

Bioprospección de microorganismos de la zona Norte de Cartago con potencial de biocontrol de enfermedades postcosecha en cebolla (*Allium cepa*)

Bioprospecting microorganisms from the North of Cartago with potential for biocontrol of postharvest diseases in onion (*Allium cepa*)

Karla Aymerich-Picado¹, William Watson-Guido²,
Jaime Brenes-Madríz³, William Rivera-Méndez⁴

Aymerich-Picado, K; Watson-Guido, W; Rivera-Méndez, W. Bioprospección de microorganismos de la Zona Norte de Cartago con potencial de biocontrol de enfermedades postcosecha en cebolla (*Allium cepa*). *Tecnología en Marcha*. Vol. 35, especial V Encuentro Bienal Centroamericano y del Caribe de Investigación y Posgrado. Junio, 2022. Pág 32-39.

<https://doi.org/10.18845/tm.v35i6.6233>

1 Centro Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: karla.aymerich@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-9864-3850>

2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: wwatson@itcr.ac.cr

<https://orcid.org/0000-0002-2704-5159>

3 Escuela de Biología. Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr

<https://orcid.org/0000-0003-2325-8808>

4 Escuela de Biología, Insituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@itcr.ac.cr

<https://orcid.org/0000-0002-2065-6264>

Palabras clave

Antagonismo; antibiosis; control biológico; postcosecha.

Resumen

Esta investigación se enfocó en la búsqueda de una alternativa biológica para el control de enfermedades postcosechas en cebolla, para ello se aislaron 18 microorganismos de la superficie de la cebolla en fincas ubicadas en la zona Norte de Cartago, Costa Rica y se evaluó su capacidad de antibiosis contra los patógenos postcosecha *Penicillium* spp. y *Pseudomonas cepacia* como organismos modelos usando los métodos de cultivo dual e inhibición del crecimiento diferido. Se obtuvo que solo siete de los microorganismos aislados presentaron algún tipo de antibiosis contra los patógenos. Las bacterias tuvieron porcentajes de inhibición diferidas entre 28 y 44%, mientras que los hongos mostraron valores inferiores al 32%. Los aislamientos bacterianos se identificaron molecularmente como bacterias del género *Pseudomonas* sp, mientras que el hongo H2, que mostró mayor porcentaje de inhibición fue identificado como *Trichoderma* sp. Los cuatro aislamientos identificados molecularmente son potenciales antagonistas para biocontrol de enfermedades postcosecha en cebolla. Además, al haber sido aislados de la superficie de cebolla tiene mayores ventajas en campo que otros antagonistas que no hayan sido aislados del microbioma natural del cultivo.

Keywords

Antagonism; antibiosis; biological control; postharvest.

Abstract

This study aimed to search a biological alternative for the control of postharvest diseases in onions, for this, 18 microorganisms were isolated from the onion surface in farms located in the North of Cartago, Costa Rica. Their antagonistic activity was tested against postharvest pathogens *Penicillium* spp. and *Pseudomonas cepacia* as model organisms using dual culture and deferred growth inhibition methods. There were only seven of the microorganisms isolated with some type of antibiosis against the pathogens. Bacteria had deferred inhibition percentages between 28 and 44%, while fungi showed values lower than 32%. Bacterial isolates were molecularly identified in the genera *Pseudomonas* sp, while the fungus H2, which showed a higher percentage of inhibition, was identified as *Trichoderma* sp. The four molecularly identified isolates are potential antagonists for onion postharvest biocontrol. Furthermore, having been isolated from the onion surface, it has greater advantages in the field than other antagonists that have not been isolated from the natural microbiome of the crop.

Introducción

La cebolla (*Allium cepa* L) es un cultivo importante en Costa Rica, siendo la tercer hortaliza más cultivada y comercializada [1]. En la etapa final de su producción, se puede perder hasta un 30% del cultivo total debido a enfermedades postcosecha causadas por hongos y bacterias [2].

Actualmente, la industria de cebolla utiliza métodos físicos y químicos para evitar el desarrollo de patógenos postcosecha. En el primer caso, se usan mecanismos naturales (secado al sol), los cuales son poco eficientes, y artificiales (hornos), cuyo costo económico es alto, y disminuye la calidad del bulbo. Mientras que para los tratamientos químicos se utilizan fungicidas, los

cuales pueden generar efectos negativos en la salud del ser humano y en ambiente [3], y pueden ser motivo de rechazo para la exportación si no se cumplen con los límites de residuos químicos o si el agroquímico está prohibido por reglamentación [4].

Un abordaje novedoso es utilizar técnicas biológicas para la protección postcosecha, el cual usa biocontrol con microorganismos para la disminución de enfermedades causadas por fitopatógenos. A diferencia de las otras alternativas usadas en el mercado, esta posee las ventajas de ser una tecnología de bajo costo, y amigable para el ambiente [5]. No obstante, las investigaciones relacionadas a la etapa postcosecha en cebolla son escasas, solo se reporta la utilización de tres hongos: *Trichoderma harzianum* y *T. viride* en el control de *Botrytis alli* y el uso de *Penicillium spp* para el control de *Aspergillus niger* [6], [7], [8].

La búsqueda de nuevos microorganismos biocontroladores que permitan una solución real a los agricultores debe estar dirigido al desarrollo de un prototipo comercial. Para ello, en las primeras etapas de investigación es clave estudios con especies nativas de microorganismos aislados de la superficie del cultivo a tratar. Esto supone una ventaja en la colonización y supervivencia del organismo, lo que puede aumentar el éxito del tratamiento [9].

El objetivo principal de este trabajo fue aislar microorganismos de la superficie de la cebolla en fincas ubicadas en la zona Norte de Cartago en Costa Rica y evaluar su capacidad de antibiosis contra enfermedades postcosecha usando a *Penicillium spp.* y *Pseudomonas cepacia* como fitopatógenos modelo.

Metodología

Obtención de muestras de bulbos y hojas de cebolla

Se tomaron muestras de hojas y bulbos de dos fincas ubicadas en Llano Grande de Cartago. Para ello se seleccionaron las hojas externas de cuatro bulbos provenientes de campo, y el tallo de cuatro bulbos que se encontraban en las carpas de secado, se empaquetaron en bolsas con cierre hermético, y se pusieron en una hielera hasta su procesamiento.

Aislamiento y purificación de microorganismos

Se pesó 1g de tejido, y se maceró en 9 ml de agua destilada estéril en un tubo Falcon de 50 ml. Seguidamente, se tomó 1ml del líquido del macerado y se sembró por extensión en placas (9 cm de diámetro) con 20 ml de medios Agar Papa Dextros (PDA) acidificado (2% v/v ácido láctico) y Agar Nutritivo (AN), para el aislamiento de bacterias y hongos, respectivamente. Las placas se incubaron por dos días en el caso de las bacterias y cuatro días para los hongos 27 °C. Luego, se tomó cada colonia de las placas y se sembraron a 27 °C por separado en PDA o AN hasta obtener un cultivo puro.

Selección inicial de bacterias y hongos

Las bacterias obtenidas en la purificación se sometieron a la prueba de tinción Gram y se observaron al microscopio (100X). En el caso de los hongos, aplicó la tinción con azul de lactofenol para determinar su morfología al microscopio (40x). Se clasificaron los hongos por género basados en el manual Barnett & Hunter [10]. Después de ello, se eliminaron hongos patógenos reportados por Granados [2] y las bacterias con morfología de coco.

Pruebas de antibiosis

Se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* por triplicado en contra de los patógenos *Penicillium sp* y *P. cepacia*. En el caso de las pruebas de hongos contra *Penicillium sp* se utilizó una modificación de la metodología implementada por Astorga et al. [11]. Este cambio consistió en poner 50 µl de la solución de esporas del patógeno (concentrada a 1×10^7 conidios/ml) a 1.5 cm del borde de una placa Petri de 9,0 cm de diámetro y en el extremo contrario en línea recta se sembró una alícuota con 50 µl de la solución de esporas del potencial antagonista (concentrada a 1×10^7 conidios/ml) a 1.5 cm del borde de la placa. Para los aislamientos clasificados como *Penicillium sp*, se modificó la distancia entre el extremo de la placa y la alícuota por 3 cm debido a la lentitud del crecimiento. Todas las pruebas se incubaron a 27 °C por nueve días. El último día del ensayo se midió el porcentaje de inhibición radial, aplicando fórmula usada por Astorga et al. [11]:

$$PICR = \frac{(\text{diámetro de control patógeno} - \text{diámetro patógeno tratamiento}) * 100}{\text{diámetro del control patógeno}}$$

En las pruebas contra *Pseudomonas cepacia* se utilizó una modificación de la metodología desarrollada por Moran et al [12]. Para ello, se preparó un cultivo de 24 horas ($OD_{600}=0,3-0,4$) de los aislamientos bacterianos y se sembró 25 µl en el centro de una placa Petri (9 cm de diámetro) con Agar Nutritivo. Seguidamente, se dejó secar en cámara de flujo laminar por 40 minutos, y después se dejó crecer por 24 horas a 27°C. Al finalizar el tiempo de incubación se asperjó dos veces con cultivo líquido de *P. cepacia* ($OD_{600}=0,3-0,4$) y se dejó secar en cámara de flujo laminar por diez minutos. Al terminar este proceso, las placas fueron incubadas a una temperatura de 27°C por 48 horas. Para los aislamientos fúngicos, se realizó el mismo proceso, pero usando una solución de esporas (1×10^7 conidios/ml) para la inoculación en el centro de la placa. Al terminar la aspersion del patógeno, se dejó incubando por 5 días a 27°C.

Al finalizar las pruebas, se calculó el porcentaje de inhibición diferida (PID) usando la fórmula usada por Moran et al [12]:

$$PID = \frac{(\text{Diámetro total inhibición} - \text{Diámetro de microorganismo}) * 100}{\text{Diámetro total inhibición}}$$

Identificación molecular

Se extrajo el ADN de dos aislamientos bacterianos y un hongo los cuales mostraron el mayor porcentaje de inhibición contra los dos patógenos. En el caso de bacterias se usó el kit comercial The Wizard® Genomic DNA Purification Kit, según el protocolo del fabricante y para el hongo se implementó el protocolo usado por Watson [13]. El ADN obtenido fue almacenado a -70°C para análisis posteriores. La cuantificación y pureza del ADN extraído se obtuvo en el equipo NanoDrop™ Lite Spectrophotometer, donde se seleccionaron las muestras con una relación 260/280 entre los valores 1,8-2,0. Mientras que la integridad se determinó en un gel de agarosa al 1,5%(m/v) a un voltaje de 80 V por 30 min.

A partir del ADN extraído se amplificaron las regiones 16 S del ADN ribosomal aplicando la técnica de PCR usando el equipo Applied Biosystems Veriti™ thermal cycler. En el caso de bacterias se utilizaron los primers 534R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') y 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3), y con el siguiente programa: un ciclo de 95 °C durante 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 1 min, de 54 °C durante 1 min y de 70 °C durante 3 min; por último, un ciclo de 72 °C durante 8 min. Para el ADN de hongos se usó los primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3') y ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), con el

programa de termociclado: un ciclo de 95 °C durante 1 min, 30 ciclos de 95°C durante 1 min, de 55 °C durante 1 min y de 70 °C durante 3 min; por último, un ciclo de 72 °C durante 8 min. Al terminar los productos de PCR fue almacenados a -70°C para análisis posteriores.

La calidad de los productos se determinó en un gel de agarosa al 1,5%, voltaje de 80V por 30 min. Una vez que se observó una única banda clara en el producto de PCR, se mandó a secuenciar a Psomagen Inc, y los resultados se compararon con secuencias genéticas utilizando la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la herramienta BLAST para su alineamiento.

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA para determinar la diferencia estadística entre medias de los aislamientos en los resultados de antibiosis usando el programa estadístico Minitab 19.1.1.

Resultados y discusión

Aislamiento e identificación

Se obtuvieron 18 aislamientos bacterianos y fúngicos, en ambas fincas, sin embargo, después de la identificación y filtrado se eliminaron 10 microorganismos. Se conservaron los hongos identificados mediante microscopía óptica en los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* debido a que existe evidencia previa como biocontroladores en enfermedades postcosecha en cebolla [6], [8]. En el caso de las bacterias, se conservaron todos los aislamientos ya que previamente se han utilizado en formulaciones postcosechas en hortalizas como papa, camote y vainica [14], [15]. En el cuadro 1 se presenta un resumen de los microorganismos finales:

Cuadro 1. Aislamientos provenientes de hojas de budo de cebolla de la zona Norte de Cartago.

Código	Procedencia	Tipo microorganismo	Identificación morfológica al microscopio
B1	Campo	Bacteria	Cocobacillus
B2	Campo	Bacteria	Cocobacillus
B3	carpa	Bacteria	Cocobacillus
B4	carpa	Bacteria	Bacilus
H1	Campo	Hongo	Trichoderma
H2	Carpa	Hongo	Trichoderma
H4	Carpa	Hongo	Penicillium
H5	Campo	Hongo	Penicillium

Pruebas de antibiosis

Los resultados de antibiosis mostraron que solo siete de los aislamientos tuvieron algún tipo de antibiosis ante *P. cepacia* y *Penicillium sp.* Lo anterior implica que estos microorganismos produjeron algún metabolito antimicrobiano que disminuyó el crecimiento o actividades metabólicas de los fitopatógenos usados [16]. En el cuadro 2 se detalla los valores obtenidos para cada aislamiento:

Cuadro 2. Resumen de pruebas antibiosis de potenciales antagonistas ante los patógenos *Penicillium sp* y *P. cepacia*.

Código	<i>Penicillium</i> (% inhibición diferida, % inhibición radial*)	<i>Pseudomonas</i> (% inhibición diferida)
B1	38.12 ± 2.82 a	35.26 ± 8.62 a,b
B2	34.39 ± 9.90 a,b	28.20 ± 11.56 b,c
B3	NI**	44.05 ± 6.89 a
H1	9.95 ± 3.28* d,e	15.41 ± 4.46 c
H2	24.72 ± 4.59* b,c	32.50 ± 7.35 a,b
H3	5.77 ± 5.89* e	NI**
H4	18.58 7.46*c,d	NI**

*Medias con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferente según la prueba LSD de Fisher ($p < 0,005$)

**No mostró inhibición

Las bacterias fueron los aislamientos que mostraron la mayor inhibición del crecimiento ante los patógenos, ya que los valores obtenidos estuvieron en un rango entre 28 y 44%. Su identificación a nivel molecular coincidió con el género *Pseudomonas sp*, las cuales ya han reportado especies con capacidad de antibiosis ante patógenos postcosecha. Por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens* ha sido usado exitosamente en bioformulaciones para cultivos de papa [17]. Además, las cepas SC-10 ESC-11 de *Pseudomonas syringae* son el ingrediente activo de BioSave™, único formulado comercial postcosecha para aplicaciones en hortalizas (papa y camote) [18].

Los hongos mostraron la menor inhibición (menor al 30%) en comparación a las bacterias, no obstante, el aislamiento H2 tuvo la particularidad de ser estadísticamente igual a la bacteria con mayor inhibición (B1) en frente *P. cepacia*. El hongo H2 fue identificado molecularmente del género *Trichoderma*, según los alineamientos de BLAST, y con un 98.50 % de identidad con la especie *Trichoderma asperellum*, la cual ha sido reportado previamente en literatura como antagonista del patógeno poscosecha de cebolla: *Aspergillus niger* en condiciones *in vivo* [19].

La capacidad de antibiosis no es lo único que se debe de tener al escoger el antagonista, ya que su interacción con el patógeno afecta también a la composición del microbioma del bulbo y hojas [20]. Uno de los efectos que podría ser negativo a la cebolla si un antagonista es aislado de otros cultivos es la eliminación de los microorganismos benéficos del microbioma, ya que estos podrían ayudar al control de otros patógenos. Por tanto, los aislamientos de *Pseudomonas sp* y *T. asperellum* al ser aislados del microbioma natural, disminuyen las posibilidades de afectar de forma negativa al microbioma y por tanto posee un mayor potencial de eficacia para el control de enfermedades postcosecha [21].

Conclusiones

La composición del microbioma de las hojas de cebolla está compuesta por una diversidad de bacterias y hongos benéficos. Algunos de los microorganismos tienen potencial para disminuir las enfermedades postcosecha de cebolla.

Los aislamientos bacterianos del género *Pseudomonas sp*, y el aislamiento de *Trichoderma asperellum* tuvieron la mayor capacidad de producción de compuestos antimicrobianos ante los patógenos *Penicillium sp* y *P. cepacia*. Además, al haber sido aislado de la superficie de la

hoja de la cebolla posee mayores ventajas ante otros antagonistas que no hayan sido aislados del microbioma natural del cultivo. No obstante, para verificar su eficacia como una alternativa para los agricultores se debe evaluar su capacidad de biocontrol en experimentos sobre bulbos de cebolla en campo y el desarrollo de escalamiento y bioformulación de una o el conjunto de todos los microorganismos.

Referencias

- [1] K. López-Courrau, W. Rivera-Méndez, J. Brenes-Madriz y C. Zúñiga-Vega, "Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Setophoma terrestris* y *Fusarium* spp. provenientes de un cultivo de cebolla (*Allium cepa* L)", *Revista Tecnología en Marcha*, 2018. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3958>
- [2] M. Granados, Ed. *Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica, 2011.
- [3] M. K. Bansal, G. E. Boyhan y D. D. MacLean, «Effect of postharvest chemical treatments, heat curing, and refrigerated storage on marketability of short-day onions», *HortTechnology*, vol. 28, n.º 2, pp. 129–135, 2018. <https://doi.org/10.21273/horttech03903-17>
- [4] P. Kusstatscher, T. Cernava, A. Abdelfattah, J. Gokul, L. Korsten y G. Berg, "Microbiome approaches provide the key to biologically control postharvest pathogens and storability of fruits and vegetables", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 96, n.º 7, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa119>
- [5] M. Aamir *et al.*, "Microbial bioformulation-based plant biostimulants: a plausible approach toward next generation of sustainable agriculture", en *Microbial Endophytes*, Elsevier, 2020, pp. 195–225. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819654-0.00008-9>
- [6] I. Khokhar, M. S. Haider, I. Mukhtar y S. Mushtaq, "Biological control of *Aspergillus niger*, the cause of Blackrot disease of *Allium cepa* L. (onion), by *Penicillium* species", *Journal of Agrobiolgy*, vol. 29, n.º 1, pp. 23–28, 2012. <https://doi.org/10.2478/v10146-012-0003-5>
- [7] V. Kumar, S. S. Neeraj y N. A. Sagar, "Post Harvest Management of Fungal Diseases in Onion - A Review.", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 4, n.º 6, pp. 737–752, 2015.
- [8] N. Santiago, B. Roderos y G. F., "Santiago, N., Roderos, B., & Gallema, F. (2018). Management of pre and postharvest diseases in bulb onions through *Trichoderma harzianum* rifai utilization", *Asian Journal of Postharvest and Mechanization*, vol. 1, n.º 1, pp. 81–92, 2018.
- [9] M. Reyes-Estebanez *et al.*, "Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens", *Biological Control*, vol. 141, p. 104127, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104127>
- [10] H. L. Barnett y B. B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4ª ed. American Phytopathology Society Press., 1998.
- [11] K. Astorga-Quirós, K. Meneses-Montero, C. Zúñiga-Vega, J. Brenes-Madriz y W. Rivera-Méndez, "Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo", *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 27, n.º 2, p. 82, 2014. <https://doi.org/10.18845/tm.v27i2.1929>
- [12] J. C. Moran, E. L. Crank, H. A. Ghabban y M. J. Horsburgh, «Deferred Growth Inhibition Assay to Quantify the Effect of Bacteria-derived Antimicrobials on Competition», *Journal of Visualized Experiments*, n.º 115, septiembre de 2016. Accedido el 2 de noviembre de 2021. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.3791/54437>
- [13] W. Watson, "Caracterización molecular y bioquímica de mutantes M3 de arroz (*Oryza sativa indica* L. VAR. CR5272) en condiciones de estrés salino.", Tesis maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, 2019.
- [14] Y. Li, Y. Cai, Y. Liang, P. Ji y L. Xu, "Assessment of antifungal activities of a biocontrol bacterium BA17 for managing postharvest gray mold of green bean caused by *Botrytis cinerea*", *Postharvest Biology and Technology*, vol. 161, p. 111086, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111086>
- [15] D. Spadaro y S. Droby, "Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists", *Trends in Food Science & Technology*, vol. 47, pp. 39–49, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.003>
- [16] J. Köhl, R. Kolnaar y W. J. Ravensberg, "Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy", *Frontiers in Plant Science*, vol. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>

- [17] M. Vatankhah, R. S. Riseh, M. M. Eskandari, E. Sedaghati, H. Alaei y H. Afzali, "Biological control of fusarium dry rot of potato using some probiotic bacteria", *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 21, n.º 5, pp. 1301–1312, 2019.
- [18] J. A. Anderson, J. Staley, M. Challender y J. Heuton, "Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops", *Transgenic Research*, vol. 27, n.º 1, pp. 103–113, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0061-6>
- [19] B. K. Prajapati y R. K. Patil, "Bio-Efficacy of *Trichoderma* Spp. And its Liquid Culture Filtrate on Mycelial Growth and Management of Onion Black Mould Rot (*Aspergillus niger*) *in Vitro* and *in Vivo*", *Indian Phytopathology*, vol. 70, n.º 1, 2017. <https://doi.org/10.24838/ip.2017.v70.i1.48989>
- [20] C. Sánchez-Cañizares, B. Jorrín, P. S. Poole y A. Tkacz, "Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome", *Current Opinion in Microbiology*, vol. 38, pp. 188–196, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.001>
- [21] M. d. C. Orozco-Mosqueda, M. d. C. Rocha-Granados, B. R. Glick y G. Santoyo, "Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms", *Microbiological Research*, vol. 208, pp. 25–31, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>