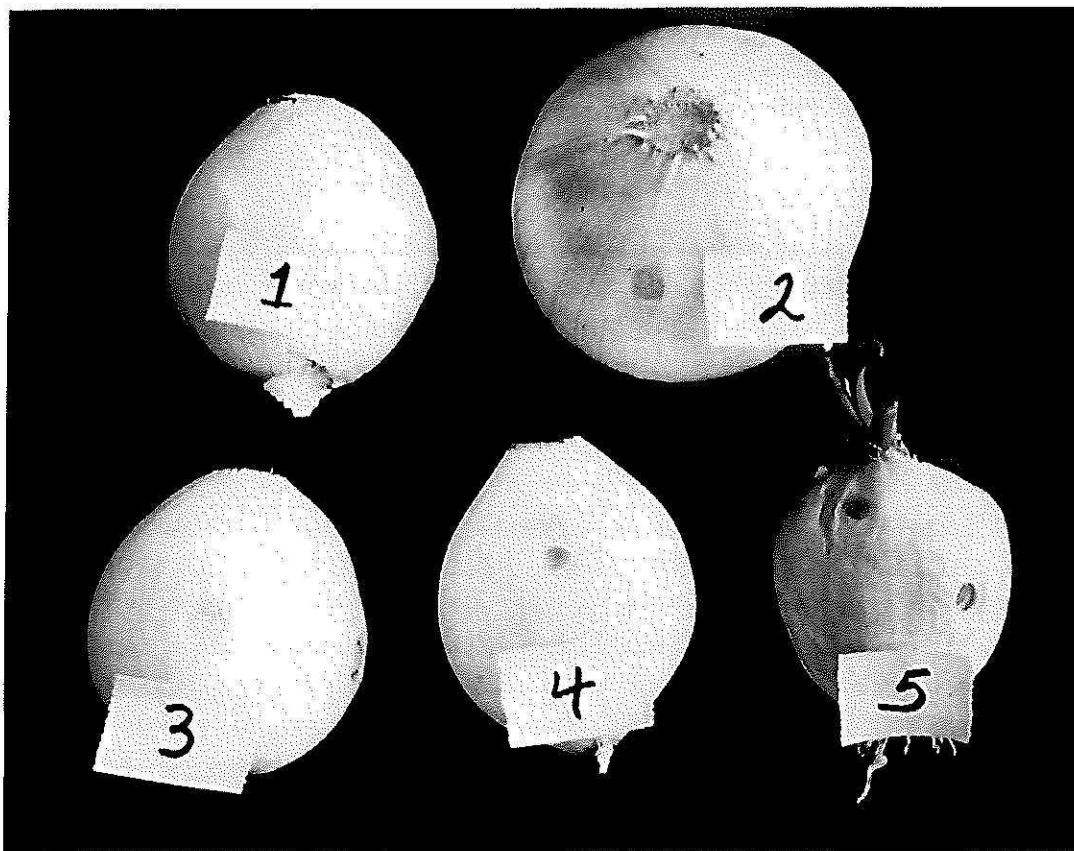


FIGURA 1. Escala de severidad de *Burkholderia cepacia* UPR-5C en bulbos de cebolla: 1) sin síntomas; 2) ligera decoloración alrededor de la laceración; 3) pudrición leve; 4) pudrición blanda y profunda; 5) pudrición total de la cebolla.

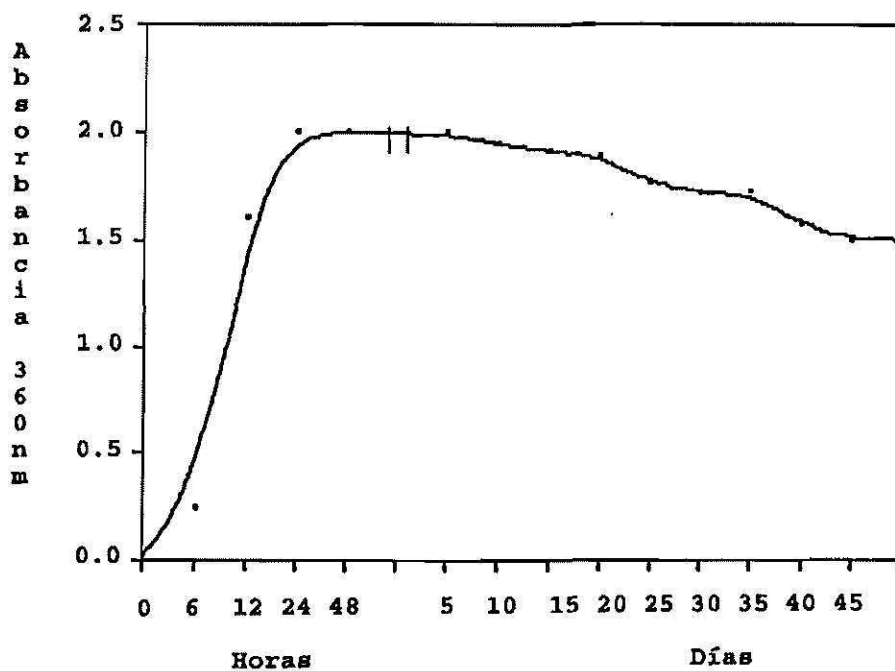


FIGURA 2. Crecimiento de *B. cepacia* UPR-5C en medio líquido de triptosa y levadura a 28°C en agitador rotativo a 100 rpm.

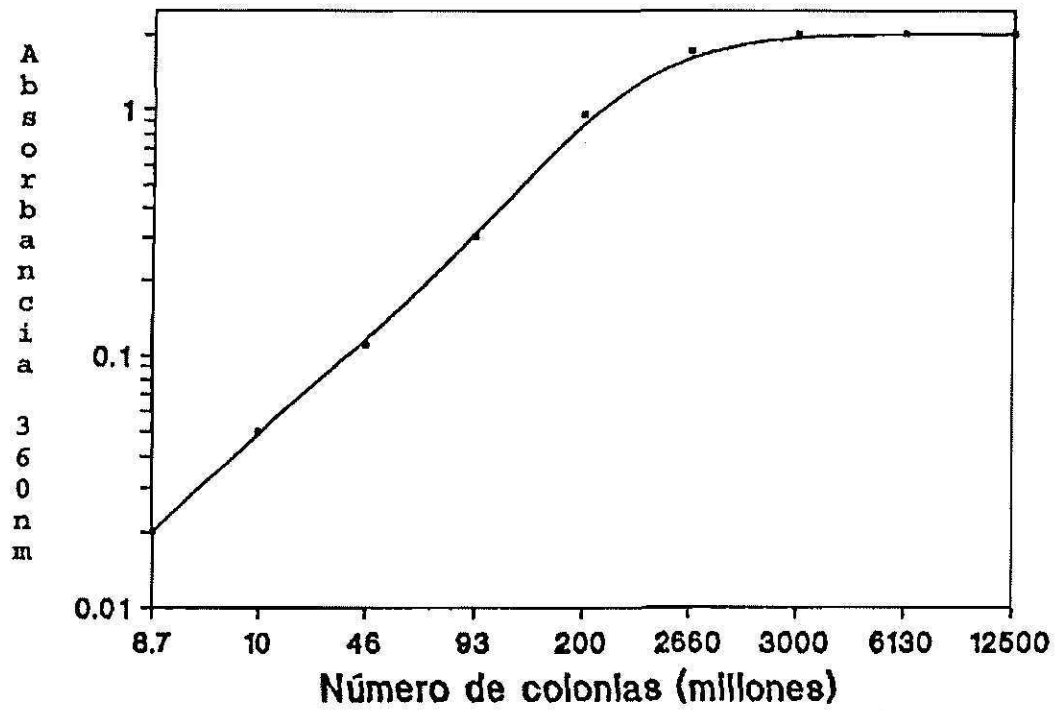


FIGURA 3. Relación del número de colonias de *B. cepacia* UPR-5C con la absorbancia; incubadas en el medio líquido de triptosa y levadura a 28°C en un agitador rotativo a 100 rpm por 44 días. Las diluciones se hicieron en el medio TY.

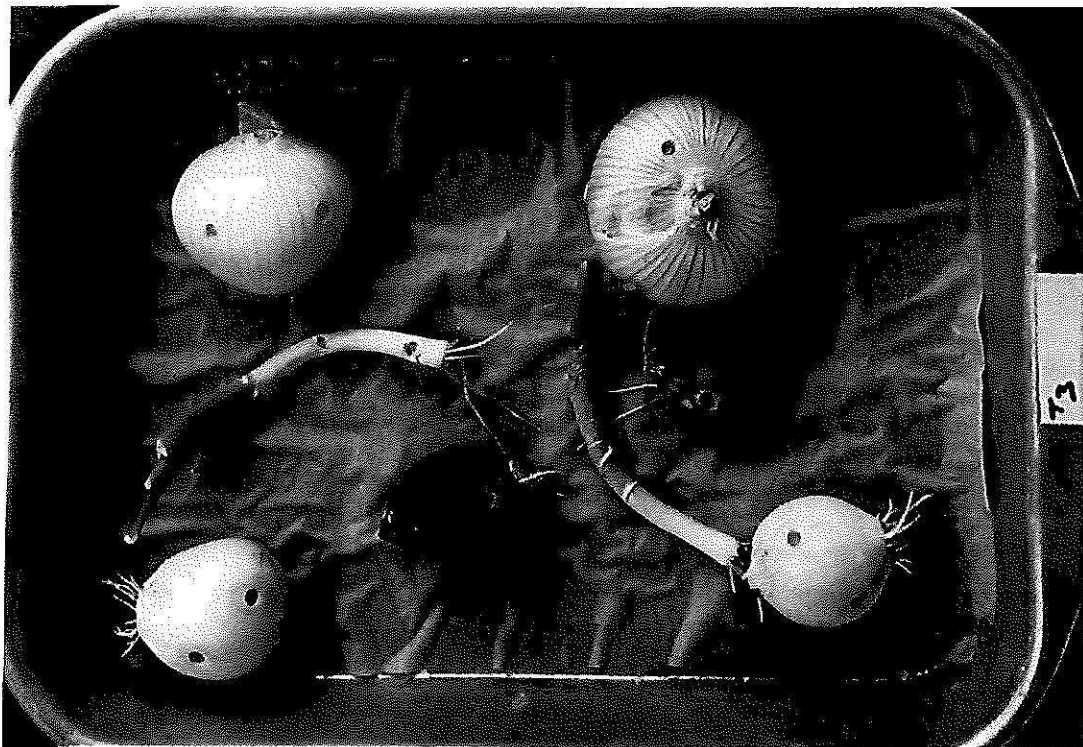


FIGURA 4. Genotipos de cebolla inoculados con *B. cepacia* a los siete días bajo condiciones in vitro.

pendieron en una solución amortiguadora de fosfato de potasio a 0.01M y pH 7. Los filtrados sin células de cada fase de crecimiento se obtuvieron tomando 10 ml del sobrenadante, después de dos centrifugaciones y filtración a través de un filtro de membrana de 0.22 μ .

Se empleó un diseño completamente al azar en un arreglo de parcelas divididas. En la parcela grande se asignaron los tratamientos bacterianos, filtrado y control y en las subparcelas los genotipos de cebolla. En la comparación de medias de tipo de inóculo se usó la prueba de contrastes ortogonales de L.S.D. protegida.

Los genotipos se colocaron en 10 bandejas a las cuales previamente se les colocó una capa de papel absorbente húmedo. Cada bandeja contenía los cuatro genotipos de cebolla con dos repeticiones. Los tratamientos fueron: células vivas de *B. cepacia* UPR-5C, en la fase logarítmica de seis horas de crecimiento (tratamiento 1) y 12 horas (tratamiento 2); células vivas en la fase estacionaria de 18 días (tratamiento 3) y 44 días (tratamiento 4); filtrados de la fase logarítmica de 6 horas (tratamiento 6) y 12 horas (tratamiento 7) y de la fase estacionaria 18 días (tratamiento 8) y 44 días (tratamiento 9). Se emplearon dos controles con el medio TY uno sin filtrar (tratamiento 5) y otro filtrado (tratamiento 10).

Las inoculaciones se realizaron haciendo dos laceraciones, con perforador de corchos de 5 mm de diámetro, en cada cebolla donde se depositaron 50 μ l de cada suspensión o filtrado utilizado como tratamiento. Se tomaron lecturas diarias por genotipo de cebolla inoculado por tratamiento.

Las bandejas se cubrieron con plástico durante 14 días. La severidad de los síntomas se evaluó durante siete días empleando la siguiente escala 1 = sin síntomas; 2 = ligera decoloración alrededor de la laceración; 3 = pudrición leve; 4 = pudrición blanda y profunda; 5 = pudrición total de la semilla (Figura 1).

A los siete días después de la inoculación, con una aguja de asa, se frotaron las laceraciones donde se habían colocado los diferentes inóculos en los diferentes genotipos y luego se suspendió lo obtenido en medio líquido TY durante 48 horas a 28°C. El reaislado se inoculó posteriormente en bulbos de cebolla amarilla. A los 14 días se evaluó el número de capas infectadas cortando longitudinalmente el bulbo y calificándolo en una escala de 3 grados donde 3 = bulbo sano; 2 = una capa infectada; 3 = dos o más capas infectadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Burkholderia cepacia UPR-5C presentó, en medio líquido TY, una fase de reposo (lag) de dos horas, una fase logarítmica de crecimiento

(log) de 12 horas y se mantuvo en la fase estacionaria por 30 días (Figura 2). Luego empezó a descender lentamente a tal punto que a los 44 días se encontraron células viables en la dilución de 10^6 UFC/ml. El número de colonias osciló entre 8.7×10^6 y 1.25×10^{10} UFC/ml (Figura 3). El potencial de sobrevivencia bajo condiciones normales de laboratorio es muy alto para la cepa *B. cepacia* estudiada y bajo condiciones naturales la bacteria puede sobrevivir en el suelo.

Los análisis de variancia para severidad y número de capas infectadas mostraron diferencias altamente significativas tanto para tipos de inóculo como para las variedades, con coeficiente de variación de 14.86 y 12.88% respectivamente (Cuadro 1). Las comparaciones ortogonales mostraron diferencias significativas entre los tratamientos con células y sus filtrados. Estos últimos, al igual que los controles no indujeron ningún síntoma en las cebollas. Solamente los tratamientos con células vivas causaron síntomas de la enfermedad, o sea, que la bacteria no depende de productos secundarios extracelulares para causar enfermedad en la cebolla.

Los bulbos amarillos mostraron la mayor severidad de la enfermedad, seguidos por los bulbos rojos y los bulbos blancos mientras que en el cebollín no se observaron síntomas luego de inocular con los tratamientos 1, 2, 3, 4, y 5 (Cuadro 1, Figuras 4 y 5). El número de capas infectadas fue significativamente diferente en la variedad amarilla en la que se produjo pudrición (Figura 6). Estos resultados concuerdan con

CUADRO 1.—Reacción de cuatro genotipos de cebolla (*Allium sp.*) a inoculaciones con células de *B. cepacia* UPR-5C.

Genotipo	Severidad ¹	Capas Infectadas
Amarilla	3.68a ¹	2.50a
Roja (escaliones)	1.56b	1.12b
Blanca (española)	1.31bc	1.18b
Cebollín	1.00c	1.00c
Filtrados ²	1.00c	1.00c
Control ³	1.00c	1.00c
LSD	0.30	0.13

¹Evaluación con escala de cinco grados en donde 1 = cebolla sana y 5 = cebolla totalmente deteriorada.

²Resultado promedio en los cuatro genotipos de cebolla tratados con filtrados de *B. cepacia* UPR-5C, sin células.

³Control = Resultado promedio en los cuatro genotipos de cebolla tratados con el tratamiento control.

⁴Medias con la misma letra en sentido vertical no difieren significativamente según la prueba LSD protegida.

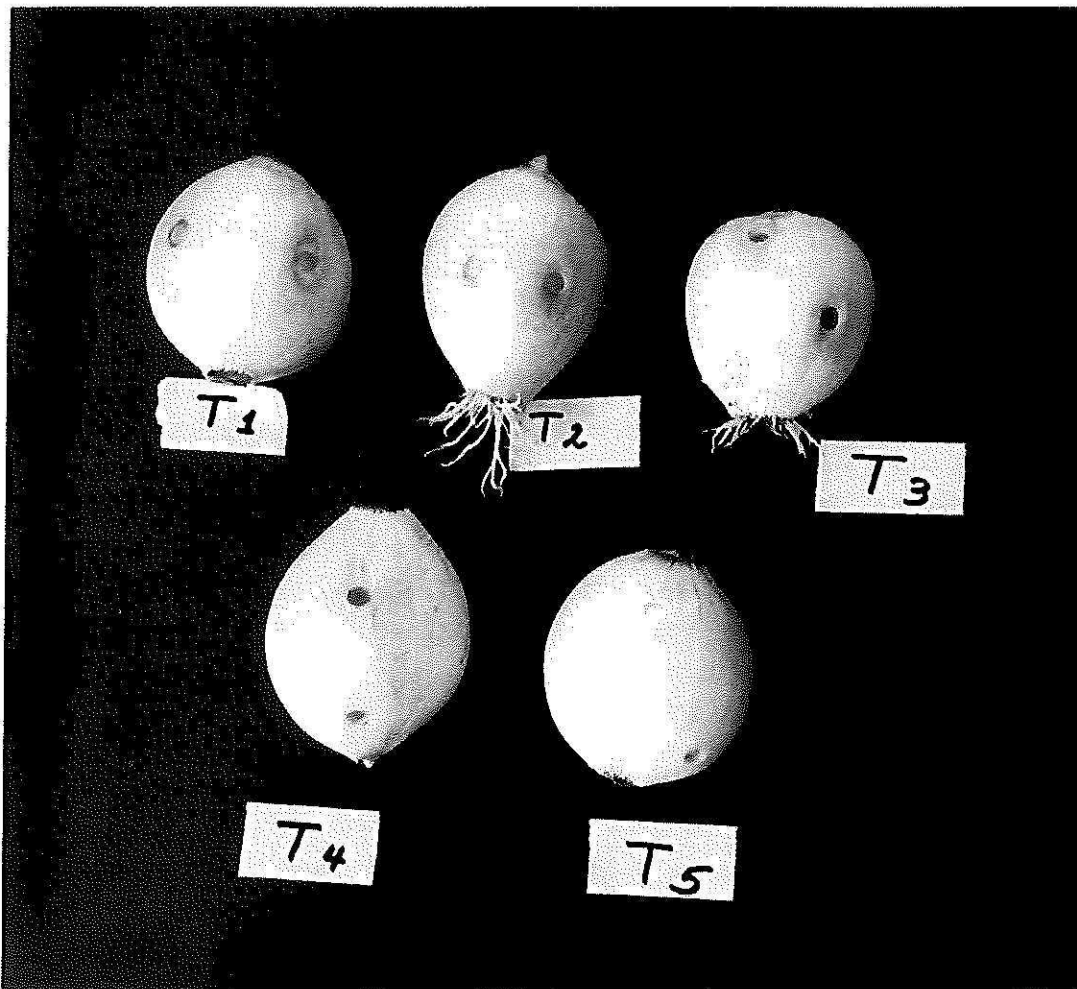


FIGURA 5. Reacción del genotipo amarillo a la inoculación de los tratamientos 1 = logarítmica 6 hrs, 2 = logarítmica 12 hrs, 3 = estacionaria 18 días, 4 = estacionaria 44 días y 5 = control.

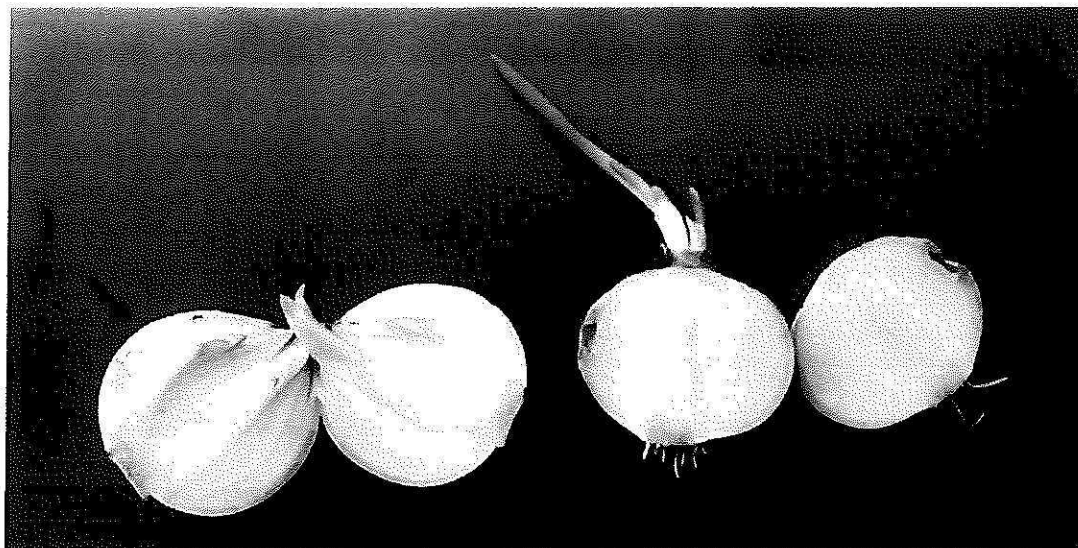


FIGURA 6. Corte transversal del genotipo de cebolla amarillo mostrando capas infectadas con *B. cepacia* (derecha) versus la reacción al control (izquierda).

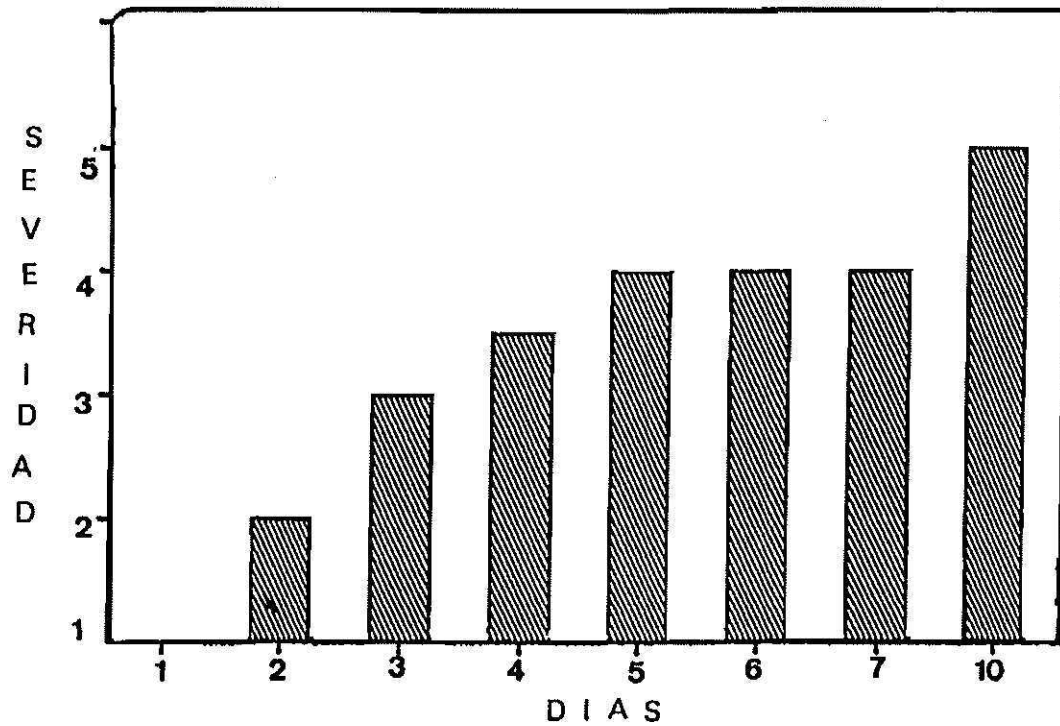


FIGURA 7. Severidad de *B. cepacia* UPR-5C en cebolla de bulbo amarillo durante 10 días de incubación. (1) sin síntomas (2) decoloración alrededor de la laceración (3) pudrición leve (4) pudrición blanda (5) deterioro total.

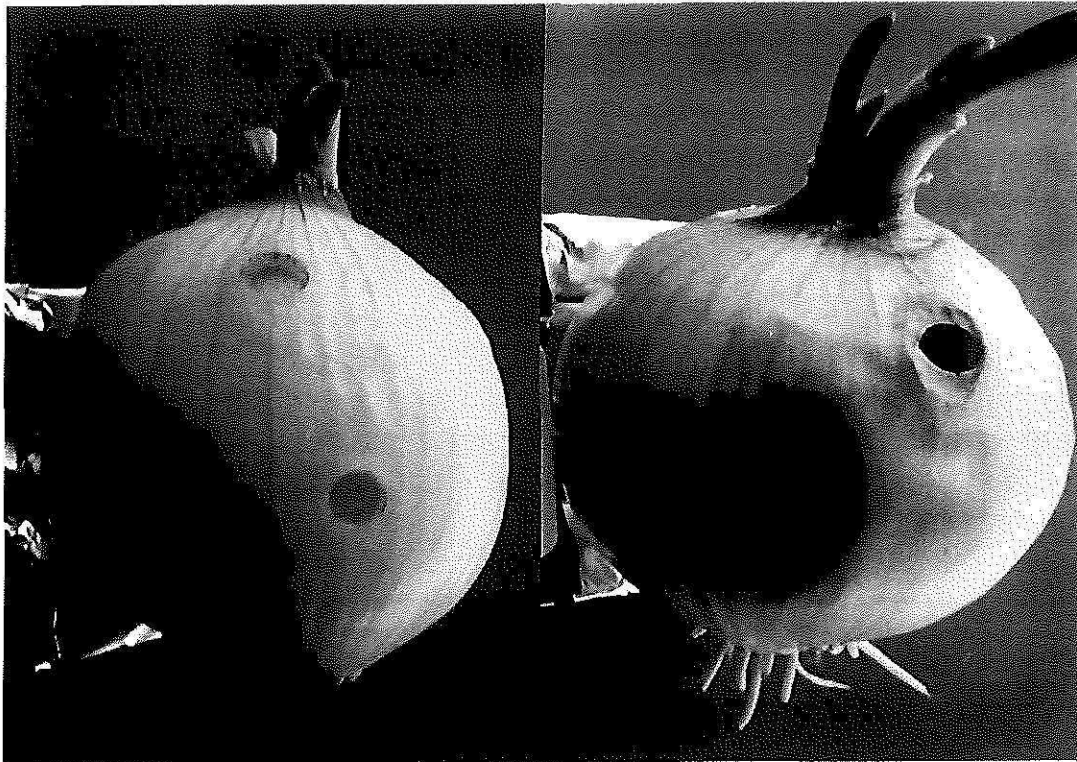


FIGURA 8. Reacción susceptible del genotipo de cebolla amarillo (derecha) a la inoculación del reaislado de *B. cepacia* a los siete días versus el tratamiento control (izquierda).

CUADRO 2.—Severidad de células viables de *B. cepacia* UPR-5C en bulbos de cebolla amarilla.

Tratamiento	Severidad ¹
Logarítmica 6 hrs	3.25a ²
Logarítmica 12 hrs	3.50b
Estacionaria 18 días	4.00b
Estacionaria 44 días	4.00b
Control	1.00c

¹Evaluación con escala de cinco grados en donde 1 = cebolla sana y 5 = cebolla totalmente deteriorada.

²Medias con la misma letra no difieren estadísticamente ($P = 0.05$) con la prueba de contrastes ortogonales.

los estudios de Burkholder (1950). También hubo diferencias significativas en cuanto al número de capas infectadas entre tratamientos con bacterias en la fase logarítmica y estacionaria, siendo más severa en este último caso.

En los bulbos amarillos los primeros síntomas se observaron a las 48 horas después de la inoculación. La bacteria invadió la capa externa donde se inoculó. Luego se desplazó entre la capa inoculada y la capa interna siguiendo hacia la zona radical por donde penetró a las capas internas causando un deterioro total a los 10 días (Figura 7). Los tratamientos constituidos por células viables correspondientes a la fase log de seis horas fueron significativamente menos virulentos que los correspondientes a la fase logarítmica de 12 horas y la estacionaria de 18 y 44 días (Cuadro 2). La respuesta del genotipo amarillo a la inoculación del reaislado mostró síntomas severos (Figura 8).

En la cebolla roja (escaliones) inoculada con células viables y filtrados de *B. cepacia* se desarrolló un halo blanquecino alrededor del área inoculada, pero sin pudrición. En la cebolla blanca inoculada con células viables de la fase logarítmica de 12 hrs y con células viables de la fase estacionaria se observó ocasionalmente una decoloración crema alrededor de una de las laceraciones, pero sin pudrición. El cebollín no mostró reacción a la bacteria.

CONCLUSIONES

El aislamiento de *B. cepacia* UPR-5C es patogénico en bulbos de cebolla amarilla. Los primeros síntomas aparecieron 48 horas después de la inoculación. El deterioro de los bulbos amarillos tratados con células viables procedentes de la fase estacionaria fue significativamente mayor que el de los tratados con células viables de la fase logarítmica de 6

hrs. Los genotipos de bulbo blanco y rojo y el cebollín mostraron resistencia a la bacteria. Los filtrados no causaron síntomas, por lo cual la virulencia del patógeno no está asociada a metabolitos secundarios generados durante el crecimiento de la bacteria. La utilización de células viables de la cepa *B. cepacia* UPR-5C presenta limitaciones de posible uso en Puerto Rico ya que esta cepa resultó patógena en la cebolla de bulbo amarillo por lo cual sería de alto riesgo utilizar células viables en el campo como control biológico. Sin embargo, la determinación de productos secundarios con características fungistáticas podrían ser de utilidad en el control de algunas enfermedades.

LITERATURA CITADA

- Burkholder, W. H., 1950. Sour Skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40:115-117.
- Campo, A. R., 1992. Control Biológico de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol *Phaseolus vulgaris* L. con rizobacterias. Tesis M.Sc. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico. 73 pp.
- Hagedorn, C., W. D. Gould, T. R. Bardinelli and D. R. Gustavson, 1987. A selective medium for enumeration and recovery of *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathology* 78:1697-1700.
- International Journal of Systematic Bacteriology, 1993. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 45:398-399.
- Janisiewicz, W. J. and J. Roitman, 1988. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia* biotypes from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2265-2268.
- Jayaswal, R. K., M.A. Fernández and R. G. Schroder III, 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* strain that restricts growth of various phytopathogenic fungi. *Appl. and Environ. Microbiol.* 56:1053-1058.
- Kawamoto, S. O. and J. W. Lorbeer, 1976. Protection of onion seedlings from *Fusarium oxysporum* F. sp. cepae by seed and soil infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.* 60:189-191.
- Lambert, S., F. Leyns, L. V. Rooyen, F. Gosselé, Y. Papon and J. Swings, 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1866-1871.
- Parke, J. L. 1990. Population dynamics of *Rhizobium cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol. *Phytopathol.* 80:1307-1311.
- Perdomo, F. 1990. Evaluación in vitro de cepas de *Rhizobium* spp. y otros géneros bacterianos para el control biológico de *Macrophomina phaseolina*. Tesis M. Sc. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Sánchez, A., 1991. Biocontrol de hongos patógenos de habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) con *Pseudomonas cepacia*. Tesis M.Sc. Recinto Universitario de Mayagüez. Universidad de Puerto Rico.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa, 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36:1251-1275.