

ARTÍCULO

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO BACTERIANO CAUSAL DE “PICO DE AGUA” DE CEBOLLA Y ESTUDIOS EXPLORATORIOS DE LA EFICACIA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE STOLLER® COBRE

Carla Nahir Basso¹, Julia Ousset², María Cecilia Lutz¹, María Cristina Sosa^{1*}

1- Fitopatología, Instituto de Biotecnología Agropecuaria (IBAC). Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue- CONICET. Río Negro, Argentina.

2- Centro de Toxicología Ambiental y Agrobiotecnología del Comahue (CITAAC). Universidad Nacional del Comahue- CONICET.

*E-mail: mcristinasosa10@gmail.com

RESUMEN

En el Valle Medio de Río Negro, las podredumbres bacterianas afectan la calidad y almacenamiento de bulbos de cebolla. Tradicionalmente, los tratamientos con cobre se utilizan de manera intensiva para su control. Este es el primer estudio de etiología de las bacterias del complejo bacteriano para la región. Las bacterias se caracterizaron por patogenicidad, agresividad y sensibilidad a un formulado de cobre. Se detectaron diferentes géneros y especies que fueron resistentes, planteando la necesidad de estrategias anti-resistencia y de estudios en cultivos con menores pérdidas por podredumbres bacterianas para evaluar la eficacia del cobre.

Palabras clave: bacteriosis, *Allium cepa*, podredumbres, cúpricos

1. INTRODUCCIÓN

Argentina se autoabastece de cebolla y exporta alrededor del 30% de su producción, con el sur de la provincia de Buenos Aires y los valles de Río Negro como las principales regiones productoras (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2023). Según la Corporación de Fomento del Valle Bonaerense del Río Colorado (CORFO), el área cultivada en la provincia de Río Negro fue de 7.300 ha para el ciclo 2021/22, menor a la superficie de la campaña 2020/21 (8.448 ha), aunque se mantiene la tendencia creciente del cultivo asociada a la migración de productores del Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC) hacia los valles irrigados rionegrinos, Valle Inferior (VIRN), Valle Medio - Conesa - (VMRN) y Alto Valle - General Roca - (AVRN) (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2023).

Las podredumbres de origen bacteriano han sido reportadas como un factor adverso de importancia para la producción, conservación y comercialización de cebolla en la región. Los síntomas pueden aparecer en el cultivo a campo o en los bulbos cosechados en almacenamiento. En la planta se observan áreas blanquecinas y cloróticas, generalmente en hojas centrales más

jóvenes, que avanzan hacia el cuello. Al evolucionar la enfermedad, se observa muerte regresiva con amarillamiento, marchitez y podredumbre blanda de hojas, cuello y bulbo. Si la infección progresa hacia la parte inferior, se afectan una o más catáfilas carnosas que pueden cambiar a color castaño y podrirse, sin afectar a las catáfilas contiguas (Kiehr *et al.*, 2015). Con la podredumbre se genera un característico olor fétido, el cuello se ablanda y, si se ejerce presión sobre él, se expulsa un exudado color grisáceo. Finalmente, el bulbo se destruye totalmente durante el almacenamiento (Chorolque *et al.*, 2018).

En el VBRC se han reportado como agentes causales a especies de bacterias pertenecientes principalmente a las Familias: *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* (Kiehr *et al.*, 2015). Entre los géneros y especies identificadas por Khier *et al.* (2015) se encuentran *Pectobacterium carotovorum*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea* sp., *Rahnella aquatilis* y *Serratia marcescens* de la Flia. *Enterobacteriaceae*; *Burkholderia cepacia* de la Flia. *Burkholderiaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* de la Flia. *Pseudomonaceae*. Sin embargo, no existen reportes de las especies involucradas en

el complejo bacteriano que afecta a la cebolla para las áreas productoras de los valles irrigados de Río Negro.

Cuando las bacterias se encuentran en los suelos de los cultivos de cebolla y existen condiciones predisponentes para la infección, particularmente la ocurrencia de lluvias cerca de la cosecha, los productores realizan intervenciones con compuestos cúpricos como estrategia de control y mitigación de pérdidas.

En este estudio se plantearon como Objetivos: (i) la identificación y caracterización de las especies bacterianas involucradas en el complejo “pico de agua” de cebolla en postcosecha en el VMRN y (ii) la evaluación de la sensibilidad de aislados bacterianos patogénicos a la formulación de Stoller® Cobre *in vitro*. La información generada a partir de este trabajo es de suma importancia para el conocimiento regional y, el punto de partida para establecer nuevas recomendaciones de manejo de la enfermedad en el cultivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de aislados de bacterias regionales causales de podredumbre

El muestreo se realizó en octubre de 2023, en un empaque comercial de cebollas ubicado en la localidad de Lamarque (VMRN) con registros de 10% de descarte por podredumbres bacterianas y antecedentes de uso intensivo de cobre a campo. De cajones bins de descarte, se seleccionaron bulbos de la variedad “Grano de oro” que presentaban sintomatología visible externamente. Entre los síntomas se destacaron el ablandamiento, “abollado”, cambios de color en las catáfilas externas y/o producción de exudados (Figura 1).

Los bulbos colectados (n= 300) fueron llevados al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Cs. Agrarias (CITAAC-UNCo) para ser estudiados. Se realizó la evaluación interna de los bulbos enfermos mediante cortes longitudinales, y se categorizó a los mismos en 3 tipos de síntomas diferenciados:

- (1) Podredumbre externa, con inicio desde la parte superior, las catáfilas externas de color café claro (Figura 2 A y B).
- (2) Podredumbre interna, desde las catáfilas internas, alrededor del ápice de crecimiento sin brotar (Figura 2 C).

- (3) Podredumbre mixta, con catáfilas podridas externa e internamente (Figura 2 D).

2.2. Aislamiento de las bacterias

De bulbos seleccionados de cada categoría establecida se realizaron aislamientos en medios de cultivo generales y selectivos. Para ello, se tomaron pequeñas (2 x 2 mm) piezas desde la zona de avance de los síntomas, que fueron maceradas en buffer fosfato de potasio y agitadas para obtener una suspensión que se sembró en medio general agar nutritivo (AN), y en medios diferenciales: agar F (AF, para producción de fluoresceína) para *Pseudomonaceae* fluorescentes, y medio Mc Conkey (Mcc, para crecimiento selectivo de bacterias gram negativas que fermentan lactosa) para *Enterobacteriae* (Klement *et. al.*, 1990). Las placas fueron incubadas 48 h a 22°C.

2.3. Pruebas bioquímicas y Patogenicidad *in vivo*

Las bacterias obtenidas fueron purificadas y se las caracterizó mediante las pruebas bioquímicas descritas por Schaad (1981): tinción de Gram, fluorescencia en medio de cultivo AF, actividad

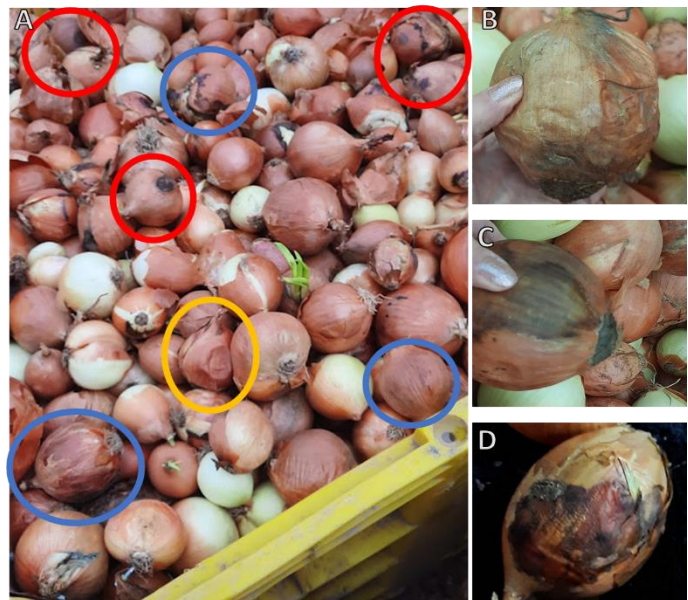


Figura 1. Sintomatología en postcosecha en cebollas.

A. Bulbos con diferente sintomatología. En círculos amarillo “abolladura”, en rojo “manchas necróticas oscuras circulares que aparentemente coalescen” y en azul, “cambios de color de catáfilas externas”. B. Ablandamiento del bulbo. C. Manchas necróticas con oscurecimiento de catáfilas. D. Manchas con aspecto de “chorreado”.



Figura 2. Tipos de síntomas de podredumbre en bulbos de cebolla. A. Externa incipiente. B. Externa avanzada. C. Interna. D. Mixtas (externas e internas).

catalasa y oxidasa. Se utilizó como control positivo a *Pseudomonas viridiflava*, cepa de Colección ATCC 43557, y como control negativo, agua destilada estéril. Se realizaron 3 repeticiones por cepa.

La patogenicidad de los aislados bacterianos se determinó a través de pruebas de actividad pectolítica en papa y por inoculación en cebollas sanas de la misma variedad. Para esta última prueba, se inoculó la suspensión bacteriana de cada aislado en orificios realizados artificialmente en cebollas sanas, sin los brotes centrales. Se consideró como positivo a aquel aislado que generó un cambio de color, manchas acuosas o ablandamiento del tejido asociado al punto de inoculación. Se determinó la severidad del aislado a través de una escala con 4 niveles: 3- Severo, podredumbre con producción de exudados y halo necrótico; 2 - Moderado,

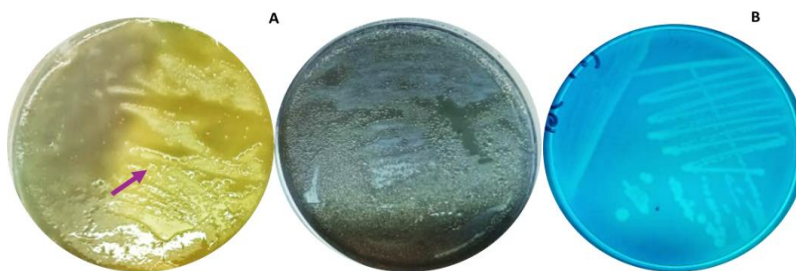


Figura 3. Aislamientos en medio A) McConkey, izquierda Gram negativa enterobacteria (viraje de color amarillo), derecha Gram negativa no enterobacteria; B) Agar F, bacteria fluorescente bajo luz UV.

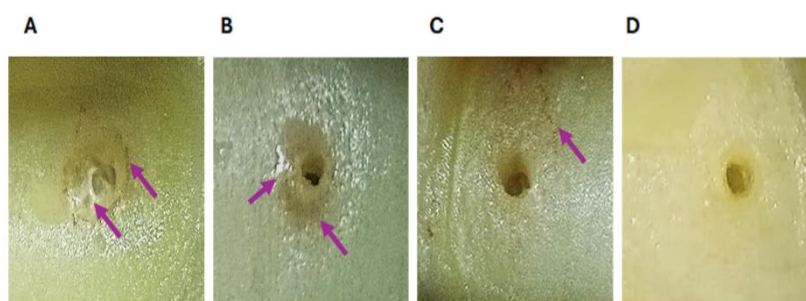


Figura 4. Escala de severidad realizada a partir del ensayo de patogenicidad. A) Severo, podredumbre con producción de exudados y halo necrótico (flechas), B) Moderado, podredumbre y exudados, C) Leve, halo necrótico suave, D) Sin actividad.

podredumbre y exudados; 1 - Leve, halo necrótico suave y 0 - Sin halo (negativo).

2.4. Identificación molecular

A aislados representativos de cada uno de los grupos bacterianos determinados por las características en medios de cultivo diferenciales y las pruebas de patogenicidad, se los identificó molecularmente. A partir de cultivos puros crecidos 48 h en AN se realizó la extracción de ADN, y posterior amplificación por PCR de la región del gen 16S del ARN utilizando cebadores universales 1492 R (5'-TACCTTGTTACGACTT) y 27 F (5TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3) (Miller *et al.* 2013). Los productos de PCR se purificaron, se enviaron a secuenciar a MacroGen (Corea) y las secuencias se analizaron mediante BLASTn. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de secuencias publicadas en GenBank.

2.5. Sensibilidad de cepas bacterianas al formulado Stoller Cobre® in vitro

Para evaluar la sensibilidad de los aislados bacterianos al cobre, se utilizó la metodología de Alippi *et al.* (2003) en placas con medio de cultivo AN enmendado con el formulado cúprico a concentraciones crecientes. Se evaluó la sensibilidad de 12 aislados, identificados molecularmente, a las concentraciones de 0, 125, 250, 375, 500, 750 y 1000 ppm de cobre, considerando el principio activo del formulado y la concentración de uso recomendada de 200 mL/hL.

En placas de Petri se colocaron equidistantes gotas de 15 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC/mL, proveniente de un cultivo con 48 h de crecimiento. Una vez absorbidas las suspensiones bacterianas, se incubaron las placas invertidas a 22°C.

Se realizaron 5 repeticiones por aislado. Después de 48 h de incubación, el experimento se evaluó de forma cualitativa por presencia/ausencia de crecimiento en el medio suplementado con cada concentración de cobre. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada una de las bacterias evaluadas, como aquella concentración mínima donde no se observó crecimiento. El efecto bactericida se

verificó repicando desde la gota sembrada a un medio AN sin cobre. Para la clasificación del grado de sensibilidad/resistencia se adaptó el criterio de Alippi *et al.* (2003): CMI para bacterias sensibles hasta 125 ppm, bacterias con resistencia baja con CIM de 125 a 250 ppm, y resistencia alta desde 375 ppm en adelante.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamientos y caracterización bacteriana

A partir de las cebollas afectadas con los diferentes tipos de síntomas se obtuvieron 19 aislados bacterianos. Los resultados de la caracterización de los aislados -características de crecimiento en los medios de cultivo diferenciales (Figura 3), pruebas de pectólisis y patogenicidad (Figura 4)- se observan en la Tabla 1.

En lo que respecta a las pruebas de patogenicidad in vivo, los resultados muestran que los aislados de los tres tipos de sintomatología presentan variabilidad en su comportamiento (Figura 5). En el grupo de aislados provenientes de cebollas con síntomas externos, se encontraron los aislados con mayor escala de severidad, y un importante número de aislados sin actividad. En los aislados provenientes de síntomas internos y mixtos, no se encontraron aislados en la categoría severo.

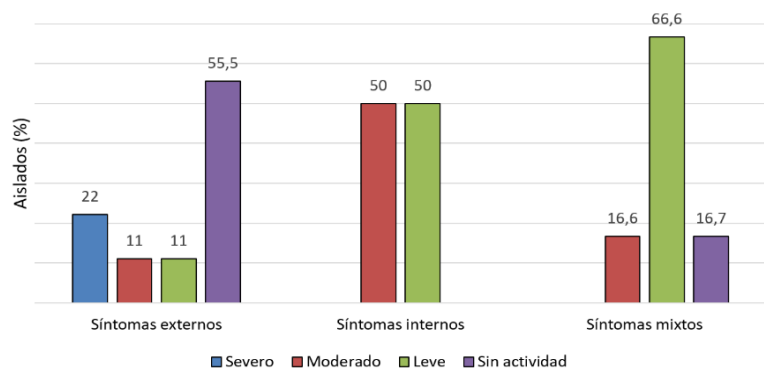


Figura 5. Frecuencia de aislados (%) de acuerdo con la severidad evaluada en cebollas a 22°C por 5 días.

3.2. Identificación molecular

Doce (12) aislados representativos (denominados como C1-C7 y C11-C17) se identificaron molecularmente a nivel de género y especie. Las secuencias obtenidas al ser comparadas con secuencias publicadas en GenBank presentaron 99% o más de homología con cepas de referencia. Los géneros y especies identificados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1. Caracterización fenotípica (fluorescencia, fermentación láctica, tinción gram, actividad catalasa y oxidasa, y pectólisis) y patogenicidad de 19 aislados bacterianos según sintomatología de origen en cebolla.

Aislado	Sintomatología	Fluorescencia (<i>Pseudomonaceae</i>)	Fermenta Lac (<i>Enterobacteriae</i>)	Tinción gram	Catalasa	Oxidasa	Pectólisis en papa	Patogenicidad en cebollas
1 #	Externa incipiente	-	+	-	+ ^d + ^d + ^d	-	+ - -	+-
2 #	Externa incipiente	+	+	-	+++	+	+ - -	+-
3 #	Externo incipiente	+	-	-	+++	-	+ + +	+++
4 #	Externo incipiente	-	-	-	+++	+	+ + -	---
5	Externa incipiente	-	-	-	*	*	+ - -	---
6 #	Externa	-	+	+	+ ^d + ^d + ^d	-	+ + +	---
7 #	Externa	+	+	-	+++	-	+ + +	+++
8	Externa	-	+	-	*	*	+ - -	---
9	Externa	+	-	-	*	*	- - -	---
10	Interna	+	-	-	*	*	+ ^d - -	+-
11 #	Interna	+	-	-	- - -	-	- - -	+-
12 #	Interna	-	+/-	-	+++	-	- - -	+-
13 #	Interna	-	+/-	-	+ ^d + ^d + ^d	-	+ ^d - -	+-
14 #	Mixta	-	-	-	+++	-	+ + -	+-
15	Mixta	-	-	-	*	*	+ ^d - -	+-
16	Mixta	-	-	-	*	*	+ + -	+-
17 #	Mixta	-	-	-	+++	-	+ - -	+-
18	Mixta	-	+	-	*	*	- - -	+-
19	Mixta	+	-	-	*	*	- - -	---

Referencias: + = reacción positiva, - = reacción negativa, +/- = reacción positiva y negativa. En las pruebas de detección de actividad catalasa, pectolítica y de patogenicidad, cada signo corresponde a una repetición. +^d = reacción débil, no inmediata. * = sin datos. # = Aislados identificados molecularmente.

Es importante mencionar que para complementar la identificación a nivel de especie sería necesario adicionar la secuenciación de más fragmentos del genoma, como el *rpoD* y *gyrB* (Tayeb *et. al.*, 2008; Mulet *et. al.*, 2010). La secuenciación de estas regiones, con mayor variabilidad, permitirían la mejor discriminación entre especies.

3.3. Sensibilidad de aislados bacterianos al formulado cúprico *in vitro*

Las bacterias evaluadas mostraron diferentes grados de inhibición al formulado cúprico (Figura 6). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las concentraciones evaluadas y el

nivel de resistencia para cada aislado bacteriano se presenta en la Tabla 2.

4. CONCLUSIONES

En la postcosecha de cebollas (2023) del VMRN, se realizó el estudio de identificación y caracterización de las especies bacterianas involucradas en el complejo bacteriano de “pico de agua” y se exploró la sensibilidad *in vitro* de los aislados al formulado Stoller® cobre. Desde bulbos con síntomas de podredumbre blanda bacteriana, categorizadas por su aspecto (sintomatología externa, como interna y mixta), se aislaron diferentes géneros de bacterias, que estarían actuando en una sucesión como parte del

Tabla 2. Identificación molecular de aislados bacterianos de podredumbres en cebolla y sensibilidad al cobre del Cobre® Stoller para los aislados bacterianos.

Aislado	Sintoma de origen	Identificación molecular (>99% homología)	CMI (ppm)*	Sensibilidad al Cu**
C1	Externo	<i>Klebsiella</i> sp.	250	RB
C2	Externo	<i>Enterobacter cloacae</i>	375	RA
C3	Externo	<i>Enterobacter cloacae</i>	250	RB
C4	Externo	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	250	RB
C6	Externo	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	250	RB
C7	Externo	<i>Rahnella aquatilis</i>	250	RB
C11	Interno	<i>Pseudomonas</i> sp.	375	RA
C12	Interno	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	375	RA
C13	Interno	<i>Klebsiella</i> sp.	375	RA
C14	Mixta	<i>Serratia</i> sp.	250	RB
C16	Mixta	<i>Serratia</i> sp.	250	RB
C17	Mixta	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	375	RA

* Concentraciones mínimas inhibitorias; **S, sensible; RB, resistencia baja; RA, resistencia alta.

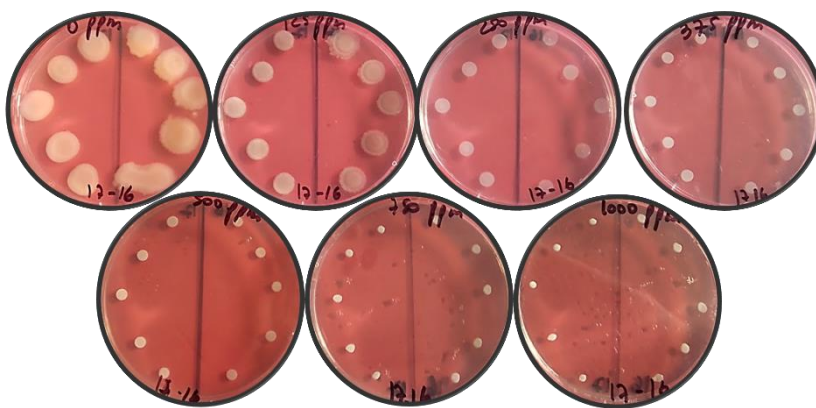


Figura 6. Placas correspondientes a los aislados C6 y C17, a modo de ejemplo, evaluadas a concentraciones crecientes de cobre.

complejo bacteriano. La mayoría de los aislados caracterizados (n= 19) mostró actividad patogénica con diferente agresividad. Aislados con mayor agresividad y representativos de cada tipo sintomático (n=12) se identificaron molecularmente como *Stenotrophomonas* sp. (33,34%), *Enterobacter cloacae* (sin. *E. cowanii*) (16,66%), *Klebsiella* sp. (16,66%), *Serratia* sp. (16,66%), *Pseudomonas* sp. (8,34%) y *Rahnella aquatilis* (8,34%). Los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Rahnella*, ya han sido reportados como causales de

podredumbres en cebolla (Delhey *et. al.*, 2019). Si bien no fue posible relacionar un tipo de sintomatología con un género bacteriano en particular, se observó que aislados de *Stenotrophomonas* se obtuvieron en cebollas con las 3 tipologías (tejidos externos y/o internos). *Klebsiella* sp. fue identificada desde tejidos con síntomas internos o externos, pero no en ambos; mientras *Pseudomonas* sp. sólo de tejido interno. Asimismo, la presencia de *Enterobacter cloacae* estuvo asociada a síntomas externos, mientras *Serratia* sp. a síntomas mixtos.

El género *Stenotrophomonas* resulta interesante ya que, aunque se encuentra filogenéticamente relacionado a los géneros fitopatógenos *Xanthomonas* y *Xylella*, no se conocen especies que ataquen las plantas (Ryan *et. al.*, 2009). En este estudio, los aislados obtenidos mostraron actividad pectolítica y/o patogenicidad en cebolla, por lo que podría tratarse de una nueva cepa patógena.

En cuanto a la sensibilidad al formulado de cobre, hubo variabilidad a su respuesta entre las cepas y especies. Ninguna de las cepas fue sensible (CMI <125 ppm). Cepas de *Klebsiella*, *E. cloacae*, *Stenotrophomonas*, *Rahnella aquatilis* y *Serratia* mostraron baja resistencia,

mientras que cepas de *E. cloacae*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, y *Klebsiella* alta resistencia. Debido al uso intensivo del cobre en el cultivo de cebolla de estudio, es posible el desarrollo de resistencia en las bacterias al principio activo. Esto ha sido reportado para diferentes especies bacterianas en otros cultivos (Lamichhane *et. al.*, 2018) y particularmente en cebolla (Tho *et. al.*, 2019). La falta de eficacia de los tratamientos cúpricos a campo podría explicarse, ya que un porcentaje alto de la población patógena es

resistente al cobre, como en este estudio se demuestra.

En cultivos de cebolla con presencia esporádica o incipiente de la enfermedad bacteriana y con baja intensidad en el uso del cobre, es posible que la población bacteriana patogénica se comporte como sensible al cobre y que el formulado Stoller® cobre tenga efecto bactericida. En este sentido, en cultivos con alta intensidad en el uso de cobre es necesario implementar estrategias de manejo anti-resistencia alternando al cobre con otras sustancias.

Agradecimiento: Stoller Argentina S.A. Ing. Agr. Ana Scarso, Ing. Agr. Gustavo Spicchiali

5. REFERENCIAS

- Alippi, A. M., Dal Bo, E., Ronco, L. B., López, M. V., López, A. C., & Aguilar, O. M. 2003. *Pseudomonas* populations causing pith necrosis of tomato and pepper in Argentina are highly diverse. *Plant Pathology*, 52(3), 287-302.
- Chorolque, A., Pozzo Ardizzi, C., Pellejero, G., Aschkar, G., García Navarro, F.J., & Jiménez Ballesta, R. 2018. Incidence of bacterial diseases associated with irrigation methods on onions (*Allium cepa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(14), 5534-5540.
- Delhey, R., Kiehr, M., García Lorenzana, U., Bellacomo, M.C., Caracotche, M.V., Frayssinet, S. & Kroneberger, E. 2019. Podredumbres bacterianas de cebolla en Argentina. Situación actual y perspectivas a mediano plazo. Asociación Argentina de Fitopatólogos.
- Kiehr M., Frayssinet S., Azpilicueta A., Kees M., Detzel M., Zappacosta D., & Delhey R. 2015. *Klebsiella oxytoca*, *Rahnella aquatilis* y *Pantoea* sp.: nuevas bacterias que causan podredumbre blanda en cebolla, en el Valle Bonaerense del Río Colorado. 38 Congreso Argentino de Horticultura, Bahía Blanca. Resúmenes 96.
- Klement, Z., Rudolph, K., & Sands, D.C. (Eds.). 1990. *Methods in Phytobacteriology* (pp. 568-pp).
- Lamichhane, J. R., Osdaghi, E., Behlau, F., Köhl, J., Jones, J. B., & Aubertot, J. N. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for sustainable development*, 38(3), 28.
- Miller CS, Handley KM, Wrighton KC, Frischkorn KR, Thomas BC, Banfield JF. Short-read assembly of full-length 16S amplicons reveals bacterial diversity in subsurface sediments. *PloS one*. 2013;8(2):e56018. doi: 10.1371/journal.pone.0056018
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B. & Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature reviews microbiology*, 7(7), 514-525.
- Schaad, N.W. (Ed. 3th). 1981. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (pp. 72-pp).
- Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca. Informe Producción de Cebolla en Argentina Evolución del cultivo hasta la temporada 2021/22. Enero de 2023. Ministerio de Economía de Argentina. Consultado el 22 de febrero desde: <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sagyp-informe-produccion-cebolla-enero-2023-2.pdf>
- Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., & Grimont, P. A. 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159(3), 169-177.
- Tho, K. E., Brisco-McCann, E., Wiriyajitsomboon, P., Sundin, G. W., & Hausbeck, M. K. 2019. Bacteria associated with onion foliage in Michigan and their copper sensitivity. *Plant health progress*, 20(3), 170-177.