



## Coinfecciones bacterianas en el tizón foliar y pudrición del bulbo en cebolla (*Allium cepa* L.)<sup>1</sup>

### Bacterial coinfections on foliar blight and bulb rot in onion (*Allium cepa* L.)

Juan Carlos Jiménez-Acero<sup>2</sup>, Rosa Raybaudi-Massilia<sup>3</sup>, Adriana González-Almario<sup>2</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 25 de agosto, 2022. Aceptación: 2 de noviembre, 2022. Trabajo de pregrado financiado por la Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- <sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Sede Bogotá, Colombia. [jucjimenezac@unal.edu.co](mailto:jucjimenezac@unal.edu.co) (<https://orcid.org/0000-0002-5764-4101>); [adgonzalezal@unal.edu.co](mailto:adgonzalezal@unal.edu.co) (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0003-2261-8912>).
- <sup>3</sup> Universidad Central de Venezuela, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Caracas, Venezuela. [rosa.raybaudi.massilia@gmail.com](mailto:rosa.raybaudi.massilia@gmail.com) (<https://orcid.org/0000-0001-6200-2819>).

## Resumen

**Introducción.** La cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) es una hortaliza que se caracteriza por sus escamas carnosas susceptibles al ataque de fitopatógenos que causan pérdidas económicas. Los síntomas de tizón foliar y la pudrición del bulbo, pueden ser causados por diferentes géneros y especies bacterianas que pueden coinfectar al hospedante, lo que dificulta la identificación del agente causal. **Objetivo.** Evaluar el efecto de coinfecciones bacterianas en el tizón foliar y la pudrición del bulbo en cebolla. **Materiales y métodos.** Las bacterias fueron aisladas de plantas de cebollas con síntomas de tizón foliar y pudrición de bulbos, provenientes de cultivos ubicados en Choachí Cundinamarca, Colombia, recolectadas en junio de 2018. Los aislamientos bacterianos se purificaron, identificaron e inocularon de manera individual y en mezcla en hojas y bulbos de cebolla sanos. Se evaluaron seis tratamientos por órgano: tres con infecciones individuales y tres con coinfección. El progreso de la lesión se midió en ambos órganos durante doce días después de la inoculación. **Resultados.** Se obtuvieron dos especies bacterianas identificadas como *Pantoea ananatis* y *Rahnella aquatilis* a partir de los síntomas foliares y del bulbo de cebolla. En las infecciones individuales, la cepa *P. ananatis* presentó la mayor virulencia con un 34,29 % de daño en el bulbo y un 100 % en hoja, mientras que *R. aquatilis* generó el menor porcentaje de pudrición en el bulbo (8,87 %) y no produjo tizón. En las coinfecciones, la combinación de *P. ananatis* y *R. aquatilis* produjo los menores porcentajes de daño en el bulbo (15 %) y en la hoja (10 %), asociada a una disminución de la expresión de los síntomas. **Conclusiones.** *R. aquatilis* actuó como organismo antagonista de *P. ananatis* y provocó un retraso en el desarrollo de los síntomas de tizón foliar y pudrición del bulbo en cebolla.

**Palabras claves:** *Pantoea ananatis*, *Rahnella aquatilis*, antagonismo, patogenicidad.

## Abstract

**Introduction.** The onion bulb (*Allium cepa* L.) is a cultivated vegetable characterized by its fleshy scales susceptible to phytopathogen attacks causing economic losses. The symptoms of foliar wilting, blighting, and rot of



bulb can be caused by different genera and bacterial species that can co-infect the host, making it difficult to identify the causal agent. **Objective.** To evaluate the effect of bacterial co-infections on foliar wilt and bulb rot in onion. **Materials and methods.** The bacteria were isolated from onion plants with symptoms of leaf blight and bulb rot, from crops located in Choachí Cundinamarca, Colombia, collected in June 2018. Bacterial isolates were purified, identified, and inoculated individually and in a mixture on healthy onion leaves and bulbs. Six treatments per organ were evaluated: three with individual infections and three with co-infection. The lesion progress was measured in both organs for twelve days after inoculation. **Results.** Two bacterial species identified as *Pantoea ananatis* and *Rahnella aquatilis* were obtained from the foliar and bulb symptoms. In individual infections, the *P. ananatis* strain presented the highest virulence causing 34.29 % bulb damage, and 100 % leaf damage, while the *R. aquatilis* generated the lowest percentage of rotting in the bulb (8.87 %) and it did not produce wilt. In co-infections, the combination of *P. ananatis* and *R. aquatilis* produced the lowest percentages of bulb (15 %) and leaf (10 %) damage, associated with a decrease in the symptom's expression. **Conclusion.** *R. aquatilis* acted as an antagonistic organism of *P. ananatis* and causes a delay in the development of foliar wilt and bulb rot symptoms in onion.

**Keywords:** *Pantoea ananatis*, *Rahnella aquatilis*, antagonism, pathogenicity.

## Introducción

La cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) es una de las hortalizas más consumidas a nivel mundial, con un consumo per cápita de 11 kg (Gateri et al., 2018) y con una producción de 290 640 toneladas en Colombia para el año 2020 (Agronet, 2020). Esta planta presenta un tejido foliar delgado, el cual almacena una gran cantidad de fotoasimilados y agua que propician el crecimiento y la reproducción de plagas y microorganismos. Asimismo, el bulbo se caracteriza por presentar unas escamas carnosas conocidas como catáfilos, susceptibles al ataque de fitopatógenos.

El diagnóstico de las enfermedades bacterianas asociadas a cebolla de bulbo ha crecido gracias a las nuevas tecnologías y a la actualización taxonómica de patógenos, lo cual ha permitido una identificación de los diferentes agentes causales de manera más precisa (Lau & Botella, 2017).

En Colombia, la única enfermedad bacteriana reportada en cebolla es la pudrición blanda generada por *Pectobacterium carotovorum* y *Dickeya chrysanthemi* (Instituto Colombiano Agropecuario, 2012; Zaid et al., 2012). Sin embargo, a nivel mundial son varias las enfermedades bacterianas reportadas, tales como el tizón foliar generado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *alli* (Thu Nga et al., 2021), piel agria por *Burkholderia cepacia* (Tsuiji & Kadota, 2020), la hoja rayada y pudrición de bulbo por *Pseudomonas viridiflava* (Tsuiji & Shinichi, 2021), la piel resbaladiza por *Burkholderia gladioli* pv. *alliicola* (Lee et al., 2016) y la pudrición central del bulbo atribuida a diferentes especies del género *Pantoea*, como *P. ananatis* (Gitaitis & Gay, 1997), *P. agglomerans* (Edens et al., 2006), *P. alli* (Brady et al., 2011) y *P. stewartii* subsp. *indologenes* (Stumpf et al., 2018).

Algunas de las enfermedades en plantas pueden brindar dinamismo de la enfermedad en el hospedero (Susi et al., 2015). Estas asociaciones de microorganismos son diversas y pueden ocurrir entre bacterias y virus (Jia et al., 2017; Metzger & Sun, 2013; Spoel et al., 2007), bacterias y hongos (Abdullah et al., 2017) y entre especies diferentes de bacterias (Limoli et al., 2016; Yin et al., 2017), las cuales pueden llegar a producir cambios en la sintomatología y también a generar diagnósticos errados.

Para el caso de cebolla de bulbo, se han reportado diferentes géneros y especies bacterianas asociadas con la pudrición central del bulbo y es posible que esta sea generada por coinfecciones en las que diferentes especies de *Pantoea* y otros géneros puedan estar implicados (Tsuiji & Kadota, 2020). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de coinfecciones bacterianas en el tizón foliar y la pudrición del bulbo en cebolla.

## Materiales y métodos

### Obtención de muestras y cultivos puros

Plantas de cebollas Yellow Granex (*Allium cepa* L.) recolectadas en junio de 2018, provenientes de cultivos ubicados en Choachí Cundinamarca, Colombia, con síntomas de tizón foliar y pudrición de bulbo, se extrajeron del suelo sin desprender raíces ni hojas. Cada órgano afectado fue sometido a un registro fotográfico.

El material fue trasladado al Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá y las muestras se procesaron según el avance del síntoma y el órgano afectado (hoja y bulbo). La desinfección se realizó a partir de explantes de 3 mm que comprendían tejido sano y enfermo, los cuales se sumergieron en una solución de etanol al 70 % durante 30 s, seguido de hipoclorito de sodio al 2 % por 30 s y tres lavados con agua destilada estéril por 1 min. Luego, el tejido se maceró en un mortero con un mazo estéril, se sembró la suspensión por agotamiento con un asa bacteriológica en cajas de Petri con agar nutritivo (AN) y se incubaron a 30 °C en completa oscuridad. Luego de 48 h, se seleccionaron colonias de distintas morfologías y se transfirieron a nuevas cajas con AN para obtener cultivos puros.

### Caracterización morfológica, patogénica y bioquímica de los aislamientos bacterianos

Se realizó una descripción morfológica detallada de las colonias de acuerdo con su color, forma, tamaño, borde, superficie, elevación y consistencia (Chen & Liu, 2019). Para seleccionar las colonias que correspondiesen a bacterias fitopatógenas, se realizó una prueba de patogenicidad y para ello, cada aislamiento fue ajustado a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (calculada mediante densidad óptica de 0,3 a 600 nm con un espectrofotómetro X-ma 1000-Human Corporation) de acuerdo con Dutta et al. (2014). Luego, 20  $\mu$ L de cada aislamiento se inyectaron en dos puntos equidistantes por bulbo de cebolla, se desinfectaron con 10 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 15 min, se lavaron con agua destilada estéril y secaron con toallas de papel esterilizadas.

Los bulbos inoculados se dispusieron en condiciones de cámara húmeda y durante dos semanas se monitorearon hasta observar síntomas de pudrición alrededor del punto de inoculación. A partir de las lesiones generadas, se realizaron aislamientos bacterianos por medio de la metodología antes descrita, seguido de una caracterización macroscópica de las colonias, microscópica de las bacterias por medio de tinción de Gram y de la respuesta bioquímica de estas mediante las pruebas de Hugh y Leifson, Oxidasa, TSI (del inglés Triple- Sugar-Iron), producción de pigmentos amarillos en medio YDC, sulfuro indol motilidad (SIM), actividad ureasa, producción de pigmento fluorescente en medio King B (KB) y capacidad de la degradación de papa (AP), todo de acuerdo con Schaad et al. (2001).

### Extracción de ADN e identificación molecular

A partir de cultivos puros crecidos en caldo nutritivo (CN) por 12 h, se realizó la extracción de ADN de acuerdo con el procedimiento descrito por Chen y Kuo (1993). Luego, a partir de 2  $\mu$ L del ADN bacteriano obtenido, se realizó la amplificación por PCR de la región 16S del ARNr en 15  $\mu$ L de una reacción que contenía 1X de Buffer, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,32  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de dNTPs y 0,8 U de Taq polimerasa (Barghouthi, 2011).

Con el fin de identificar a nivel de especie cada uno de los aislamientos, también se amplificaron los genes conservados de enterobacterias *pyrG*, *fusA*, *rplB* y *rpoB*, de acuerdo con las condiciones descritas en el Cuadro 1. Los productos de PCR, tanto de la región amplificada del 16S ARNr como de los genes conservados, se purificaron,

**Cuadro 1.** Genes y condiciones de amplificación utilizadas para la identificación de las especies bacterianas asociadas con la pudrición de bulbo y tizón foliar de cebolla (*Allium cepa* L.). Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Junio, 2018.

**Table 1.** Genes and amplification conditions used for the identification of bacterial species associated with bulb rot and leaf blight of onion (*Allium cepa* L.). Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. June, 2018.

Genes	Secuencia de oligonucleotidos (5'-3')		Condiciones	Referencia
	Directo	Reverso		
<i>16S</i>	CCAGCAGCCGCGG TAATAC	GGCTACCTTGTTAC GACTTC	90 s 94 °C, 35 s 50 °C, 105 s 72 °C (33 ciclos); 5 min 72 °C	(Barghouthi, 2011)
<i>pyrG</i>	GGGGTCGTATCCTCT CTGGGTAAAGG	GGAACGGCAGGGATT CGATATCNCKA	2 min 94 °C; 1 min 94 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C (10 cycles); 1 min 94 °C, 1 min 50 °C, 1 min 72 °C (21 ciclos); 5 min 72 °C	(Delétoile et al., 2009)
<i>fusA</i>	CATCGGTATCAGTG CKCACATCGA	CAGCATCGCCTGAAC RCCTTTGTT		
<i>rplB</i>	CAGTTGTTGAACG TCTTGAGTACGATCC	CACCACCACCATG YGGGTGRTC		
<i>rpoB</i>	GGCGAAATGGCW GAGAACCA	GAGTCTTCGAAGTTGT AACC	4 min 94 °C; 30 s 94 °C, 30 s 50 °C, 30 s 72 °C (30 ciclos); 5 min 72 °C	(Delétoile et al., 2009)

secuenciaron y analizaron mediante el programa Bioedit. Finalmente, las secuencias se compararon contra la base de datos disponible en el GenBank, con el algoritmo Blastn.

### Pruebas de patogenicidad

Se seleccionaron los aislamientos bacterianos que produjeron pudrición en bulbos de cebolla y que fueron identificados a nivel bioquímico y molecular, para evaluar su patogenicidad en bulbos y hojas de plantas sanas de cebolla Yellow Granex de 60 días posterior a la germinación.

Una cepa de *P. ananatis* caracterizada y secuenciada, aislada de hojas de cebolla de bulbo con síntomas de pudrición y tizón, proveniente de Une, otro municipio de Cundinamarca, fue utilizada como control positivo (CP) y el agua destilada estéril como control negativo. En total se evaluaron seis tratamientos por órgano: tres infecciones individuales y tres en coinfección, tanto en hojas como en bulbos, los análisis se realizaron por duplicado.

Para los tratamientos individuales, cada bulbo de cebolla se desinfectó según la metodología descrita y se inoculó con 500  $\mu$ L de una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), obtenida a partir de cada cultivo puro. El inóculo se inyectó con una jeringa de 1 mL por ambos costados del bulbo (250  $\mu$ L) y en una posición equidistante entre los puntos de inoculación. Para ello, se usaron dos bulbos por tratamiento.

Las hojas de las plántulas de cebolla fueron inoculadas al infiltrar 50  $\mu$ L de la suspensión bacteriana a la misma concentración ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) y a una distancia de 5 cm del cuello de la plántula. Se inocularon tres hojas por planta de cebolla y se usaron dos plantas por tratamiento.

Para las pruebas de coinfecciones, se usó la misma metodología que para las pruebas individuales, con la diferencia que cada inoculación se hizo con una mezcla conformada por una suspensión de un par de cultivos bacterianos (cada aislado bacteriano obtenido durante este trabajo y el CP), a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL cada uno. Un volumen total de 500  $\mu$ L fue inoculado en bulbo y 50  $\mu$ L en hojas.

Los bulbos inoculados se mantuvieron en cámara húmeda en recipientes plásticos transparentes cubiertos para evitar contaminación externa y se ubicaron en el laboratorio por 12 días para su evaluación. Para las plántulas se

generó una cobertura con una bolsa plástica alrededor de cada una de ellas para aumentar la humedad relativa y se colocaron en un invernadero (18 °C y 70 % humedad relativa) por el mismo tiempo. En ambos casos se realizaron observaciones a los 2, 5, 6, 8 y 12 días después de inoculación (dpi), para llevar un registro de los síntomas detectados. Aquellos que presentaron daños en el tejido se procesaron a los 12 dpi para re-aislar los agentes bacterianos.

### Determinación de la concentración de bacterias 12 días posteriores a la inoculación

Con el fin de determinar el comportamiento de las poblaciones bacterianas en el material vegetal infectado, se realizó el aislamiento y el conteo de bacterias a partir de cada muestra. Para esto, se maceraron explantes de 1 cm<sup>2</sup> de hojas y bulbos en tubos plásticos de 1,5 mL y 200 µL del macerado fueron diluidos en 800 µL de agua destilada estéril. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas en secuencia 1:10 hasta la dilución 10<sup>-4</sup>; 100 µL de las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> se sembraron en cajas de Petri con AN por duplicado y por tratamiento. Posterior a la incubación a 28 °C por 48 h, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado (UFC/cm<sup>2</sup>).

### Evaluación de la enfermedad

Los porcentajes de daño, tanto en bulbos como en hojas, fueron determinados y analizados al comparar entre tiempos (2, 5, 6, 8 y 12 dpi) y entre tratamientos (inoculación individual y coinfección). El área total afectada para cada tratamiento se calculó por medio del programa ImageJ. Para ello, se tomó un registro fotográfico en los tiempos establecidos en la metodología y se calculó el porcentaje de afectación total en bulbo (ecuación 1) y hoja (ecuación 2).

$$\% \text{ Afectación total en bulbo} = \frac{\sum \frac{a1 + b1}{2} + \frac{a2 + b2}{2}}{n1} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\% \text{ Afectación total en hoja} = \frac{\sum H1 + H2 + H3}{n2} \quad (\text{Ec. 2})$$

a1 = porcentaje de afectación del costado *a* en la cebolla 1.

b1 = porcentaje de afectación del costado *b* en la cebolla 1.

a2 = porcentaje de afectación del costado *a* en la cebolla 2.

b2 = porcentaje de afectación del costado *b* en la cebolla 2.

H1 = porcentaje de afectación de la hoja 1.

H2 = porcentaje de afectación hoja 2.

H3 = porcentaje de afectación hoja 3.

n1 = número de bulbos inoculados por tratamiento.

n2 = número de hojas inoculadas por tratamiento.

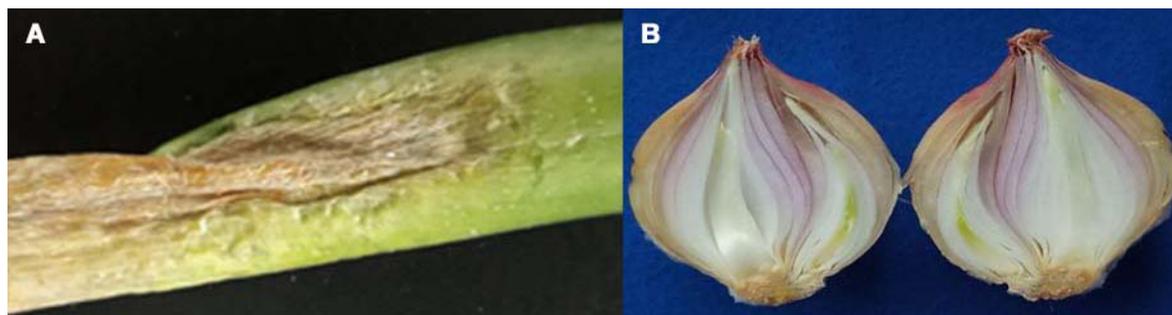
### Diseño experimental y análisis estadístico

Para las pruebas de patogenicidad se empleó un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue la mitad de un bulbo y una hoja de cebolla. Se realizaron cuatro y seis repeticiones en bulbos y hojas, respectivamente. Para determinar las diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos y entre los tiempos del experimento, se aplicó un ANOVA multifactorial, seguido de una prueba de Tukey, los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS® 9.2.1 (Vasseur-Coronado et al., 2020).

## Resultados

### Obtención de las muestras

Las plantas de cebolla seleccionadas presentaron síntomas asociados a tizón foliar y pudrición de bulbo. Las hojas presentaron lesiones deprimidas con tejido necrosado de color marrón claro, de aspecto acuoso dentro de la lámina, rodeadas de una zona clorótica (Figura 1A). En estados avanzados de la enfermedad, las lesiones aumentaron su tamaño de manera longitudinal y produjeron una necrosis general del tejido y una apariencia seca de la lámina foliar que condujo al colapso de la hoja.



**Figura 1.** Registros fotográficos de la sintomatología encontrada en hoja y bulbo de cebolla (*Allium cepa* L.). (a) Hoja con lesión necrótica deprimida de color marrón claro, con centro acuoso y rodeado de un halo clorótico. (b) Interior de un bulbo de cebolla con catáfilos con pudrición parda y acuosa. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

**Figure 1.** Photographic records of the symptoms found in onion (*Allium cepa* L.) leaves and bulbs. (a) Leaf with a light-brown depressed necrotic lesion, light brown, with a watery center, and surrounded by a chlorotic halo. (b) Internal part of the onion bulbs with brown and watery cataphylls. Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

Los bulbos presentaron necrosis en la base del tallo de la planta y al hacer un corte longitudinal de estos se apreció una pudrición de color parda y acuosa en los catáfilos internos (Figura 1B). En estados avanzados de la enfermedad varias muestras presentaron crecimiento fúngico.

### Identificación morfológica, bioquímica y molecular

A partir de las muestras afectadas, se obtuvieron trece aislamientos (siete de bulbos y seis de hojas) con características macroscópicas diferentes. De esos trece, un aislamiento de bulbo (B1B) y dos de hoja (cepa H6A, H5A) generaron síntomas de pudrición en los catáfilos de cebolla en las pruebas de patogenicidad. Estos tres aislamientos presentaron un perfil bioquímico característico de enterobacterias (Cuadro 2).

A nivel molecular, mediante MLSA de la región 16S rRNA y genes conservados (*pyrG*, *fusA*, *rplB*, *rpoB*), los aislamientos patogénicos fueron identificados como *Pantoea ananatis* (H6A) y *Rahnella aquatilis* (B1B y H5A) (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Resultados de pruebas bioquímicas de los aislamientos obtenidos de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) con tizón foliar y bulbos con pudrición. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

**Table 2.** Biochemical outcomes of the isolates from onion (*Allium cepa* L.) plants with foliar blight and rot bulb. Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

Procedencia de la muestra	Cepa	Síntoma en el órgano aislado	Caracterización morfológica de la colonia en AN		T. Gram	H&L	Pigmento de colonia en YDC	TSI	SIM
Choachí	H5A	Lesión foliar deprimida, de color pajizo y con halo clorótico, en forma de diamante en dirección descendente al bulbo	Color Blanca Forma Circular Borde Entero Elevación Convexa	Tamaño pequeña Superficie lisa Aspecto brillante Consistencia Butirosa	Negativo	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup> AF	Blanco	A/A gas	Sulfuro (-) Móvil (-) Indol (-)
	H6A	Lesión foliar deprimida, de color pajizo y con halo clorótico en forma de diamante en dirección descendente al bulbo	Color Amarilla Forma Circular Borde Entero Elevación Convexa	Tamaño mediana Superficie lisa Aspecto brillante Consistencia Butirosa	Negativo	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup> AF	Amarillo	A/A	Sulfuro (-) Móvil (-) Indol (+)
Une	B1B	Pudrición húmeda de color pardo, inodora, que inició en el ápice del bulbo y descendió por los catáfilos externos de este.	Color blanca Forma circular Borde entero Elevación Convexa	Tamaño pequeña Superficie lisa Aspecto brillante Consistencia Butirosa	Negativo	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup> AF	Blanco	A/A gas	Sulfuro (-) Móvil (-) Indol (-)
	CP (Control positivo)	Lesión foliar deprimida con halo clorótico de forma alargada, aspecto acuoso y centro necrótico que se extendió en ambas direcciones a lo largo de la hoja.	Color amarilla Forma circular Borde entero Elevación convexa	Tamaño mediana Superficie lisa Aspecto brillante Consistencia Butirosa	Negativo	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup> AF	Amarillo	A/A	Sulfuro (-) Móvil (-) Indol (+)

Agar nutritivo (AN), Prueba Hugh y Leifson (H&L), O<sup>+</sup>/F<sup>+</sup> (oxidación positiva/fermentación positiva), AF (anaerobia facultativa), medio extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC), medio triple azúcar-hierro (TSI), acidificación del medio (A/A) y medio sulfuro-indol-motilidad (SIM). / Nutrient agar (AN), Hugh and Leifson (H&L) test, O<sup>+</sup>/F<sup>+</sup> (positive oxidation/positive fermentation), AF (anaerobic facultative), yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC) medium, triple sugar-iron (TSI) medium, acidification of the medium (A/A), and sulfide-indole-motility (SIM) medium.

**Cuadro 3.** Identificación molecular de los aislamientos patogénicos en cebolla (*Allium cepa* L.). Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

**Table 3.** Molecular identification of pathogenic isolates in onion (*Allium cepa* L.). Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

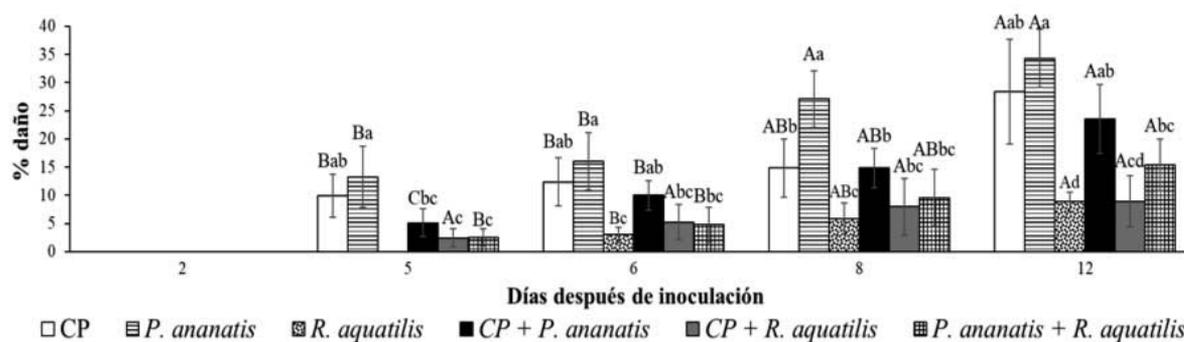
Cepa	Genes				
	<i>I6s</i>	<i>pyrG</i>	<i>fusA</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>
H6A	<i>P. ananatis</i> (99 %)	<i>P. ananatis</i> (95 %)	<i>P. ananatis</i> (95 %)	<i>P. ananatis</i> (98,1 %)	<i>P. ananatis</i> (97,7 %)
H5A	<i>R. aquatilis</i> (99 %)	<i>R. aquatilis</i> (96 %)	<i>R. aquatilis</i> (96 %)	<i>R. aquatilis</i> (99 %)	NA
B1B	<i>R. aquatilis</i> (100 %)	<i>R. aquatilis</i> (96 %)	<i>R. aquatilis</i> (96 %)	<i>R. aquatilis</i> (98 %)	NA
CP	<i>P. ananatis</i> (99 %)	<i>P. ananatis</i> (99 %)	<i>P. ananatis</i> (99 %)	<i>P. ananatis</i> (99 %)	<i>P. ananatis</i> (99 %)

No amplifica (NA) / Does not amplify (NA).

### Pruebas de patogenicidad en bulbos

Los bulbos inoculados de manera individual con cada uno de los aislamientos presentaron los mayores porcentajes de daño en comparación con aquellos coinfectados con dos cultivos bacterianos, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamientos. La cepa de *P. ananatis* H6A aislada durante este estudio causó el mayor porcentaje de daño (34 %), seguido de *P. ananatis* CP (28 %), *R. aquatilis* B1B (9 %) y *R. aquatilis* H5A (3,7 %).

Para las pruebas de coinfección, se seleccionó la cepa de *R. aquatilis* con mayor virulencia, es decir, la cepa B1B en comparación con la cepa H5A. Las combinaciones de *R. aquatilis* B1B con *P. ananatis* (H6A y CP) generaron un menor daño. La menor severidad se observó con la coinfección *R. aquatilis* B1B y *P. ananatis* H6A (15,3 %), seguida de la combinación *R. aquatilis* B1B con *P. ananatis* CP (17,3 %). Además, se evidenció que la mezcla *P. ananatis* CP con *P. ananatis* H6A, generó un menor porcentaje de daño (23,5 %) en comparación con las inoculaciones individuales (Figura 2).



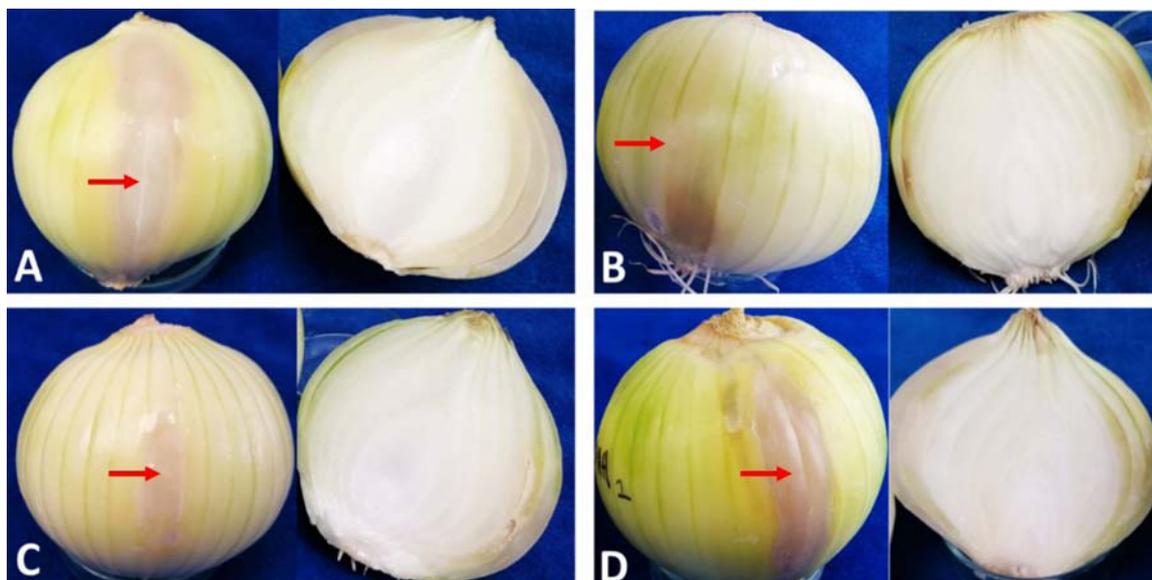
**Figura 2.** Porcentaje de área afectada en bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) para cada tratamiento según el tiempo en días después de la inoculación. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

Control positivo de *P. ananatis* (CP). Se aplicó un ANOVA multifactorial, seguido de una prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) con el programa SAS. Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre tiempos.

**Figure 2.** Percentage of the affected area in onion (*Allium cepa* L.) bulbs for each treatment according to time in days after inoculation. Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

Positive control of *P. ananatis* (CP). A multifactorial ANOVA was done, followed by a Tukey test ( $p \leq 0,05$ ) using the SAS program. Lower case letters indicate statistically significant differences between treatments. Higher case letters indicate statistically significant differences between times.

En el último tiempo de evaluación (12 dpi), los bulbos de cebolla presentaron una pudrición de color marrón y de apariencia húmeda alrededor de cada punto de inoculación. Luego, a cada bulbo se le efectuó un corte longitudinal para evaluar el desarrollo de la lesión en su interior (Figura 3).



**Figura 3.** Vista frontal y corte longitudinal de bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) a los 12 días posterior a la inoculación. (A) inoculación con *P. ananatis* (H6A). (B) inoculación con *R. aquatilis* (B1B). (C) coinfección con *P. ananatis* (H6A) + *R. aquatilis* (B1B). (D) inoculación con *P. ananatis* (CP). Las flechas indican el punto de inoculación. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

**Figure 3.** Front view and longitudinal section of onion (*Allium cepa* L.) bulbs 12 days after inoculation. (A) Inoculation with *P. ananatis* (H6A). (B) inoculation with *R. aquatilis* (B1B). (C) coinfection with *P. ananatis* (H6A) + *R. aquatilis* (B1B). (D) inoculation with *P. ananatis* (CP). Arrows indicate the point of inoculation. Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018).

Con respecto a las características de los síntomas observados en bulbos de cebolla, *P. ananatis* causó una lesión externa de coloración marrón que iba desde el punto de inoculación hasta los extremos del bulbo, lo que generó una pudrición húmeda de coloración parda homogénea (Figura 3A). *R. aquatilis* ocasionó una lesión necrótica más limitada en su extensión, de color marrón oscuro, con apariencia y coloración heterogénea; además, generó espacios vacíos entre los catáfilos en la zona donde se inoculó (Figura 3B). Para el caso de la coinfección con *R. aquatilis* y *P. ananatis*, se observó una disminución del área afectada del bulbo (Figura 3C). Con respecto a la concentración bacteriana recuperada de los bulbos a los 12 dpi para cada tratamiento, en las inoculaciones individuales, el control positivo y *P. ananatis* mostraron una mayor concentración a diferencia de *R. aquatilis* que mostró un menor recuento. En las coinfecciones de *P. ananatis* con *R. aquatilis* se encontró una disminución en las poblaciones de *P. ananatis*, mientras que las poblaciones de *R. aquatilis* aumentaron en comparación con los tratamientos individuales (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Promedio de recuentos bacterianos en bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.), doce días posteriores a la inoculación. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

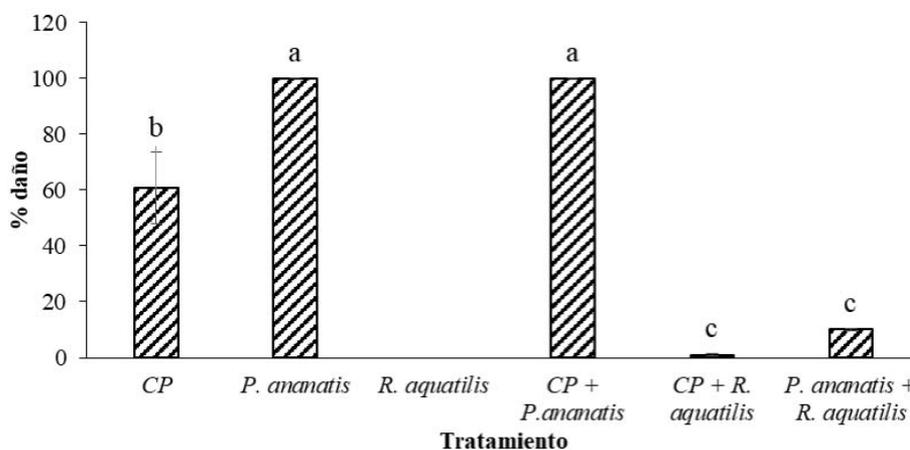
**Table 4.** Average bacterial counts in onion (*Allium cepa* L.) bulbs, twelve days after inoculation. Plant Health Laboratory of the Agricultural Sciences, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

Tratamiento	CP	<i>P. ananatis</i>	<i>R. aquatilis</i>	<i>P. ananatis</i> + CP	CP + <i>R. aquatilis</i>	<i>P. ananatis</i> + <i>R. aquatilis</i>
Recuento bacteriano UFC/cm <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	9,9x10 <sup>5</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	8,5x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>4</sup> + 3,6x10 <sup>7</sup>	1,5x10 <sup>4</sup> + 1,1x10 <sup>6</sup>

CP = control positivo de *P. ananatis*. Las concentraciones bacterianas para los tratamientos de coinfección se muestran en el mismo orden de los aislamientos indicados en la fila superior. / CP = positive control of *P. ananatis*. Bacterial concentrations for coinfection treatments are shown in the same order as the isolates indicated in the top row.

### Pruebas de patogenicidad en hojas

En la inoculación individual se observó que *P. ananatis* generó el mayor porcentaje de área foliar afectada (93 %), seguido del control positivo (60,9 %), mientras que *R. aquatilis* no ocasionó ninguna lesión. En coinfecciones se observó una disminución en el porcentaje de área afectada cuando *R. aquatilis* se inoculó en conjunto con el control positivo (1,01 %) o con *P. ananatis* (10,02 %), como se observa en la Figura 4.



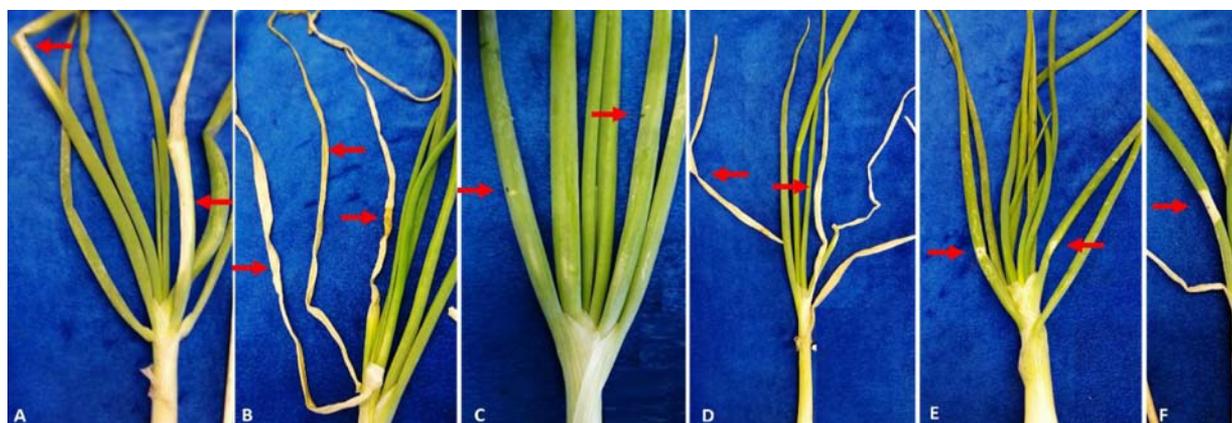
**Figura 4.** Porcentaje de área foliar afectada en cebolla (*Allium cepa* L.) a los 12 días posteriores a la inoculación con los tratamientos individuales y en coinfección. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

Control positivo de *P. ananatis* (CP). Se realizó un ANOVA multifactorial, seguido de una prueba de Tukey se realizó para determinar diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el programa SAS. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

**Figure 4.** Percentage of leaf area affected in onion (*Allium cepa* L.) 12 days after inoculation with individual treatments and in coinfection. Plant Health Laboratory of the Agricultural Sciences Faculty, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

Positive control of *P. ananatis* (CP). A multifactorial ANOVA followed by a Tukey test was performed to determine statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ) with the SAS program. Different letters indicate differences statistically significant between treatments.

De acuerdo con el desarrollo de la enfermedad, las infecciones individuales tanto con el control positivo como con *P. ananatis* ocasionaron síntomas que consistieron en la presencia de una lesión necrótica que decoloraba el tejido, su extensión iniciaba en el punto de la inoculación y se extendía a lo largo de la lámina foliar, a diferencia de *R. aquatilis* que no ocasionó ningún síntoma. Sin embargo, las plantas coinfectadas con *R. aquatilis* y *P. ananatis* mostraron una lesión localizada, ya que la afectación solo se presentaba en la zona de inoculación (Figura 5).



**Figura 5.** Plantas de cebolla (*Allium cepa* L.) 12 días posteriores a la inoculación. (A) inoculación con control positivo de *P. ananatis* (CP). (B) inoculación con *P. ananatis* (H6A). (C) inoculación con *R. aquatilis* (B1B). (D) coinfección con control positivo (CP) y *P. ananatis*. (E) Coinfección con control positivo (CP) y *R. aquatilis* (B1B). (F) coinfección con *P. ananatis* (H6A) y *R. aquatilis* (B1B). Las flechas indican el punto de inoculación. Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Mayo, 2018.

**Figure 5.** Onion (*Allium cepa* L.) plants 12 days after inoculation. (A) inoculation with positive control of *P. ananatis* (CP). (B) inoculation with *P. ananatis* (H6A). (C) inoculation with *R. aquatilis* (B1B). (D) coinfection with the positive control (CP) and *P. ananatis*. (E) Coinfection with the positive control (CP) and *R. aquatilis* (B1B). (F) Coinfection with *P. ananatis* (H6A) and *R. aquatilis* (B1B). Arrows indicate the point of inoculation. Plant Health Laboratory of the Agricultural Sciences Faculty, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. May, 2018.

## Discusión

Los síntomas de tizón foliar y pudrición del bulbo en las muestras de cebolla provenientes del departamento de Choachí, se asociaron con lo reportado para *P. ananatis* en esta hortaliza (Figura 1). El aislamiento de la bacteria a partir de los síntomas, su identificación y las pruebas de patogenicidad en bulbos y hojas de cebolla, confirmaron que *P. ananatis* es un fitopatógeno que produce alteraciones tanto a nivel foliar como en el bulbo (Gitaitis & Gay, 1997). Estas dos sintomatologías encontradas en la misma planta, se asocian con el mecanismo de ingreso y colonización de la bacteria. Al penetrar por vía foliar, la bacteria coloniza el tejido y genera la necrosis en las hojas, y cuando la bacteria progresa por la hoja infectada hasta llegar al catáfilo del bulbo, genera la pudrición (Carr et al., 2013; Weller-Stuart et al., 2017).

Aunque los síntomas de tizón foliar y pudrición de bulbo de cebolla están asociados con *P. ananatis*, en este estudio se aislaron además, dos cepas bacterianas de *R. aquatilis*, una proveniente de hojas y otra de bulbos, las cuales resultaron menos virulentas que *P. ananatis* en las pruebas de patogenicidad realizadas. *R. aquatilis* ha sido reportada como parte del componente del microbioma del tejido vegetal enfermo del bulbo de cebolla y como un género bacteriano no muy virulento al generar una disminuida decoloración y desintegración de los catáfilos (Asselin et al., 2019).

Entre los mecanismos de virulencia descritos para *P. ananatis* y que contribuyen con el daño foliar y la pudrición en los bulbos de cebolla, está la fitotoxina pantafos ((2-hidroxi [fosfono] metil) maleato), la cual está asociada con los síntomas de necrosis y pudrición en el tejido de cebolla (Asselin et al., 2018; Polidore et al., 2021). Esta toxina presenta una actividad fitotóxica similar a la de un herbicida pero su actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos es mínima (Polidore et al., 2021; Stice et al., 2021), lo que podría explicar la presencia de *R. aquatilis* junto con *P. ananatis* en las lesiones.

Aunque cepas del género *Rahnella* han sido aisladas en una mayor proporción de bulbos de cebolla sintomáticos y en menor proporción en bulbos asintomáticos en condiciones de almacenamiento (Asselin et al., 2019; Yurgel et al., 2018), en este trabajo se reporta por primera vez el aislamiento de esta bacteria a partir de lesiones necróticas y de tizón foliar en plantas de cebolla en campo. Reportes de *R. aquatilis* describen la actividad de la bacteria en bulbos de cebolla de dos maneras diferentes, la primera como patógeno oportunista que coloniza bulbos con síntomas causados por otros patógenos y la segunda como una bacteria endófito que puede llegar a predisponer al tejido a la infección por otros patógenos, dos opciones excluyentes que no han sido estudiadas (Asselin et al., 2019).

Al realizar los ensayos de coinfección con *P. ananatis* y *R. aquatilis*, se observó tanto en hoja como en bulbo una disminución en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, así como también en los recuentos bacterianos de *P. ananatis* (12 dpi), lo que indica que *R. aquatilis* ejerció una actividad controladora mas no de predisposición hacia *P. ananatis*. Esto puede ser explicado por un posible efecto antagónico de *R. aquatilis*, ya que esta especie ha sido reportada como un agente de control biológico de otras bacterias fitopatógenas como *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. vitis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *X. oryzae*, *Pseudomonas syringae* y *Clavibacter michiganensis*, evaluadas en condiciones *in vitro* (Guo et al., 2009; Habbadi et al., 2017).

Entre los mecanismos de control de *R. aquatilis* están la competitividad por acceso a fuentes nutricionales mediante la producción de celulasas y sideróforos, que reducen la disponibilidad de hierro para el patógeno y limita su crecimiento (Bouaichi, et al., 2019) y la producción de sustancias antimicrobianas como el 3-metil-1-butanol y el 2-feniletilmetiléter, que generan un daño oxidativo en las células del patógeno (Kong et al., 2020). Esta bacteria ha sido reportada como inductora de resistencia sistémica que promueve la producción de compuestos antimicrobianos como 2,4-diacetilfloroglucinol y la pioluteorina (Li et al., 2014; Yuan et al., 2020) y la producción de compuestos fenólicos y peroxidasas que limitan el crecimiento del patógeno (Sallam, 2011).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la presencia de *R. aquatilis* en coinfección con *P. ananatis* en las partes de la planta con los síntomas de tizón foliar y de la pudrición del bulbo de cebolla. En esta condición, *R. aquatilis* disminuyó la virulencia de *P. ananatis* y retrasó el desarrollo de la enfermedad, siendo este el primer estudio que sugiere el potencial biocontrolador de *R. aquatilis* sobre *P. ananatis* en condiciones *in vivo*.

Se sugiere determinar cuáles serían los mecanismos de biocontrol a nivel bioquímico y molecular generados en la cebolla por acción de *R. aquatilis* frente a la infección por *P. ananatis*.

## Referencias

- Abdullah, A. S., Moffat, C. S., Lopez-Ruiz, F. J., Gibberd, M. R., Hamblin, J., & Zerihun, A. (2017). Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 1806. <http://doi.org/10.3389/fpls.2017.01806>

- Agronet. (2020). *Estadísticas Agropecuarias*. <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Asselin, J. A. E., Bonasera, J. M., & Beer, S. V. (2018). Center rot of onion (*Allium cepa*) caused by *Pantoea ananatis* requires pepM, a predicted phosphonate-related gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(12), 1291–1300. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0077-R>
- Asselin, J. E., Eikemo, H., Perminow, J., Nordskog, B., Brurberg, M. B., & Beer, S. V. (2019). *Rahnella* spp. are commonly isolated from onion (*Allium cepa*) bulbos and are weakly pathogenic. *Journal of Applied Microbiology*, 127(3), 812–824. <https://doi.org/10.1111/jam.14340>
- Barghouthi, S. A. (2011). A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian Journal of Microbiology*, 51, 430–444. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>
- Brady, C. L., Goszczynska, T., Venter, S. N., Cleenwerck, I., De Vos, P., Gitaitis, R. D., & Coutinho, T. A. (2011). *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), 932–937. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.022921-0>
- Bouaichi, A., Benkirane, R., El-kinany, S., Habbadi, K., Lougramzi, H., Sadik, S., Benbouazza, A., & Achbani, E. H. (2019). Potential effect of antagonistic bacteria in the management of olive knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4), 1035–1040. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.8.4.1035-1040>
- Carr, E. A., Zaid, A. M., Bonasera, J. M., Lorbeer, J. W., & Beer, S. V. (2013). Infection of onion leaves by *Pantoea ananatis* leads to bulb infection. *Plant Disease*, 97(12), 1524–1528. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0597-RE>
- Chen, Q., & Liu, S. (2019). Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2171. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02171>
- Chen, W. -P., & Kuo, T. -T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21(9), Article 2260. <https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260>
- Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., Arlet, G., & Brisse, S. (2009). Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 300–310. <https://doi.org/10.1128/JCM.01916-08>
- Dutta, B., Barman, A., Srinivasan, R., Avci, U., Ullman, D., Langston, D., & Gitaitis, R. (2014). Transmission of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans*, causal agents of center rot of onion (*Allium cepa*), by onion thrips (*Thrips tabaci*) through feces. *Phytopathology*, 104(8), 812–819. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-13-0199-r>
- Edens, D. G., Gitaitis, R. D., Sanders, F. H., & Nischwitz, C. (2006). First report of *Pantoea agglomerans* causing a leaf blight and bulb rot of onions in Georgia. *Plant Disease*, 90(12), 1551. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1551A>
- Gateri, M. W., Nyankanga, R. O., Ambuko, J. L., & Muriuki, A. W. (2018). Growth, yield and quality of onion (*Allium cepa* L.) as influenced by nitrogen and time of topdressing. *International Journal of Plant & Soil Science*, 23(3), 1–13. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2018/42135>
- Gitaitis, R. D., & Gay, J. D. (1997). First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Disease*, 81(9), 1096. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.9.1096C>

- Guo, Y. B., Li, J., Li, L., Chen, F., Wu, W., Wang, J., & Wang, H. (2009). Mutations that disrupt either the *pqq* or the *gdh* gene of *Rahnella aquatilis* abolish the production of an antibacterial substance and result in reduced biological control of grapevine crown gall. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6792–6803. <https://doi.org/10.1128/AEM.00902-09>
- Habbadi, K., Benkirane, R., Benbouazza, A., Bouaichi, A., Maafa, I., Chapulliot, D., & Achbani, E. H. (2017). Biological control of grapevine crown gall caused by *Allorhizobium vitis* using bacterial antagonists. *International Journal of Science and Research*, 6(6), 1390–1397. [https://www.ijsr.net/get\\_abstract.php?paper\\_id=ART20174478](https://www.ijsr.net/get_abstract.php?paper_id=ART20174478)
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo de hortalizas. Medidas para la temporada invernal. <https://bit.ly/2NFfR8S>
- Jia, L., Xie, J., Zhao, J., Cao, D., Liang, Y., Hou, X., Wang, L., & Li, Z. (2017). Mechanisms of severe mortality-associated bacterial co-infections following influenza virus infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, Article 338. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00338>
- Kong, W. -L., Rui, L., Ni, H., & Wu, X. -Q. (2020). Antifungal effects of volatile organic compounds produced by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 against *Colletotrichum gloeosporioides* in *Liriodendron chinense* × *tulipifera*. *Frontiers in Microbiology*, 11, Article 1114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01114>
- Lau, H. Y., & Botella, J. R. (2017). Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02016>
- Lee, Y., Park, J., Kim, S., Park, I., & Seo, Y. -S. (2016). Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli*. *Molecular Plant Pathology*, 17(1), 65–76. <https://doi.org/10.1111/mpp.12262>
- Li, L., Jiao, Z., Hale, L., Wu, W., & Guo, Y. (2014). Disruption of gene *pqqA* or *pqqB* reduces plant growth promotion activity and biocontrol of crown gall disease by *Rahnella aquatilis* HX2. *PloS One*, 9(12), Article e115010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115010>
- Limoli, D., Yang, J., Khansaheb, M., Helfman, B., Peng, L., Stecenko, A. A., & Goldberg, J. (2016). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection is associated with cystic fibrosis-related diabetes and poor clinical outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35, 947–953. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2621-0>
- Metzger, D. W., & Sun, K. (2013). Immune Dysfunction and Bacterial Co-Infections following Influenza. *Journal of Immunology*, 191(5), 2047–2052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301152>
- Sallam, N. M. (2011). Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(20), 1966–1975. <https://doi.org/10.1080/03235408.2010.544469>
- Polidore, A. L. A., Furiassi, L., Hergenrother, P. J., & Metcalf, W. W. (2021). A Phosphonate Natural Product Made by *Pantoea ananatis* is Necessary and Sufficient for the Hallmark Lesions of Onion Center Rot. *mBio*, 12(1), Article e03402-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03402-20>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3<sup>rd</sup> ed.). The American Phytopathological Society.

- Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18842–18847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708139104>
- Stice, S. P., Yoon Shin, G., De Armas, S., Koirala, S., Galván, G. A., Siri, M. I., Severns, P. M., Coutinho, T., Dutta, B., & Kvitko, B. H. (2021). The distribution of onion virulence gene clusters among *Pantoea* spp. *Frontiers in Plant Science*, *12*, Article 643787. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643787>
- Stumpf, S., Kvitko, B., Gitaitis, R., & Dutta, B. (2018). Isolation and characterization of novel *Pantoea stewartii* subsp. indologenes strains exhibiting center rot in onion. *Plant Disease*, *102*(4), 727–733. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-17-1321-RE>
- Susi, H., Barrès, B., Vale, P., & Laine, A. -L. (2015). Co-infection alters population dynamics of infectious disease. *Nature Communications*, *6*, Article 5975. <https://doi.org/10.1038/ncomms6975>
- Thu Nga, N. T., Ngoc Tran, T., Holtappels, D., Kim Ngan, N. L., Phuoc Hao, N., Vallino, M., Kieu Tien, D. T., Khanh-Pham, N. H., Lavigne, R., Kamei, K., Wagemans, J., & Jones, J. B. (2021). phage biocontrol of bacterial leaf blight disease on welsh onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. *Antibiotics*, *10*(5), Article 517. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050517>
- Tsuji, M., & Kadota, I. (2020). Identification and phylogenetic analysis of *Burkholderia cepacia* complex bacteria isolated from rot of onion bulbs in Tohoku region of Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *86*, 376–386. <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00937-z>
- Tsuji, M., & Shinichi, F. (2021). The first report of bacterial streak and rot of onion caused by *Pseudomonas viridiflava* in Japan. *Plant Disease*, *105*(10), 3288. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-21-0296-PDN>
- Vasseur-Coronado, M., Dupré du Boulois, H., Pertot, L., & Puopolo, G. (2020). Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. *Microbiological Research*, *245*, Article 126672. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126672>
- Weller-Stuart, T., Toth, I., De Maayer, P., & Coutinho, T. (2017). Swimming and twitching motility are essential for attachment and virulence of *Pantoea ananatis* in onion seedlings. *Molecular Plant Pathology*, *18*(5), 734–745. <https://doi.org/10.1111/mpp.12432>
- Yin, C., Yang, W., Meng, J., Lv, Y., Wang, J., & Huang, B. (2017). Co-infection of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* in hospitalized pneumonia patients has a synergic and significant impact on clinical outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *36*, 2231–2235. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3050-4>
- Yuan, L., Li, L., Zheng, F., Shi, Y., Xie, X., Chai, A., & Li, B. (2020). The complete genome sequence of *Rahnella aquatilis* ZF7 reveals potential beneficial properties and stress tolerance capabilities. *Archives of Microbiology*, *202*, 483–499. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01758-1>
- Yurgel, S. N., Abbey, L., Loomer, N., Gillis-Madden, R., & Mammoliti, M. (2018). Microbial communities associated with storage onion. *Phytobiomes*, *2*(1), 35–41. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-17-0052-R>
- Zaid, A. M., Bonasera, J. M., & Beer, S. V. (2012). OEM--a new medium for rapid isolation of onion-pathogenic and onion-associated bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *91*(3), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.031>