

Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops

Caracterización polifásica de *Burkholderia gladioli* aislada de cebolla y evaluación de su patogenicidad potencial para otros cultivos

María Serret-López, ¹Programa de Edafología, ²Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; ³Sergio Aranda-Ocampo, ¹David Espinosa-Victoria^{†*}, ²Luis Enrique Ortiz-Martínez, ²Karina Ramírez-Razo.
*Autor para correspondencia: despinos@colpos.mx

Recibido: 15 de Julio, 2020.

Aceptado: 10 de Septiembre, 2020.

Serret-López M, Aranda-Ocampo S, Espinosa-Victoria D[†], Ortiz-Martínez LE and Ramírez-Razo K. 2021. Polyphasic characterization of *Burkholderia gladioli* isolated from onion and evaluation of its potential pathogenicity for other crops. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 21-40.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2007-2>

Primera publicación en línea: 08 de Octubre, 2020.

First publication on line: October 08, 2020.

Resumen. Los individuos del género *Burkholderia*, *sensu lato*, se caracterizan por colonizar diversos nichos ecológicos. Esta investigación tuvo como objetivos caracterizar morfológica, fisiológica, bioquímica y molecularmente a *Burkholderia gladioli*, aislada de bulbos podridos de cebolla blanca (*Allium cepa*), y determinar su potencial como patógeno de otras especies vegetales. *Burkholderia*

Abstract. Individuals of the genus *Burkholderia*, *sensu lato*, are characterized by colonizing various, ecological, niches. The purpose of this research was to characterize *Burkholderia gladioli* morphologically, physiologically, biochemically, and molecularly, isolated from rotten onion bulbs, and to determine its potential as a pathogen of other plant species. *B. gladioli* also promoted soft rot in purple onion bulbs (*Allium cepa*), leek stalks (*A. ampeloprasum*), inflorescences of broccoli (*Brassica oleracea*), cladodes of cactus (*Opuntia indica*), carrot roots (*Daucus carota*), ginger rhizomes (*Zingiber officinale*) and mushroom sporocarps (*Agaricus bisporus*). *B. gladioli* colonized bean plants (*Phaseolus vulgaris*) in a greenhouse, and showed natural resistance *in vitro* to copper: agricultural cuprimycin, cuprimycin 500, phyton, copper oxychloride; antibiotics: bactrol, agricultural bactriomicin, kasumin, final bacter, quartz and biological: serenade powder, fungifree

gladioli promovió, igualmente, la pudrición blanda en bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea*), cladodios de nopal (*Opuntia indica*), raíces de zanahoria (*Daucus carota*) y esporocarpos de champiñón (*Agaricus bisporus*). *Burkholderia gladioli* colonizó plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en invernadero y mostró resistencia natural *in vitro* a productos a base de cobre: cuprimicin agrícola, cuprimicin 500, phyton, oxiclورو de cobre; antibióticos: bactrol, bactriomicin agrícola, kasumin, final bacter, quartz y biológicos: serenade polvo, fungifree y bacterbest. Este estudio reporta por primera vez la caracterización polifásica de *B. gladioli* en México. Este aislado bacteriano creció a pH 4.0 y 42 °C, lo que podría conferirle habilidad competitiva en suelos ácidos y condiciones semiáridas. Se demostró que tiene un amplio rango de hospederos en condiciones postcosecha, además de ser resistente a diferentes productos usados en campo para el control de fitopatógenos.

Palabras clave: Postulados de Koch, pudrición del bulbo, rango de hospederos.

Burkholderia, sensu lato, comprende, bacterias Gram negativas, incluidas en la subdivisión β proteobacteria (Sousa *et al.*, 2011). Originalmente, se encontraba agrupada dentro del género *Pseudomonas*, pero con base en el análisis de secuencia 16S rARN, homología ADN-ADN, composición de ácidos grasos y características fenotípicas se reagrupó como género *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Burkholderia es un género bifuncional debido a que algunas de sus especies establecen relaciones simbiótico-mutualistas con las plantas, mientras que otras establecen asociaciones simbiótico-pato-

and bacterbest. This study reports for the first time the polyphasic characterization of *B. gladioli* in Mexico. This bacterial species grew at pH 4.0 and 42 °C, which could give it competitive ability in acid soils and semi-arid conditions. It is shown that it had a wide range of hosts in postharvest conditions, in addition to being resistant to different products used in the field for phytopathogens control.

Key words: Koch postulates, bulb rot, host range.

Burkholderia, sensu lato, comprises Gram negative, bacteria included in the β proteobacteria subdivision (Sousa *et al.*, 2011). It was originally grouped in the *Pseudomonas* genus, yet based on the analysis of the sequence 16S rARN, DNA-DNA homology, composition of fatty acids and phenotypical characteristics, it was regrouped as the *Burkholderia* genus (Yabuuchi *et al.*, 1992).

Burkholderia is a bifunctional genus, because some species establish symbiotic-mutualist associations with plants, whereas others establish symbiotic-pathogenic associations with plants, animals and humans (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). *Burkholderia gladioli* was first isolated from gladiolus bulbs (*Gladiolus* sp.), and later from iris (*Iris* sp.), summer snowflake (*Leucojum aestivum*), saffron (*Crocus sativus*), maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*) (Mirghasempour *et al.*, 2018). It was recently isolated from orchid species of the genera *Dendrobium*, *Oncidium* and *Miltonia* (Keith and Thammakijjawat, 2019), and it can therefore be considered a reemerging pathogen.

B. gladioli is subdivided into four pathovers: *B. gladioli* pv. *agaricicola*, causal agent of rotting in mushroom; *B. gladioli* pv. *alliicola*, which causes rotting of the bulb in onion; *B. gladioli* pv. *gladioli*, causal agent of rotting in the gladiolus bulb; and *B. gladioli* pv. *cocovenenans*, which generates severe

génicas con plantas, animales y humanos (Espinosa-Victoria *et al.*, 2020). *Burkholderia gladioli* se aisló por primera vez de bulbos de gladiolo (*Gladiolus* sp.), y posteriormente de iris (*Iris* sp.), copo de nieve (*Leucojum aestivum*), azafrán (*Crocus sativus*), maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) (Mirghasempour *et al.*, 2018). Recientemente, fue aislada de especies de orquídeas de los géneros *Dendrobium*, *Oncidium* y *Miltonia* (Keith y Thammakijawat, 2019), por lo que puede considerarse como un patógeno reemergente.

B. gladioli se encuentra subdividida en cuatro patovares: *B. gladioli* pv. *agaricola*, agente causal de la pudrición del champiñón; *B. gladioli* pv. *alliicola*, que ocasiona la pudrición del bulbo de cebolla; *B. gladioli* pv. *gladioli*, agente causal de la pudrición del gladiolo; y *B. gladioli* pv. *cocovenans*, que genera intoxicación alimentaria severa como resultado de la ingestión de productos de soya y coco infectados con esta bacteria (Lee *et al.*, 2016).

Actualmente, se conoce muy poco de la ocurrencia de *B. gladioli* en México, y de las características fisiológicas y bioquímicas de este fitopatógeno. Solo existe una nota científica (Félix-Gastélum *et al.*, 2017) en la que se reporta a *B. gladioli* como agente causal de pudrición en cebolla en Sinaloa, México.

Por otra parte, México se encuentra dentro de los principales productores de cebolla (*Allium cepa*). A nivel mundial, ocupa el treceavo lugar con 1,620,318 t (FAOSTAT, 2017). A nivel nacional, Chihuahua (334,309.89 t), Zacatecas (18,758.38 t) y Guanajuato (176,700.99 t), son los estados con mayor producción de cebolla (SIAP, 2018). Sin embargo, este cultivo presenta diversos problemas fitosanitarios postcosecha, destacando la pudrición del bulbo, asociada generalmente a *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. ambifaria*, *B. pirrocynia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Serratia plymuthica*, *Pseu-*

food intoxication due to the ingestion of soybean and coconut products infected with this bacterium (Lee *et al.*, 2016).

Little is currently known on the occurrence of *B. gladioli* in Mexico or on the physiological and biochemical characteristics of this phytopathogen. There is only one scientific note (Félix-Gastélum *et al.*, 2017) in which *B. gladioli* is reported as a causal agent of onion rotting in Sinaloa, Mexico.

On the other hand, Mexico is one of the leading producers of onion (*Allium cepa*). Worldwide, it is number thirteen, with 1, 620, 318 t (FAOSTAT, 2017). Nationwide, Chihuahua (334, 309.89 t), Zacatecas (183, 758.38 t) and Guanajuato (176, 700.99 t) are the states with the highest onion production (SIAP, 2018). However, this crop presents several postharvest phytosanitary problems, particularly the rotting of the bulb, generally related to *B. cepacia*, *B. gladioli*, *B. ambifaria*, *B. pirrocynia*, *Pectobacterium carotovorum*, *Serratia plymuthica*, *Pseudomonas marginalis*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *Pantoea ananatis* and *Enterobacter cloacae* (Kowalska *et al.*, 2015).

The aim of the present study was to characterize, using a polyphasic approach, *B. gladioli*, the causal agent of soft rotting of the white onion bulb, as well as to determine its potential as a pathogenic agent of other plant species. Given that *B. gladioli* is able to colonize different ecological niches and to present several virulence factors, we hypothesized that this bacterium is not only the causal agent of white rotting in the bulb of white onion, but also a potential pathogen of different plant species.

MATERIALS AND METHODS

The investigation was carried out in three phases. The first consisted in the isolation, morphological

domonas marginalis, *P. syringae*, *P. viridiflava*, *Pantoea ananatis* y *Enterobacter cloacae* (Kowalska *et al.*, 2015).

El objetivo del presente estudio fue caracterizar con un enfoque polifásico a *B. gladioli*, el agente causal de la pudrición blanda del bulbo de la cebolla blanca, así como determinar su potencial como agente patogénico de otras especies vegetales. Dado que *B. gladioli* es capaz de colonizar diferentes nichos ecológicos y presentar múltiples factores de virulencia, se hipotetizó que esta bacteria, además de ser el agente causal de la pudrición blanda en bulbo de la cebolla blanca, es también un patógeno potencial de diferentes especies vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en tres fases: La primera consistió en el aislamiento, caracterización morfológica, pruebas fisiológicas, bioquímicas y moleculares para la identificación del aislamiento bacteriano; la segunda y la tercera consistieron en la inoculación de diferentes estructuras vegetales y plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones controladas, para determinar su potencial infectivo.

Material biológico. Se analizaron bulbos de cebolla blanca (*Allium cepa*) variedad Carta blanca, con síntomas de pudrición blanda, procedentes de la comunidad de San Vicente Chicoloapan, Estado de México, localizada en las coordenadas Latitud N 19° 24' 49" y longitud W 98° 53' 8.29".

Se utilizaron también bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), cladodios de nopal (*Opuntia indica*), raíces de zanahoria (*Daucus carota*), rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*), inflorescencias de brócoli (*Brassica oleracea*), esporocarpos de champiñón (*Agaricus*

characterization, physiological and molecular tests to identify the bacterial isolation. The second and third consisted in the inoculation of different plant structures and bean plants (*Phaseolus vulgaris*) under controlled conditions to determine its infective potential.

Biological material. We analyzed bulbs from white onions (*Allium cepa*) of the Carta blanca variety with soft rot symptoms from the town of San Vicente Chicoloapan, State of Mexico, located on latitude N 19° 24' 49" and longitude W 98° 53' 8.29".

Bulbs from red onion (*A. cepa*), leek (*A. ampeloprasum*) stalks, cactus (*Opuntia indica*) cladodes, carrot (*Daucus carota*) roots, ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes, broccoli (*Brassica oleracea*) inflorescences, mushroom (*Agaricus bisporus*) sporocarps and bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds were also used to evaluate the ability of colonization and the pathogenicity of the bacterial isolation.

Isolation and morphological characterization of the phytopathogen. The external cataphylls of onion bulbs with signs of soft rotting were cut longitudinally. The bacterial flow was observed using distilled water under a light microscope at 10X. A bacterial sample was taken, then planted in King's B medium and incubated at 28 °C for 48 h. The bacterial culture was morphologically characterized under the stereoscopic microscope. Afterwards, hypersensitivity tests were performed on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* "xanthi") aged four months, as well as on the rotting of potato tubers (*Solanum tuberosum*) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Koch Postulates. The isolated strain was inoculated on healthy tissue from white onion,

bisporus) y semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) para evaluar la capacidad de colonización y patogenicidad del aislamiento bacteriano.

Aislamiento y caracterización morfológica del fitopatógeno. Las catáfilas externas de bulbos de cebolla con síntomas de pudrición blanda, se cortaron longitudinalmente. Posteriormente, se observó el flujo bacteriano del tejido con agua destilada estéril en microscopio óptico a 10X. Se tomó una asada, se sembró en medio B de King y se incubó a 28 °C por 48 h. La colonia bacteriana se caracterizó morfológicamente al microscopio estereoscópico. Posteriormente, se realizaron las pruebas de reacción de hipersensibilidad en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* “xanthi”) de cuatro meses de edad y pudrición en tubérculos de papa (*Solanum tuberosum*) (Goszczyńska *et al.*, 2000).

Postulados de Koch. La cepa aislada, se inoculó en tejido sano de cebolla blanca variedad Carta blanca, mediante la aplicación de 0.5 mL de una suspensión acuosa con 3×10^8 UFC mL⁻¹, ajustándola mediante la escala de McFarland (McFarland, 1907). Como testigos, se inocularon cuatro rodajas de cebolla blanca sana con 0.5 mL de agua destilada estéril, y se colocaron en cámara húmeda a 28 °C. La pudrición de las catáfilas se evaluó 48 h después de la inoculación. Una muestra del exudado del tejido con pudrición se sembró en medio B de King por 48 h. Posteriormente, se observó el crecimiento bacteriano en el microscopio estereoscópico, se seleccionó una colonia desarrollada aisladamente, la cual se transfirió en los medios de cultivo de B de King, MacConkey y Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

Caracterización fisiológica y bioquímica. Se realizaron las siguientes pruebas fisiológicas y bioquímicas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, reacción

variety Carta blanca, with the application of 0.5 mL of an aqueous suspension with 3×10^8 UFC mL⁻¹, adjusting it using McFarland’s scale (McFarland, 1907). As controls, four slices of healthy white onion were inoculated with 0.5 mL of sterilized distilled water and placed in a wet chamber at 28 °C. The rotting of the cataphylls was evaluated 48 h after inoculation. A sample of the exudate of the tissue with rotting was planted in King’s B medium for 48 h. Later, the bacterial growth was observed under the stereoscopic microscope, and a bacterial colony grown in isolation was selected and transferred to culture media King’s B, MacConkey, and Congo Red (Rodríguez, 1982).

Physiological and biochemical characterization. The following physiological and biochemical tests were carried out: Gram stain, oxidase, catalase, KOH reaction, nitrate reduction, oxidative-fermentative metabolism, gel liquefaction, arginine hydrolysis, levana production, starch hydrolysis and use of carbon sources following the methodology described by Shaad (2001). The bacterial growth was registered in a pH of 4 to 10 (Estrada de los Santos *et al.*, 2013) and temperatures of 30 to 43 °C (Kowalska *et al.*, 2015).

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR). Bacterial DNA extraction was carried out using the CTAB method quoted by Doyle and Doyle (1990), modified by washing with sodium acetate 3 M. The quantity and quality of the DNA was evaluated by spectrophotometry in Nanodrop 126 (ND-1000, Nanodrop Technologies).

For the amplification of the gene 16S rRNA, the universal primers 8 F (5’AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) and 1492 R (5’GGTACCTTGTTACGACTT-3’) (Galkiewicz and Kellogg, 2008) were used. The amplification of gene 16S rRNA was carried out

KOH, reducción de nitratos, metabolismo oxidativo-fermentativo, licuefacción de gelatina, hidrólisis de arginina, producción de levana, hidrólisis del almidón y utilización de fuentes de carbono siguiendo la metodología descrita por Shaad (2001). Se registró el crecimiento de la bacteria a pH de 4 a 10 (Estrada de los Santos *et al.*, 2013) y a temperaturas de 30 a 43 °C (Kowalska *et al.*, 2015).

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó la extracción de ADN bacteriano utilizando el método de CTAB citado por Doyle y Doyle (1990), con la modificación de lavado con acetato sodio 3 M. La calidad y cantidad del ADN se evaluó por espectrofotometría en Nanodrop 126 (ND-1000, Nanodrop Technologies).

Para la amplificación del gen 16S rARN se utilizaron los iniciadores universales 8 F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Galkiewicz y Kellogg, 2008). La amplificación del fragmento del gen 16S rRNA se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones, en un volumen final de reacción de 25 µL: se realizó una desnaturalización inicial del ADN a 95 °C por 5 min, en seguida 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 54 °C por 45 s, 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 8 min. El fragmento amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio, a 85 volts durante 60 min. El fragmento resultante se observó con luz ultravioleta en un fotodocumentador Biologing Systems modelo Epi Chemi II Darkroom. Posteriormente, el producto fue secuenciado por la empresa MacroGen en Korea.

Árbol filogenético. Para confirmar la identidad de la bacteria se realizó el ensamble de las secuencias forward y reverse mediante el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). La secuencia con-

under the following conditions, in a final reaction volume of 25 µL: an initial DNA denaturalization was carried out at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 1 min, 54 °C for 45 s, 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 8 min. The amplified fragment was separated by electrophoresis in 2% agarose gel, with ethidium bromide at 85 volts for 60 min. The resulting fragment was observed under ultraviolet light in a Biologing Systems photodocumenter, model Epi Chemi II Darkroom. Later, the product was sequenced by the MacroGen company in Korea.

Phylogenetic tree. To confirm the identity of the bacteria, the assembly of the forward and reverse sequences were assembled using the software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). The consensus sequence was compared with the sequences registered in the Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). To create the phylogenetic tree, the partial sequences of gene 16S rARN were discharged from the GenBank from *B. gladioli* (MN559413), *B. cepacia* (AF097530), *B. ambifaria* (AF043302), *B. plantarii* (AB183679) and *B. glumae* (NR_029211), *Paraburkholderia graminis* (NR_029213), *Pseudomonas viridiflava* (NR_117825), *P. fluorescens* (NR_113647) and *P. aeruginosa* (NR_113599), using *Agrobacterium tumefaciens* (NR_115516) as an out-of-group species. The multiple alignment of sequences was carried out with the MUSCLE option. The phylogenetic tree was obtained using the method of *Maximum Likelihood* (ML) with 500 bootstrap repetitions, based on the Tamura-Nei model (TN93+G). The model used was obtained using a model test, and according to the Bayesian Information Criterion (BIC), the one that best describes the base substitution pattern was chosen.

senso se comparó con las secuencias registradas en el Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para realizar el árbol filogenético se descargaron del GenBank las secuencias parciales del gen 16S rARN de *B. gladioli* (MN559413), *B. cepacia* (AF097530), *B. ambifaria* (AF043302), *B. plantarii* (AB183679) y *B. glumae* (NR_029211), *Paraburkholderia graminis* (NR_029213), *Pseudomonas viridiflava* (NR_117825), *P. fluorescens* (NR_113647) y *P. aeruginosa* (NR_113599), utilizando como especie fuera de grupo a *Agrobacterium tumefaciens* (NR_115516). El alineamiento múltiple de secuencias se efectuó con la opción MUSCLE. El árbol filogenético se obtuvo mediante el método de *Maximum Likelihood* (ML) con 500 repeticiones de bootstrap, basado en el modelo de Tamura-Nei (TN93+G). El modelo utilizado se obtuvo mediante una prueba de modelos y de acuerdo con el criterio de información bayesiana (BIC), se eligió el que mejor describió el patrón de sustitución de bases.

Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó una colonia del aislamiento bacteriano, con 72 h de crecimiento en medio B de King a 28 °C, para la observación de la morfología colonial en microscopía electrónica de barrido. Se tomó una pequeña muestra bacteriana y se fijó en glutaraldehído al 3%. Posteriormente, se enjuagó con el amortiguador de fosfato sorense (0.1 M), a pH de 7.2 durante 10 min. Transcurridas 24 h, se repitió este procedimiento dos veces más. A continuación, se deshidrató con alcohol a las siguientes concentraciones: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. Se dejó reposar en cada concentración durante 30 min. El proceso se repitió únicamente con la concentración al 100%. Posteriormente, se realizó el secado de la muestra hasta alcanzar el punto crítico, utilizando el desecador Samdri-780A® (USA, 2007). En seguida, el

Scanning electron microscopy. A colony from the bacterial isolation was used, with 72 h growth in King's B medium at 28 °C for the observation of the culture's morphology under a scanning electron microscope. A small bacterial sample was taken and fixed in 3% glutaraldehyde. It was then rinsed with Sorensen's phosphate buffer (0.1 M), at a pH of 7.2 for 10 min. After 24 h, this procedure was carried out twice. It was then dehydrated with alcohol at concentrations of 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100%. It was left to rest in each concentration for 30 min. The process was only repeated with a concentration of 100%. Later, the sample was dried until it reached the critical point using the Samdri-780A® drier (U.S.A., 2007). Next, the specimen was placed on a slide using a brush under a stereoscopic microscope. The sample was then covered in gold using the FINE COAT (Ion sputter JFC-1100) equipment. Finally, the bacterial morphology was observed with the AXS Microanalysis software for the scanning electron microscope (Oxford instruments INCA x-act 2009).

Inoculation of the bacterial isolation in plant structures under laboratory conditions. Red onion (*A. cepa*) bulbs, leek (*A. ampeloprasum*) stalks, cactus (*O. indica*) cladodes, carrot (*D. carota*) roots, ginger (*Z. officinale*) rhizomes, broccoli (*B. oleracea* var. *italica*) inflorescences and mushroom (*A. bisporus*) sporocarps were disinfested using sodium hypochlorite (NaClO) at 2% for 2 min, and then with 70% ethanol for 1 min, followed by three washings with sterile distilled water. Finally, they were dried on sterilized paper towels for 10 minutes. Then, they were injected with 0.5 mL of bacterial inoculant at a density of 3.0×10^8 UFC, adjusted using McFarland's scale. In the controls, the bacterial inoculant was substituted with sterile distilled water. Afterwards, the plant structures were placed in humid chambers and the

espécimen se colocó en un porta-muestra, con ayuda de un pincel, bajo el microscopio estereoscópico. Después, la muestra se cubrió con oro en el equipo FINE COAT (Ion sputter JFC-1100). Por último, se observó la morfología bacteriana con ayuda del software de Microanálisis AXS para microscopio electrónico de barrido (Oxford instruments INCA x-act 2009).

Inoculación del aislamiento bacteriano en estructuras vegetales bajo condiciones de laboratorio. Bulbos de cebolla morada (*A. cepa*), tallos de puerro (*A. ampeloprasum*), cladodios de nopal (*O. indica*), raíces de zanahoria (*D. carota*), rizomas de jengibre (*Z. officinale*), inflorescencias de brócoli (*B. oleracea* var. *italica*) y esporocarpos de champiñón (*A. bisporus*), se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2% por 2 min, enseguida con etanol al 70% durante 1 min, luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Finalmente, se secaron sobre papel absorbente estéril durante 10 min. Posteriormente, se inyectaron con 0.5 mL de inóculo bacteriano, a una densidad de 3.0×10^8 UFC, ajustada mediante la escala de McFarland. En los testigos, el inóculo bacteriano se sustituyó con agua destilada estéril. En seguida, las estructuras vegetales fueron colocadas en cámaras húmedas y se evaluó el daño a las 48 h. Para determinar la severidad, se elaboró una escala del 0 al 5 de acuerdo con el grado de maceración 0, 20, 40, 60, 80 y 100%, respectivamente (Liao *et al.*, 1986). Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, y después se compararon las medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se usó el programa SAS, Versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

Inoculación del frijol con el aislamiento bacteriano bajo condiciones de invernadero. Se

damage was evaluated after 48 h. To determine the severity, a scale of 1 to 5 was created for the degree of maceration: 0, 20, 40, 60, 80 and 100%, respectively (Liao *et al.*, 1986). A completely random design was used, with four repetitions per treatment. With the data obtained, an ANOVA was carried out, and the means of the treatments were then compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). The program used was SAS, Version 9.0 (SAS Institute, 2002).

Inoculation of bean with the bacterial isolation under greenhouse conditions. Each bean seed was germinated in a 1 L container with Peat Moss and Agrolite (75:25). A bacterial suspension of the pathogen was inoculated at a concentration of 3.0×10^9 UFC in four plants, 10 days after germination; likewise, four plants were left as negative controls (Falcao *et al.*, 2004). A completely random design was used, with four repetitions per treatment. With the data obtained, an ANOVA was carried out, and the means of the treatments were then compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). The SAS program, version 9.0 (SAS Institute, 2002) was used.

In vitro sensitivity to chemical and biological products. A bacterial isolation sensitivity test was carried out using the method of diffusion in agar (Matuschek *et al.*, 2014), on the following chemical products: agricultural cuprimicin (200 g/100 L), serenade powder (1 Kg/200 L), bactrol 2X (60 g/100 L), agricultural bactriomicin (400 g/100 L), biological fungifree (2.5 Kg/200 L), cuprimicin 500 (625 g/100 L), phyton (1.5 mL/1 L), copper oxychloride (400 g/100 L), kasumin (2 L/200 L), final bacter (1.6 Kg/200 L), quatz (400 g/100 L), biological bacterbest (1 L/200 L) and biological biotermin (3 L/200 L). As a control, we used sterile distilled water. We placed 200 μ L of an aqueous solution of the bacterial isolation

germinó cada semilla de frijol, en un contenedor de 1 L con Peat Moss y Agrolita (75:25). Se inoculó una suspensión bacteriana del patógeno a una concentración de 3.0×10^9 UFC en cuatro plantas a los 10 días después de la germinación, asimismo, se dejaron cuatro plantas como testigo negativo (Falcao *et al.*, 2004). Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Con los datos obtenidos se realizó un ANDEVA, comparando las medias de los tratamientos con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se usó el programa SAS, Versión 9.0 (SAS Institute, 2002).

Sensibilidad *in vitro* a productos químicos y biológicos. Se realizó una prueba de sensibilidad del aislamiento bacteriano por el método de difusión en agar (Matuschek *et al.*, 2014), a los siguientes productos químicos: cuprimicin agrícola (200 g/100 L), serenade polvo (1 Kg/200 L), bactrol 2X (60 g/100 L), bactriomicin agrícola (400 g/100 L), fungifree biológico (2.5 Kg/200 L), cuprimicin 500 (625 g/100 L), phyton (1.5 mL/1 L), oxiclóruo de cobre (400 g/100 L), kasumin (2L/200 L), final bacter (1.6 Kg/200 L), quatz (400 g/100 L), bacterbest biológico (1L/200 L) y biotermin biológico (3L/200 L). Como control se empleó agua destilada estéril. Se colocaron 200 μ L de una suspensión acuosa del aislamiento bacteriano con 3.0×10^8 UFC en cajas Petri cuadradas (120 X 120 mm) con medio agar nutritivo. El inóculo se distribuyó de manera uniforme con un asa Driglasky sobre la superficie del medio. Se usaron discos de papel filtro estériles (13 mm de diámetro), los cuales se sumergieron por tres segundos en cada uno de los productos y se colocaron en las placas de medio. Finalmente, las placas se incubaron a 28 °C durante 48 h para observar la presencia o ausencia de zonas de inhibición (Bauer *et al.*, 1966).

with 3.0×10^8 UFC in squared Petri dishes (120 X 120 mm) with a nutritious agar medium. The inoculant was distributed evenly with a Driglasky spatula on the surface of the medium. Sterile filter paper discs (13 mm in diameter) were used, which were submerged for three seconds in each of the products and placed in the medium dishes. Finally, the dishes were incubated at 28 °C for 48 h to look for the presence or absence of inhibition areas (Bauer *et al.*, 1966).

RESULTS AND DISCUSSION

Morphological characterization. The morphology of the cultures observed in King's B medium, after 48 h of incubation at 28 °C, was smooth, yellow, convex, mucoid cultures, with a production of diffusible pigment in the center (Figure 1A). These characteristics coincided with those reported by Lamovsek *et al.* (2016) for *B. gladioli* pv. *allicola*. However, the cultures presented no fluorescence in King's B medium, as reported by Kowalska *et al.* (2015).

The cultures were purple in color in MacConkey's agar medium (Figura 1B), which confirmed that this bacterium is able to ferment lactose, unlike *Pseudomonas aeruginosa* (Callicó *et al.*, 2004), which lacks lactase (Ranjan *et al.*, 2017). On the other hand, the bacterial isolation displayed a growth of red cultures in a Congo Red medium (Figure 1C), which indicated that this bacterium can assimilate the iron found in the culture medium. This characteristic is crucial to the colonization process of the phytopathogenic microorganisms (Aguado *et al.*, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica. La morfología de las colonias observadas en medio B de King, después de 48 h de incubación a 28 °C, correspondió a colonias amarillas, lisas, convexas, mucoides y con producción de pigmento difusible en el medio (Figura 1A). Estas características coincidieron con las reportadas por Lamovsek *et al.* (2016) para *B. gladioli* pv. *allicola*. No obstante, las colonias no emitieron fluorescencia en medio B de King, como lo reportaron Kowalska *et al.* (2015).

Las colonias fueron de color púrpura en el medio agar MacConkey (Figura 1B), lo que confirmó que esta bacteria es capaz de fermentar la lactosa, diferenciándose de *Pseudomonas aeruginosa* (Callicó *et al.*, 2004) que carece de la lactasa (Ranjan *et al.*, 2017). Por otro lado, el aislamiento bacteriano no mostró crecimiento de colonias rojas en medio Rojo Congo (Figura 1C), lo que indicó que esta bacteria es capaz de asimilar el hierro que se encuentra en el medio de cultivo. Esta característica es fundamental para el proceso de colonización de los microorganismos fitopatógenos (Aguado *et al.*, 2012).

Molecular identification. The amplification of gene rRNA of the bacterial isolation displayed fragments of 1500 pairs of bases (pb). When comparing the consensus sequence (Accession Number MT672591) on the NCBI data base, there was a similarity of 100% with *B. gladioli*.

Phylogenetic tree. The consensus sequence MT672591 was grouped with *B. gladioli* (MN559413) with a similarity of 100 % (Figure 2).

Pathogenicity. The onion slices displayed soft rotting 24 h after inoculation. The stereoscopic microscope showed abundant bacterial flow 48 h after inoculation at 28 °C. *B. gladioli* (MT672591) was positive to the hypersensitivity reaction in tobacco and rotting in potato. The control slices presented no symptoms of soft rotting.

Scanning electron microscopy. The results of the scanning electron microscope coincide with reports by the Boston Research Occupational Health Program (2019), which indicate that members of the *Burkholderia* genus present a bacillary shape, between 1.6 and 3.2 µm, with one or several

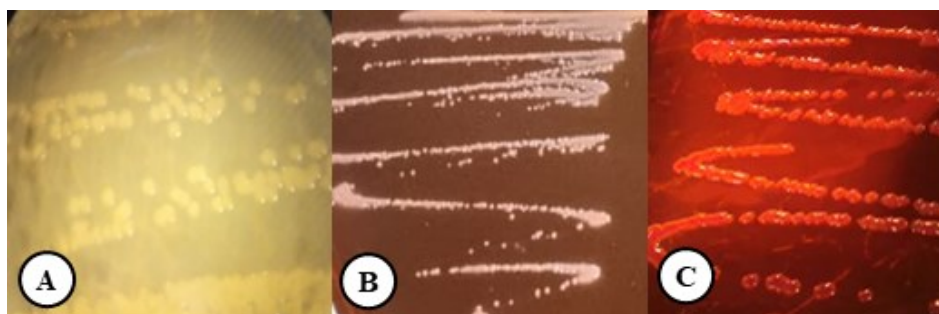


Figura 1. Crecimiento del aislamiento bacteriano de *Burkholderia gladioli* en medios de cultivo B de King (A), Agar MacConkey (B) y Rojo Congo (C) después de 48 h de incubación.

Figure 1. Growth of the *B. gladioli* bacterial isolation in King's B culture medium (A), MacConkey's Agar (B) and Congo Red (C) after 48 h of incubation.

Identificación molecular. La amplificación del gen 16S ARN ribosomal del aislamiento bacteriano mostró fragmentos de 1500 pares de bases (pb). Al comparar la secuencia consenso (Número de Acceso MT672591) en la base de datos del NCBI se obtuvo un 100% de similitud con *B. gladioli*.

Árbol filogenético. La secuencia consenso MT672591 se agrupó con *B. gladioli* (MN559413) con 100 % de similitud (Figura 2).

Patogenicidad. Las rodajas de cebolla mostraron pudrición blanda 24 h después de la inoculación. Al microscopio estereoscópico se observó abundante flujo bacteriano 48 h después de la inoculación a 28 °C. *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue positiva a la reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de papa. Las rodajas testigo no presentaron síntomas de pudrición blanda.

flagellar poles, important to the pathogenicity (Tomich *et al.*, 2002). In the present study, it was not possible to visualize the flagella, since the observation of these structures is carried out with negative staining with a transmission electron microscope (Jurado and Petrucci, 2005).

The *B. gladioli* bacilli (MT672591) formed biofilms and were also observed in a planktonic state (Figure 3). The formation of biofilms is another important characteristic in this genus, since it is through them that they detect signaling molecules, helping their synchronization in the gene expression (Federle *et al.*, 2009).

Physiological and biochemical characterization.

B. gladioli (MT672591) was positive to the hypersensitivity reaction test in tobacco and potato rotting, which confirms the presence of secretion systems I, II and III (Seo *et al.*, 2015).

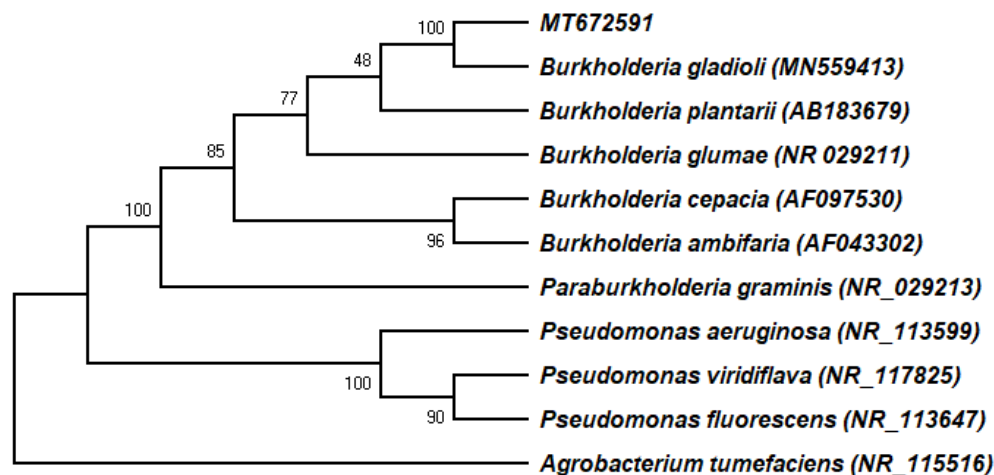


Figura 2. Árbol filogenético basado en la comparación de las secuencias del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal de especies del género *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Entre paréntesis se indican los números de acceso de las secuencias en la base de datos NCBI.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the comparison of the gene sequences of subunit 16S of the rRNA of species in the *Burkholderia* and *Pseudomonas* genera. The parentheses indicate the accession numbers of the sequences in the NCBI data base.

Microscopía electrónica de barrido. Los resultados de microscopía electrónica de barrido concuerdan con lo reportado por el Programa de Investigación en Salud Ocupacional de la Universidad de Boston (2019), que indican que los miembros del género *Burkholderia* presentan forma bacilar de 1.6 a 3.2 μm , con uno o varios flagelos polares, importantes en la patogenicidad (Tomich *et al.*, 2002). En el presente estudio no fue posible visualizar los flagelos, debido a que la observación de estas estructuras se realiza mediante la tinción negativa con microscopía electrónica de transmisión (Jurado y Petrucci, 2005).

Los bacilos de *B. gladioli* (MT672591) formaron biopelículas y fueron observadas también en estado planctónico (Figura 3). La formación de biopelículas es otra característica importante de este género, ya que a través de estos detectan moléculas de señalización, que les permite la sincronización en la expresión de genes (Federle *et al.*,

Caracterización fisiológica y bioquímica. *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue positiva a

In the phytopathogenic bacteria, Secretion System III is codified by the HRP genes (hypersensitive response and pathogenicity), which are necessary for the bacteria to cause diseases in susceptible plants and cause a hypersensitivity response in resistant plants (Lindgren *et al.*, 1986; Büttner and He, 2009).

These secretion systems help the bacteria to colonize different ecological niches, such as postharvest fruits and *in vivo* plant tissues with the hosts, with which a compatible relationship is established. *B. gladioli* (MT672591) was strictly aerobic and used glucose, sucrose, arginine, and lactose as a source of carbon, coinciding with reports by Kowalska *et al.* (2015). The bacterium (MT672591) grew to a pH of 4, which gives it a competitive advantage in acid soils. This contrasts with reports by Estrada de los Santos *et al.* (2013), who mention that none of the 59 strains evaluated, belonging to 43 species of the *Burkholderia* genus, grew to a pH of 4. Growth of *B. gladioli* (MT672591) was observed at 42 °C, agreeing with reports by Kowalska *et al.* (2015). Table 1 shows

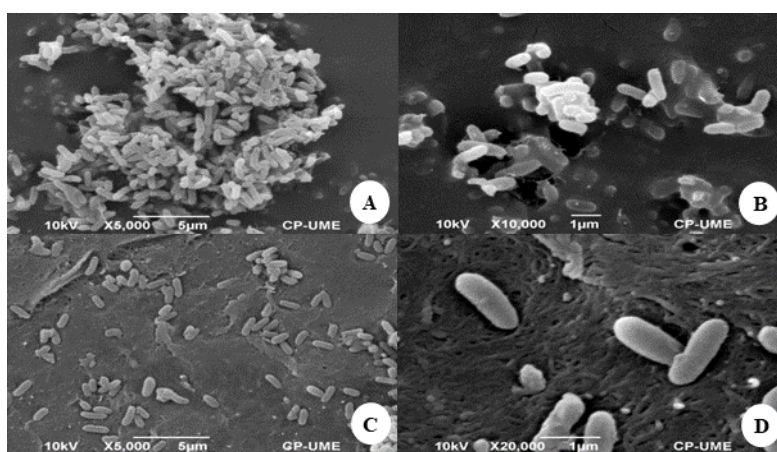


Figura 3. Micrografía de *B. gladioli* (MT672591) observada con microscopía electrónica de barrido. A y B corresponden a biopelículas (5,000 X y 10,000 X, respectivamente); C y D a la bacteria en estado planctónico (5,000 y 20,000 X, respectivamente).

Figure 3. Micrography of *B. gladioli* (MT672591) observed with a scanning electron microscope. A and B correspond to biofilms (5,000 X and 10,000 X, respectively); C and D correspond to the bacteria in a planktonic state (5,000 and 20,000 X, respectively).

la prueba de reacción de hipersensibilidad en tabaco y pudrición de papa, lo que confirma la presencia de los sistemas de secreción I, II y III (Seo *et al.*, 2015).

En las bacterias fitopatógenas, el Sistema de Secreción III está codificado por los genes *hrp* (por sus siglas en inglés: hypersensitive response and pathogenicity), estos son necesarios para que las bacterias causen enfermedades en plantas susceptibles y provoquen la respuesta de hipersensibilidad en plantas resistentes (Lindgren *et al.*, 1986; Büttner y He, 2009).

Estos sistemas de secreción habilitan a la bacteria a colonizar diferentes nichos ecológicos, como frutos postcosecha y tejido vegetal *in vivo* con los hospedantes con los cuales establece una relación compatible. *Burkholderia gladioli* (MT672591) fue estrictamente aeróbica y utilizó como fuente de carbono, glucosa, sacarosa, arginina y lactosa, coincidiendo con lo reportado por Kowalska *et al.* (2015). La bacteria (MT672591) creció a pH de 4, lo que le da ventaja competitiva en suelos ácidos. Esto contrasta con lo reportado por Estrada de los Santos *et al.* (2013), quienes mencionan que ninguna de las 59 cepas evaluadas, pertenecientes a 43 especies del género *Burkholderia*, creció a pH de 4. Se observó crecimiento de *B. gladioli* (MT672591) a 42 °C, concordando con lo reportado por Kowalska *et al.* (2015). En el Cuadro 1, se observan las similitudes y diferencias entre la cepa aislada en este estudio y las reportadas en Sinaloa, México y en Polonia.

Inoculación de *B. gladioli* en estructuras vegetales bajo condiciones controladas. Se registraron diferencias significativas en el grado de maceración (Cuadro 2). Se observó mayor grado de maceración en el bulbo de la cebolla morada y en el tallo de puerro. El tejido de ambas estructuras vegetales se maceró completamente 48 h después a

the similarities and differences between the isolated strain in this study and those reported in Sinaloa, Mexico, and

Inoculation of *B. gladioli* in plant structures under controlled conditions. Significant differences were registered in the degree of maceration (Table 2). The highest degree of maceration was found in the red onion bulb and the leek stalk. The tissues of both plant structures were completely macerated 48 h after inoculation and it displayed the typical symptom of soft rot, caused by *B. gladioli* (MT672591) (Figures 4 A and B). The red onion and the leek presented similar interactions with the bacterium, probably due to them both belonging to the Alliaceae family.

In the cactus (*Opuntia* spp.) cladodes, the first symptoms of soft rot were observed 24 h after inoculation. First, dark brown dots appeared, which grew with a moist aspect and a halo around the spots 48 h after inoculation (Figure 4C). A complete rotting of the cladode was observed six days after inoculation, coinciding with the symptoms caused by *Pectobacterium* spp. (Torres *et al.*, 2016). Both phytopathogens are characterized for having high enzymatic activity. To this day, there are no reports on the *Burkholderia* genus as a pathogen of cactus in a natural state; however, due to the aggressiveness in the colonization observed under controlled conditions, it deserves further studies.

Likewise, soft rot and degradation of the sporocarp were observed in mushrooms (Figure 4D). Chowdhury and Heinemann (2006) reported that Secretion System type II is involved in the disease caused by *B. gladioli* pv. *agaricola* in mushrooms. These researchers found that avirulent mutants were unable to degrade the tissue of mushrooms, due to the reduction in the ability to secrete chitinases and proteases, as well as the reduction in the number of flagella. *B. gladioli*

Cuadro 1. Comparación fisiológica y bioquímica de cepas de *B. gladioli* procedentes del Estado de México (presente estudio), Sinaloa, México y Polonia.
Table 1. Physiological and biochemical comparison of strains of *B. gladioli* from the State of Mexico (present study), Sinaloa, Mexico, and Poland.

Característica	<i>B. gladioli</i> (MT672591) del Edo. de México, México	<i>B. gladioli</i> de Sinaloa, México (Félix-Gastélum <i>et al.</i> , 2017)	<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i> de Polonia (Kowalska <i>et al.</i> , 2015)
Hipersensibilidad en tabaco	+	+	+
Pudrición de papa	+	NR	NR
Tinción de Gram	-	-	-
Reacción KOH	+	NR	-
Crecimiento anaeróbico	-	NR	-
Oxidasa	+ retardada	+	+
Catalasa	+	NR	NR
Fluorescencia en medio B de King	-	-	-
Colonia mucoide	+	-	-
Color crema en medio AN	+	+	+
Fermentación/oxidación	Oxidativo	NR	Oxidativo
Hidrólisis de gelatina	+	NR	+
Arginina dehidrolasa	-	-	-
Hidrolisis de Almidón	-	-	NR
Crecimiento:			
40 °C	+	NR	+
42 °C	+	NR	NR
43 °C	+	NR	NR
Levana	-	NR	NR
Motilidad	+	NR	NR
Reducción de nitratos	+	-	NR
Tolerancia:			
pH 4	+	NR	+
pH 8	+	NR	+
pH 9	+	NR	-
Utilización de:			
Lactosa	+	+	+
Glucosa	+	+	NR
Celobiosa	+	+	+
Maltosa	-	NR	NR
Trehalosa	-	NR	NR
Inositol	-	NR	NR
Sorbitol	-	+	+
Dulcitol	+	NR	NR

+Positivo, - Negativo, NR No reportado. / +Positive, - Negative, NR Not reported.

la inoculación, y mostró el síntoma típico de pudrición blanda, causado por *B. gladioli* (MT672591) (Figuras 4 A y B). La cebolla morada y el puerro presentaron una interacción similar con la bacteria, debido probablemente a que ambas pertenecen a la familia Alliaceae.

pv. *agaricola* is considered a potential mushroom pathogen, which could cause important losses in the industry of this fungus (Gill and Tsuneda, 1997).

In carrots, dark brown patches were produced near the points in which the bacterium was

En los cladodios de nopal (*Opuntia* spp.), los primeros síntomas de pudrición blanda se observaron 24 h después a la inoculación. Primero, aparecieron puntos de color café oscuro, que fueron creciendo con aspecto húmedo y un halo alrededor de las manchas a las 48 h después de la inoculación (Figura 4C). Se observó pudrición completa del cladodio seis días después de la inoculación, coincidiendo con los síntomas que ocasiona *Pectobacterium* spp. (Torres *et al.*, 2016). Ambos fitopatógenos se caracterizan por tener gran actividad enzimática. Hasta el momento, no existen reportes del género *Burkholderia* como patógeno del nopal en forma natural; sin embargo, debido a la agresividad de colonización que se observó bajo condiciones controladas, merece estudios posteriores.

Igualmente, se registró pudrición blanda y degradación del esporocarpo del champiñón (Figura 4D). Chowdhury y Heinemann (2006), reportaron que el Sistema de Secreción tipo II se encuentra involucrado en la enfermedad causada por *B. gladioli*

Cuadro 2. Grado de maceración inducido por *B. gladioli* en diferentes estructuras vegetales.
Table 2. Degree of maceration induced by *B. gladioli* in different plant structures.

Estructura vegetal	Maceración (%)
Bulbo de cebolla morada	4.87 a
Tallo de puerro	4.72 a
Cladodio de nopal	4.22 ab
Esporocarpo de champiñón	3.97 bc
Raíz de zanahoria	3.62 b
Inflorescencia de brócoli	3.50 c
Rizoma de jengibre	0.00 d

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); $n=4$ repeticiones por tratamiento. / Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$); $n=4$ repetitions per treatment.

inoculated, three days after inoculation (Figure 4E). So far, there are no reports on damages to carrots by *B. gladioli*, although *Pseudomonas viridiflava* has been reported to promote similar symptoms in carrot roots (Almeida *et al.*, 2013). This similarity may be due to the proximity of

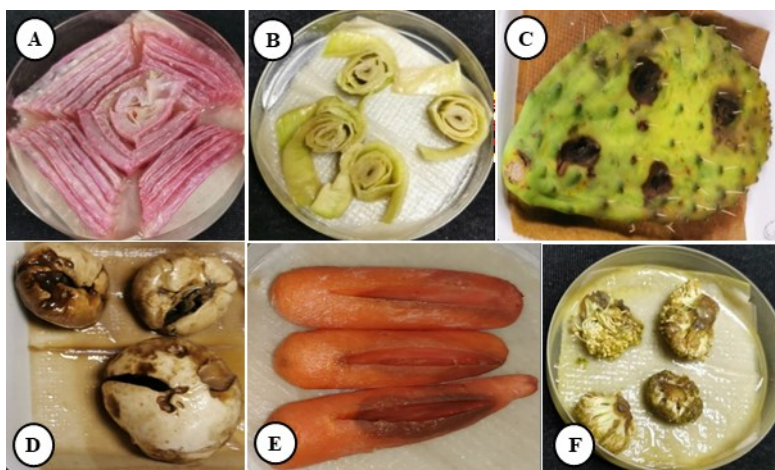


Figura 4. Síntomas de pudrición inducidos por *B. gladioli* (MT672591) en diferentes estructuras vegetales bajo condiciones controladas: A) bulbos de cebolla morada, B) tallos de puerro, C) cladodios de nopal, D) esporocarpos de champiñón, E) raíces de zanahoria y F) inflorescencias de brócoli.

Figure 4. Symptoms of rotting caused by *B. gladioli* (MT672591) in different plant structures under controlled conditions: A) red onion bulbs, B) leek stalks, C) cactus cladodes, D) mushroom sporocarps, E) carrot roots and F) broccoli inflorescences.

pv. *agaricola* en champiñón. Estos investigadores mencionan que mutantes avirulentos fueron incapaces de degradar el tejido de champiñón, debido a la reducción de la capacidad de secretar quitinasas y proteasas, así como la reducción en el número de flagelos. *B. gladioli* pv. *agaricola* es considerada un patógeno potencial del champiñón, que podría ocasionar pérdidas importantes en la industria de este hongo (Gill y Tsuneda, 1997).

En la zanahoria se produjeron áreas café oscuras cerca de los puntos donde se inoculó la bacteria, tres días después de la inoculación (Figura 4E). Hasta el momento no existen reportes de *B. gladioli* causando daños en zanahoria, pero se ha reportado que *Pseudomonas viridiflava* promueve síntomas similares en las raíces de la zanahoria (Almeida *et al.*, 2013). Esta similitud probablemente se deba a la cercanía del género *Burkholderia*, que originalmente se encontraba agrupado dentro del género *Pseudomonas* (Yabuuchi *et al.*, 1992). En el caso de las inflorescencias de brócoli, el tejido se tornó acuoso con mal olor, y se observó maceración del tejido tres días posteriores a la inoculación (Figura 4F), síntomas similares a los que ocasiona *Pseudomonas fluorescens* en este cultivo (Li *et al.*, 2009). En el caso del jengibre, no se observó ningún síntoma, lo que evidencia una relación incompatible.

Inoculación del frijol con *B. gladioli* en invernadero. Se observaron lesiones necróticas en hojas y tallos del frijol (Figura 5). Se registró 100% de incidencia, sin embargo, no se registró diferencia estadística significativa con respecto al testigo en número de botones florales y altura (Cuadro 3). Estudios recientes indican que algunas cepas del género *Burkholderia* viven de forma endófitas en maíz silvestre, sin causarle enfermedad (Johnston y Raizada, 2011). Compant *et al.* (2008), mencionan que en ecosistemas naturales y artificiales, *Burkholderia* spp. puede colonizar la filósfera y tejidos internos de

the *Burkholderia* genus, which was originally grouped in the *Pseudomonas* genus (Yabuuchi *et al.*, 1992). In the case of broccoli inflorescences, the tissue turned aqueous and with a bad smell, and the tissue displayed maceration three days after inoculation (Figure 4F), similar to the symptoms caused by *Pseudomonas fluorescens* in this crop (Li *et al.*, 2009). In the case of ginger, no symptoms were observed, which shows an incompatible relationship.

Inoculation of bean with *B. gladioli* in a greenhouse. Necrotic lesions were observed in bean leaves and stalks (Figure 5). An incidence of 100% was registered, although no significant statistical differences were registered regarding the control in the number of flower buttons and height (Table 3). Recent studies indicate that some strains of the *Burkholderia* genus live endophytically in wild maize without causing any disease (Johnston and Raizada, 2011). Compant *et al.* (2008) mention that in natural and artificial ecosystems, *Burkholderia* spp. may colonize the phyllosphere and internal tissues of the plant, being the only bacterium that easily adapts to the environment and to plants. On the other hand, *B. gladioli* produces toxoflavin, which is highly allergenic to plants, fungi and animals (Anwar *et al.*, 2017). Likewise, Lee *et al.* (2016) indicate that the *quorum sensing* is related to the production of toxoflavin.

Burkholderia gladioli contains a genome made up of 9.05 Mb, two chromosomes and four plasmids, suggesting that the size of its genome is related to its ability to colonize different ecological niches (Mannaa *et al.*, 2018). In addition, *Burkholderia sensu lato* has different virulence factors such as type I, II, III, IV and V secretion systems, adhesins, pilis, siderophores, extracellular proteases, various polysaccharides, and *quorum sensing* molecules (Ferreira *et al.*, 2019).

las plantas, siendo probablemente la bacteria que más fácilmente se adapta al ambiente y las plantas. Por otra parte, *B. gladioli* produce toxo flavina que es altamente tóxica para plantas, hongos y animales (Anwar *et al.*, 2017). Así mismo, Lee *et al.* (2016), indican que el *quorum sensing* está relacionado en la producción de toxo flavina.

Burkholderia gladioli posee un genoma constituido por 9.05 Mb, por dos cromosomas y cuatro plásmidos, lo que sugiere que el tamaño de su genoma está relacionado con su capacidad de colonizar diferentes nichos ecológicos (Mannaa *et al.*, 2018). Además, *Burkholderia*, *sensu lato*, posee diversos factores de virulencia, como son: los sistemas de secreción tipo I, II, III, IV y V, adhesinas, pilis, sideróforos, proteasas extracelulares, varios polisacáridos y moléculas de *quorum sensing* (Ferreira *et al.*, 2019).

Debido a que *B. gladioli* tiene la capacidad de sobrevivir en agua, y que gran parte de las aguas residuales se utilizan con fines agrícolas, esto podría traer consecuencias ecológicas negativas, como una fuente de diseminación a largas distancias (Escobedo y Pardo, 2017). Al realizar los reaislamiento en los tejidos vegetales utilizados en este estudio, en todos los casos, se observó motilidad bajo el microscopio óptico a 40X, coincidiendo con lo descrito por Chung *et al.* (2003). Esta es una característica importante en la patogenicidad de

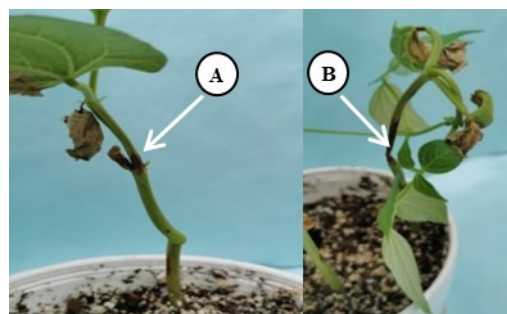


Figura 5. Síntomas inducidos por *Burkholderia gladioli* (MT672591) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). A) Inicio de la lesión; B) Avance de la lesión.

Figure 5. Symptoms induced by *Burkholderia gladioli* (MT672591) in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). A) Start of the lesion; B) Progress of the lesion.

Since *B. gladioli* survive in water, and most residual waters are used with agricultural purposes, this could lead to negative ecological consequences, such as a source of long-distance dissemination (Escobedo and Pardo, 2017). When reisolating in the plant tissues studied in this investigation, in all cases, motility was found under the light microscope at 40X, coinciding with descriptions by Chung *et al.* (2003). This is an important characteristic in the pathogenicity of this bacteria, since it has polar flagella, which provides it with the advantage to move around the tissue of its host.

Cuadro 3. Número de botones florales, altura y tamaño de lesiones en tallo de plantas de frijol inoculadas con *Burkholderia gladioli* (MT672591).
Table 3. Number of flower buttons, height and size of lesions in bean plant stalks inoculated with *Burkholderia gladioli* (MT672591).

Plantas de frijol	Número de botones florales	Altura (cm)	Lesión en tallo (cm)
Inoculado	3.125 a	27.2625 a	0.8625 a
No inoculado	2.25 a	22.2625 a	0 b

Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); $n=4$ repeticiones por tratamiento. / Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$); $n=4$ repetitions per treatment.

esta bacteria, ya que, al poseer un flagelo polar, le brinda ventaja para desplazarse en el tejido de su hospedante.

Sensibilidad *in vitro* a productos químicos y biológicos. Ningún de los productos ensayados tuvo efecto inhibitorio sobre *B. gladioli* (MT672591). Esta bacteria se caracteriza por su resistencia natural a antibióticos, debido a la capacidad de formar biopelículas y cambiar su envoltura celular para reducir la permeabilidad de membrana impidiendo así la entrada del antibiótico (Sousa *et al.*, 2011; Torbeck *et al.*, 2011). Los mecanismos que le brindan resistencia incluyen producción de β -lactanasas y otras enzimas, así como la modificación de los puntos objetivo de los antibióticos (Ranjan *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

Se identificó morfológica, fisiológica, bioquímica y molecularmente a *Burkholderia gladioli* (MT672591) como agente causal de pudrición blanda del bulbo de la cebolla blanca.

B. gladioli colonizó e indujo daño en bulbos de cebolla morada, cladodios de nopal, esporocarpos de champiñón, tallos de puerro, raíces de zanahoria y rizomas de jengibre en condiciones de laboratorio. Igualmente, promovió lesiones en plantas de frijol de condiciones de invernadero. Además, mostró resistencia natural a cuprimicin agrícola, serenade polvo, bactrol, bactriomicin agrícola, fungifree biológico, cuprimicin 500, phyton, oxiclورو de cobre, kasumin, final bacter, quatz y bacterbest biológico. Este estudio reporta por primera vez la caracterización polifásica de *B. gladioli* en México. Esta especie bacteriana tiene la capacidad de crecer a pH 4.0 y 42 °C, lo que podría conferirle habilidad competitiva en suelos ácidos y condiciones

***In vitro* sensitivity to chemical and biological products.** None of the products tested had an inhibiting effect on *B. gladioli* (MT672591). This bacterium is characterized by its natural resistance to antibiotics, due to its ability to form biofilms and change its cellular cover to reduce membrane permeability, thus stopping the antibiotics from entering (Sousa *et al.*, 2011; Torbeck *et al.*, 2011). The mechanisms that give it resistance include the production of β -lactanases and other enzymes, as well as the modification of the target points of antibiotics (Ranjan *et al.*, 2017).

CONCLUSIONS

Burkholderia gladioli (MT672591) was identified morphologically, physiologically, biochemically, and molecularly as the causal agent of soft rot of the bulb of white onion.

B. gladioli colonized and induced damages in red onion bulbs, cactus cladodes, mushroom sporocarps, leek stalks, carrot roots and ginger rhizomes under laboratory conditions. Likewise, it promoted lesions in bean plants under greenhouse conditions. It also showed a natural resistance to agricultural cuprimicin, serenade powder, bactrol, agricultural bactriomicin, biological fungifree, cuprimicin 500, phyton, copper oxychloride, kasumin, final bacter, quatz and biological bacterbest. This study reports the polyphasic characterization of *B. gladioli* for the first time in Mexico. This bacterial species has the ability to grow at pH 4.0 and at 42 °C, which may give it a competitive ability in acid soils and semiarid conditions. It proved to have a wide range of hosts in postharvest conditions, as well as being resistant to some products used in the field for the control of phytopathogens.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

semiáridas. Se demuestra que tiene un amplio rango de hospederos en condiciones postcosecha, además de ser resistente a algunos productos usados en campo para el control de fitopatógenos.

## LITERATURA CITADA

- Aguado SGA, Moreno GB, Jiménez FB, García ME and Preciado OE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(1): 9-21. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n1/v35n1a4.pdf>.
- Almeida IMG, Maciel KW, Rodrigues J and Beriam LOS. 2013. *Pseudomonas viridiflava* in imported carrot seeds. *Australasian Plant Disease* 8:17-19. <http://doi.org/10.1007/s13314-012-0086-2>.
- Anwar M, Kasper A, Steck AR and Schier JG. 2017. Bongrekic acid a review a lesser known mitochondrial toxin. *Journal of Medical Toxicology* 13:176-179. <http://doi.org/10.1007/s13181-016-0577-1>.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC and Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496. <https://www.asm.org/ASM/media/docs/105bauer.pdf>.
- Büttner D and He SY. 2009. Type III Protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology* 150: 1656-1664. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139089>.
- Callicó A, Cedré B, Sinfontes S, Torres V, Pino Y Callis AH and Esnard SC. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor* 13(3):1-9. <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v13n3/vac01304.pdf>.
- Chowdhury PR and Heinemann JA. 2006. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola* BG164R Is Necessary for Cavity Disease in White Button Mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3558-3565. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3558-3565.2006>.
- Chung JW, Altman E, Beveridge TJ and Speert DP. 2003. Colonial Morphology of *Burkholderia cepacia* Complex Genomovar III: Implications in exopolysaccharide production, Pilus expression, and persistence in the mouse. *Infection and Immunity* 71(2): 904-909. <http://doi.org/10.1128/IAI.71.2.904-909.2003>.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clement C and Barka EA. 2008. Review article: Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp., in the natural environment. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Review* 32: 607-626. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00113>.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Escobedo HW and Pardo LL. 2017. Perspective: Analysis of bacterial metagenomes from the South western Gulf of Mexico for pathogens detection. *Pathogens and Disease* 75:1-9. <http://doi.org/10.1093/femspd/ftx058>.
- Espinosa-Victoria D, López-Reyes L, Carcaño-Montiel MG and Serret-López M. 2020. The *Burkholderia* genus: between mutualism and pathogenicity. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(3). <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2004-5>.
- Estrada de los Santos P, Vinuesa P, Martínez AL, Hirsch AM and Caballero MJ. 2013. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Current Microbiology* 67:51-50. <http://doi.org/10.1007/s00284-013-0330-9>.
- Falcao SJ and Van Veen JA and van Elsas JD. 2004. Multivariate analysis of *Burkholderia* species in soil: Effect of crop and land use history. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7): 4012-4020. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4012-4020.2004>.
- FAOSTAT. 2017. Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura. Consultado el 01 de diciembre del 2019. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- Federle MJ. 2009. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: Complexities of interspecies signaling. *Contribution Microbiology* 16:18-32. <http://doi.org/10.1159/000219371>.
- Félix-Gastélum R, Maldonado MIE, Olivas PFG, Brito VH, Peñuelas RO and Longoria ERM. 2017. First report of slipper skin caused by *Burkholderia gladioli* in stored onion bulbs in Mexico. *The American Phytopathological Society (APS)*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1370-PDN>.
- Ferreira M, Gomes SC and Moreira LM. 2019. Chapter Four-Mucoid switch in *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Triggers, molecular mechanisms, and implications in pathogenesis. *Advances in Applied Microbiology* 107: 113-140. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.03.001>.
- Galkiewicz JP and Kellogg CA. 2008. Cross-Kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied Environmental Microbiology* 74 (24): 7828-7831. <http://doi.org/10.1128/AEM.01303-08>.
- Gill WM and Tsuneda A. 1997. The interaction of soft rot bacterium *Pseudomonas gladioli* pv. *agaricola* with Japanese cultivated mushrooms. *Canadian Journal of Microbiology* 43(7): 639-648. <https://doi.org/10.1139/m97-091>.
- Goszczyńska T, Serfontein JJ and Serfontein S. 2000. Introduction to practical phyto bacteriology: a manual for phyto bacteriology by SAFRINET, SDC Switzerland. 83 p. [https://www.researchgate.net/publication/237021880\\_Introduction\\_to\\_Practical\\_Phyto bacteriology\\_A\\_manual\\_for\\_phyto bacteriology](https://www.researchgate.net/publication/237021880_Introduction_to_Practical_Phyto bacteriology_A_manual_for_phyto bacteriology).
- Johnston MD and Raizada MN. 2011. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, Ethnography and Ecology. *Plos one* 6(6): 1-22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0020396>.
- Jurado SB and Petrucci MA. 2005. Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico. *Analecta Veterinaria* 25(1):18-24. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11173/Documento\\_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11173/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Keith L and Thammakijjawat P. 2019. Detection of *Burkholderia gladioli* in orchids. <https://doi.org/10.1094/9780890545416.048>.

- Kowalska B, Smolińska U and Oskiera M. 2015. *Burkholderia gladioli* associated with soft rot of onion bulbs in Poland. *Journal of Plant Pathology* (1): 37-43. <http://doi.org/10.4454/JPP.V97I1.007>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics Analysis across computing platforms. Release 10.0.5. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547–1549. <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lamovsek J, Geric SB, Zerjav M and Urek G. 2016. Soft rot of onion bulbs caused by *Burkholderia gladioli* pv. *allicola* in Slovenia. *Journal of Plant Pathology* 98(2): 369-377. <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V98I2.041>.
- Lee Y, Park J, Kim S, Park I and Seo YS. 2016. Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. *Molecular Plant Pathology* 17(1): 65-76. <http://doi.org/10.1111/mpp.12262>.
- Li B, Wang GL, Wu ZY, Qui W, Tang QM, Xie L. 2009. First report of bacterial head rot of broccoli caused by *Pseudomonas fluorescens* in China. *Plant Disease* 93(11):1219. <http://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1219A>.
- Liao CH and Wells JM. 1986. Postharvest pathology and mycotoxins. Association of pectolytic strains of *Xanthomonas campestris* with soft rots of fruits and vegetables at retail markets. *Phytopathology*: 418-422. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n03\\_418.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1987Articles/Phyto77n03_418.pdf).
- Lindgren PB, Peet RC and Panopoulos NJ. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on non-host plants. *Journal of Bacteriology* 168: 512-522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213511/pdf/jbacter00204-0052.pdf>.
- Mannaa M, Park I and Seo YS. 2018. Genomic features and insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant-associated *Burkholderia* Species. *International of Molecular Sciences* 20:1-25. <http://doi.org/10.3390/ijms20010121>.
- Matuschek E, Brown DFJ and Kahlmeter G. 2014. Development of EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinic Microbiology and Infection* 20(4): O255-O266. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>.
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 49: 1176-1178. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001f>.
- Mirghasempour SA, Huang S and Xie GL. 2018. First report of *Burkholderia gladioli* causing rice panicle blight and grain discoloration in China. *The American Phytopathological Society (APS)*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0758-PDN>.
- Programa de Investigación en Salud Ocupacional (ROHP) de la Universidad de Boston. 2019. Consultado el 01 de diciembre de 2019. Disponible en <https://www.bu.edu/researchsupport/safety/rohp/agent-information-sheets/burkholderia-cepacia/>.
- Ranjan R, Chowdhary P and Kamra A. 2017. Community acquired *Burkholderia cepacia* bacteraemia presenting as MODS in an immunocompetent individual: An unusual case. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11(3):1-2. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2017/16285.9435>.
- Rodríguez CE. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(4): 990-991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242127/>.
- SAS. 2002. Statistical Automatic System Institute Inc. The SAS system for Windows version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Seo SY, Lim YJ, Park J, Kim S, Lee HH, Cheong H, Kim MS, Moon SJ and Hwang I. 2015. Comparative genome analysis of rice-pathogenic *Burkholderia* provides insight into capacity to adapt to different environments and hosts. *BioMed Central Genomics* 15 (349): 1-11. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1558-5>.
- Shaad N, Jones B and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *The American Phytopathological Society*. Third Edition.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> consultado el 25 de noviembre de 2019.
- Sousa SA, Ramos CG, Leitão JH. 2011. Review Article *Burkholderia cepacia* Complex: Emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. *International Journal of Microbiology*: 1-9. <http://doi.org/10.1155/2011/607575>.
- Tomich M, Herfst CA, Golden JW and Mohr CD. 2002. Role of flagella in host cell invasion by *Burkholderia cepacia*. *Infection and Immunity* 70(4): 1799-1806. <http://doi.org/10.1128/iai.70.4.1799-1806.2002>.
- Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, Friedman RL and Husong D. 2011. Review: *Burkholderia cepacia*: This decision is overdue, *PDA Journal Pharmaceutical Science and Technology* 65(5):535-543. <http://doi.org/10.5731/pdajpst.2011.00793>.
- Torres BAI, Cervantes DL, Núñez RF, Morales MA and Samaniego GBY. 2016. Primer reporte de *Pectobacterium* spp., asociada a *Opuntia ficus* en Baja California, México. *IDESIA Chile* 34 (4): 69-71. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v34n4/aop1516.pdf>.
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T and Arakawa M. 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. Microbiology and Immunology* 36(12): 1251-1275. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1992.tb02129.x>.