

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSTGRADO**

**Determinación y diferenciación de Pantoea  
agglomerans y patógenos por medio de perfiles de  
ácidos grasos a partir de aislamientos de 5 variedades  
de semillas de Allium cepa L.**

**TESIS**

para optar el grado de Magister en Biotecnología

**AUTORA**

Zeny C. Rafael Mallaupoma.

**ASESORA**

Maria Elizabeth Gonzáles Loayza.

**Lima-Perú**

**2007**

## **Dedicatoria**

**A Mi Madre Carmen M. y  
Mi padre Moisés R. por el apoyo incesante  
E incondicional, de Igual manera a  
Mi hermano Boris,  
Que siempre están conmigo.**

## **Agradecimientos**

- 1 A María Elizabeth Gonzáles Loayza. mi Coordinadora de tesis, por su ayuda y conocimiento impartido durante la realización de este trabajo, y a todas las horas que dedico orientándome.
- 2 A la Empresa Nacional Onion labs-Perú por brindar sus instalaciones.
- 3 A los profesores de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por su apoyo incondicional.
- 4 A mis amigos por su ayuda en todo instante porque ellos me brindaron su apoyo cuando fue necesario.
- 5 A Wes Peterson por su paciencia y apoyo incondicional para seguir adelante.
- 6 A todos los que hicieron posible este trabajo de Investigación.

## Resumen

Por medio de metil ácido ester (FAMES), fueron analizados 382 aislamientos pertenecientes a cinco variedades de semillas de *Allium cepa* L. (S1, S2, S3, S4, S5). Se determinó que el 20% afecta a cultivos de interés económico, el 36% pertenecen a patógenos que afectan humanos, el 4% afectan a animales y el 40% son del ambiente.

A los aislamientos se les identificó por medio de perfiles de ácidos grasos usando un cromatógrafo HP 5890 serie II y una columna capilar Agilent Ultra 2, software MIDI, Newark, Del. Se encontró principalmente los géneros *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas* las cuales afectan cultivos de interés económico (*Allium cepa* L., *Carica papaya*, *Zingiber officinale*, *Eucalyptus* spp., *Cucumis melón*, *Ananas comosus*, *Sorghum*).

De las variedades analizadas, S2 reportó mayor diversidad de *Pantoea agglomerans* seguida por S3 que además presenta mayor concentración de *Enterobacter cloacae*; en la variedad S1 ambos patógenos se presentaron en proporción semejante, a diferencia de S5 que presentó *Pantoea ananas*, *Pantoea ananatis*, *Enterobacter cloacae* y S4 solo presentó *Pantoea agglomerans*.

La especie *Pantoea agglomerans* mostró 4 subgrupos de especies denominadas como A, B, C, D. presentando ácidos grasos en el rango de C9 a C20 mostrando las mayores concentraciones en C14:0, C16:0, C17:0 cyclo, C18:1Δ7C.

*Pseudomonas viridiflava*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea ananatis*, inoculadas sobre rodajas de *Allium cepa* en una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC mostraron descomposición seca en 53% y descomposición húmeda en 24% de rodajas de *Allium cepa* L.

En el presente trabajo se demuestra que las cinco variedades de semillas analizadas de *Allium cepa* L. son potenciales portadores de patógenos.

**Palabras claves:** *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, Metil ácido ester (FAMES), Cromatografía de Gases

## Abstract

By means of acid methyl esters (FAMES), 382 isolates were analyzed from five varieties of seed *Allium cepa* L. (S1, S2, S3, S4, S5). It was determined that 20% affect crops of economic interest, 36% belong to pathogens that affect humans, 4% affect animals and 40% are from the environment. The isolates were identified by means of fatty acid profile chromatography using an HP 5890 series II, a capillary column Agilent Ultra 2 and MIDI software, Newark, Del.

Findings included mainly the genera *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pantoea* and *Pseudomonas*; all of them are described affecting crops of interest. (*Allium cepa* L. *Carica papaya*, *Zingiber officinale*, *Eucalyptus spp*, *Cucumis melón*, *Ananas comosus*, *Sorghum*).

Of the varieties tested, S2 reported the greatest diversity of *Pantoea agglomerans* S3 followed by the largest concentration of *Enterobacter cloacae*; In the variety S1, both pathogens were presented in similar proportion, unlike S5 which submitted *Pantoea ananas*, *Pantoea ananatis*, and *Enterobacter cloacae*. S4 only presented *Pantoea agglomerans*.

The species showed *Pantoea agglomerans* with 4 subgroups of species identified as A, B, C, D. Introducing fatty acids in the range of C9: C20 showed the largest concentrations in C14: 0, C16: 0, C17: 0 cyclo, C18: 1  $\Delta$ 7 C.

*Pseudomonas viridiflava*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter cloacae* and *Pantoea ananatis* were inoculated on slices of *Allium cepa* at a concentration of  $10^5$ - $10^6$  CFU showing dry decomposition in 53% and wet decomposition in 24% of slices of *Allium cepa* L.

The present work demonstrates that the five seed varieties tested *Allium cepa* L. are potential carriers of pathogens.

Keywords: *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, acid methyl esters (FAMES), Gas Chromatography

## Índice

Resumen.....	5
Abstract.....	6
I. Introducción.....	12
II. Revisión de Literatura.....	14
2.1 Historia de Alliums.	
2.2. La Botánica de Alliums	
2.3. Estadios de la Cebollas crecidas a partir de Semillas	
2.4. Zonas de producción de Alliums en el Perú	
2.5. Clasificación de Alliums	
2.6. Fuentes de contaminación de enfermedades	
2.7. Enfermedades Bacterianas reportadas de <i>Alliums</i>	
2.8. Géneros Bacterianos más comunes presentes en <i>Allium cepa</i> L.	
2.8.1. Género <i>Pantoea agglomerans</i>	
2.8.2. Género <i>Enterobacter Cloacae</i>	
2.8.3. Otros Géneros <i>Xanthomonas, Pseudomonas, Bacillus</i>	
2.9. Enfermedades Virales	
2.10. Enfermedades producidas por Hongos	
2.11. Identificación Bacteriana	
2.11.1. Técnicas moleculares	
2.11.2. Técnicas serológicas	
2.11.3. Técnica Automáticas basadas en Métodos fisiológicos y bioquímicas.	
2.12. Ácidos grasos encontrados en Bacterias	
2.12.1. La Aplicación para la sistemática bacteriana	
2.13. Tipos de Cromatografía	
2.14. Interpretación de un reporte	
III Materiales y Equipos.....	46
3.1. Material Biológico	
3.2. Otros Materiales	
3.3. Equipos	
IV. Métodos.....	48
4.1. Reactivación de las Cepas	

4.2.	Pruebas bioquímicas	
4.3.	Producción de Biomasa para la extracción de ácido grasos Metil Esteres	
4.4.	Preparación de Reactivos para separar ácidos grasos de los lípidos	
4.4.1.	Reactivo de Saponificación	
4.4.2.	Reactivo Hidroximetanolico	
4.4.3.	Reactivo de Extracción	
4.4.4.	Reactivo Cáustico de Lavado	
4.4.5.	Solución Sódica Saturada	
4.5.	Procedimiento de extracción de ácido grasos Metil Esteres	
4.6.	Condiciones de Operación del cromatógrafo de Gases	
4.7.	Evaluación de las Identificaciones	
V.	Resultados	
VI.	Discusión.....	72
6.1.	Reactivación de cepas y pruebas bioquímicas	
6.2.	Identificación por medio de perfiles de ácidos grasos y evaluación	
6.3.	Distribución del SIM y ácidos grasos en el género Pantoea	
6.4.	Distribución del SIM determinado para los géneros diferentes a Pantoea	
VII.	Conclusiones.....	80
VIII.	Recomendaciones.....	82
IX.	Anexos.....	83
X.	Referencias Bibliográficas.....	91

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Mapa de la Distribución de Zonas de Producción de *Allium cepa* para exportación.
- Figura 2.** Distribución de la Cantidad de cebollas exportadas en años anteriores.
- Figura 3.** Distribución teórica de la pared celular.
- Figura 4.** Representación esquemática de ácidos grasos comunes y lípido simple.
- Figura 5.** Gráfico generado por el software MIDI para *Pantoea agglomerans*.
- Figura 6 y 7.** Representación para *Salmonella Thyphimurium* y vista de un cromatograma general. Fuente: Manual MIDI-Sherlock.
- Figura 8.** Pruebas de gram y anaerobiosis.
- Figura 9.** Prueba de nitrato donde rosado ó rojo sin presencia de Zinc es nitrato positivo.
- Figura 10.** Lado izquierdo prueba de indol y lado derecho prueba de oxidasa.
- Figura 11.** Distribución de las colonias en cuatro cuadrantes.
- Figura 12.** Representación de la fase orgánica e interfase antes de inyectar al GC.
- Figura 13.** Distribución de microorganismos aislados a partir de cinco Variedades de cebolla comercial.
- Figura 14.** Especies de patógenos encontrados en las semillas de *Allium cepa* L que afectan cultivos vegetales.
- Figura 15.** Variedades de *Allium cepa* L. y patógenos identificados pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae
- Figura 16.** Distribución de las especies del género *Pantoea*.
- Figura 17.** Patógenos que afectan *Allium cepa* L. y otros cultivos.
- Figura 18.** Dendograma generado en base a los ácidos grasos determinados para el género *Pantoea*.
- Figura 19.** Diferencias de una descomposición seca-húmeda en rodajas de cebolla fresca.
- Figura 20.** Géneros de patógenos gram positivos que afectan humanos.
- Figura 21.** Género de patógenos gram negativos que afectan humanos.



## Índice de Cuadros

**Cuadro 1.** Características del género *Pantoea* según el manual de Bergey's.

**Cuadro 2.** Características del género *Enterobacter* Según el manual Bergey's.

**Cuadro 3.** Características del género *Xanthomonas* según el manual de Bergey's.

**Cuadro 4.** Características del género *Pseudomonas* según el manual de Bergey's.

**Cuadro 5.** Características del género *Bacillus* según el manual de Bergey's.

**Cuadro 6.** Relación de tipos de bacterias con los ácidos grasos y lípidos totales.

**Cuadro 7.** Pruebas bioquímicas para las cepas que afectan cultivos vegetales de interés económico.

**Cuadro 8.** Relación de cepas identificadas que afectan cultivos de interés económico.

**Cuadro 9.** Distribución del SIM de las identificaciones pertenecientes al género *Pantoea*

**Cuadro 10.** Ácidos grasos y clase total determinados para el género *Pantoea*.

**Cuadro 11.** Distribución del SIM determinado en los géneros de patógenos diferentes a *Pantoea*.

## Índice de anexos

**Anexo I.** Distribución de cepas y géneros aislados a partir de semillas de cebolla comercial.

**Anexo II.** Porcentaje de patógenos encontrados en las semillas de *Allium sp.* L. que afectan humanos.

**Anexo III.** Géneros reportados como patógenos de humanos.

**Anexo IV.** Géneros de microorganismos encontrados en las semillas de *Allium sp.* L. pertenecientes al ambiente.

**Anexo V.** Número de cepas y porcentajes de repeticiones – géneros pertenecientes al ambiente.

**Anexo VI.** Porcentaje de patógenos encontrados e la semilla de *Allium sp.* L. que afectan animales.

**Anexo VII.** Número de cepas y porcentajes de repeticiones pertenecientes a microorganismos que afectan animales.

**Anexo VIII.** Formato de identificaciones en la torre de cromatografía y controles internos usados para el proceso.

**Anexo IX.** Relación total de especies identificadas a partir de aislamientos de cinco variedades de cebolla comercial.

## I. Introducción

En el mundo globalizado, la demanda de importar semillas de diferentes cultivos debidamente certificado es primordial, pero el continuo tráfico de productos y personas origina nuevas enfermedades producidas por patógenos nunca antes descritos en el país; Por otro lado; identificar la fuente primaria de transmisión de posibles patógenos es de gran importancia para el manejo de la enfermedad.

Así; Hattingh & *et al* 1981, reportaron a *Pantoea agglomerans* (*Syn. Erwinia herbícola*) como patógeno de *Allium cepa* L. "Cebolla" en Sud Africa. Walcott & *et al.* 2002; señalaron con síntomas semejantes a *Pantoea ananatis* reportada como el causante de la descomposición central de *Allium cepa* L. observada por primera vez en Georgia en 1997 en las cebollas Sweet Vidalia, causando ese año pérdidas de hasta, el 80% en campos comerciales. Según Brutton 1986 y Walcott & *et al* 2002 *Pantoea ananatis* o formalmente denominada *Erwinia herbícola* fue reportada causante de la misma enfermedad en *Ananas comosus* "piña". Serrano 1928, Azad 2000, Brutton 1986 y Giatitis 2003, describen a *Pantoea ananatis* como patógeno de *Eucalyptus* spp. "Eucalipto"; *Cucumis melo* "melón"; *Ananas comosus* "Piña"; *Sorghum bicolor* L. Moench "Sudagrass".

En el Perú, el cultivo de cebolla de exportación se incrementa cada año en más del 30%. Las semillas usadas para este cultivo aparentemente no tienen ningún análisis específico para probar que esta libre de patógenos, la semilla que ingresa por vía legal al país es evaluada macroscópicamente o con métodos convencionales.

El análisis de ácidos grasos por cromatografía gaseosa para la identificación de bacterias fitopatógenas es una técnica alternativa a los procedimientos microbiológicos tradicionales que consumen tiempo y muchas veces son ambiguos. Los ácidos grasos son marcadores quimiotaxonómicos de alta utilidad.

EL objetivo de esta investigación fue determinar y diferenciar *Pantoea agglomerans* y otros patógenos de semillas de 5 variedades de *Allium cepa* L. por medio de perfiles de ácidos grasos determinados por cromatografía de gases.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

- Determinar e Identificar *Pantoea agglomerans* y otros patógenos de semillas de 5 variedades de *Allium cepa* L. por medio de perfiles de ácidos grasos evaluados por cromatografía de gases.

### **Objetivos específicos**

- Reactivar los aislamientos provenientes de semillas
- Extraer ácidos graso metil ester de cada aislamiento.
- Evaluar los perfiles por medio de cromatogramas específicos entre 9 y 20 carbonos.
- Cuantificar la presencia de ácidos grasos en términos de metil ester
- Evaluar las pruebas bioquímicas de los aislamientos que afectan cultivos de interés económico y cebolla.

## **II Revisión de Literatura**

### **2.1. Historia de Alliums**

El género *Allium* contiene más de 500 especies Hanlet 1990 y Kopsell 1995. El uso de la cebolla data desde 4000 años del antiguo Egipto Jones and Mann 1963 citado por Kopsell 1995.

En la Biblia da testimonio sobre el uso de cebolla como alimento en el tiempo del éxodo de los judíos, que se estima alrededor de los 1500 años A.C, Acosta y Gaviota 1989.

Durante la Edad Media tuvo un amplio incremento el cultivo en toda Europa, Cristóbal Colon fue el primero que lo trajo América, en las zonas del Caribe, cita Kopsell 1995.

### **2.2. La Botánica de Alliums**

La posición taxonómica de *Allium* y su género han sido de mucha controversia, En clasificaciones iniciales de las angiospermas, Fritsch R.M. & Friesen N. 2002. Ellos fueron ubicados dentro de las Liliaceae, posteriormente dentro de las Amaryllidaceae, en base a su estructura de su inflorescencia, datos moleculares de *Allium* la reconoce como una familia distinta, las Alliaceae cercanas de las Amaryllidaceae, siguiendo la siguiente jerarquía. Fritsch R.M. & Friesen N. 2002:

- Clase Liliopsida
- Subclase Lilidae
- Superorden Liliianae
- Orden Amaryllidales
- Familia Alliaceae
- Subfamilia Allioideae

- Tribu Allieae
- Género Allium

Sin embargo otras clasificaciones han sido propuestas, Kopsell 1999.

Usando en la literatura la siguiente clasificación:

- Clase monocotiledónea
- Super orden Liliiflorae
- Orden Asparagales
- Familia Alliaceae
- Tribu allieae
- Subtribu Allinae
- Género Allium

Especie *Allium cepa* L. nombre común cebolla.

Algunas fuentes consideran como un miembro de la familia Liliácea pero se propuso una inclusión en una familia independiente llamada Alliaceae en 1985. Kopsell 1999; siendo consideradas a las *Allium* como herbáceas, perenne, que contiene estructuras de almacenamiento llamadas rizomas, bulbos, y raíces de almacenamiento, Kopsell 1999.

### **2.3. Estadíos de la Cebollas crecidas a partir de semillas**

*Allium cepa* es un cultivo bienal Bailey, 1929; Hanlet, 1990; y Kopsell D. 1995.

La semilla al estar en contacto con el suelo en la siembra pasara a un estadio temprano denominado de bucle, debido a que después de la germinación subterránea, el cotiledón aparece en forma de bucle o anzuelo por encima de la superficie, pasando seguidamente por el estadio denominado “Bandera” ante la aparición de la primera hoja. La primera hoja verde surge mientras el cotiledón está todavía claramente curvado presentando forma de látigo, seguido por una senescencia del cotiledón tras la aparición de las segundas y terceras hojas verdaderas, el cotiledón se marchita, cae y sigue una desecación progresiva.

A la aparición de la cuarta hoja denominada “estadio de puerro” el cuello de la planta inicia con un engrosamiento mientras se marchita la primera hoja, a la caída de la primera hoja la segunda empezará a desprenderse por la

vaina y comienza a envejecer desde el ápice mientras que aparecen las hojas cinco, seis y séptima, trayendo posteriormente la formación del bulbo. El bulbo al empezar a formarse; se secan la segunda y tercera hoja, mientras que aparecen las hojas de la ocho a la trece, alcanzando la planta su máxima altura y de ahí engrosamiento del bulbo. El bulbo se abulta rápidamente a la vez que se secan progresivamente las hojas de la cuarta a la sexta, junto con los ápices de las hojas más jóvenes, las hojas pueden doblarse o curvarse bajo su propio peso. Pueden aparecer una o dos hojas de limbo corto, comenzando a formarse la cubierta externa seca del bulbo. El cuello o pseudotallo se ahueca a medida que las hojas nuevas dejan de crecer en su interior y los tejidos del cuello pierden turgencia y se ablandan, por lo que se colapsa el follaje bajo su propio peso. Alcanzando su tamaño final y completando la maduración del bulbo, con consiguiente senescencia de la planta. Rey, *et al.* 1974 citado por Brewsler 2001.

#### **2.4. Zonas de producción de Alliums en el Perú**

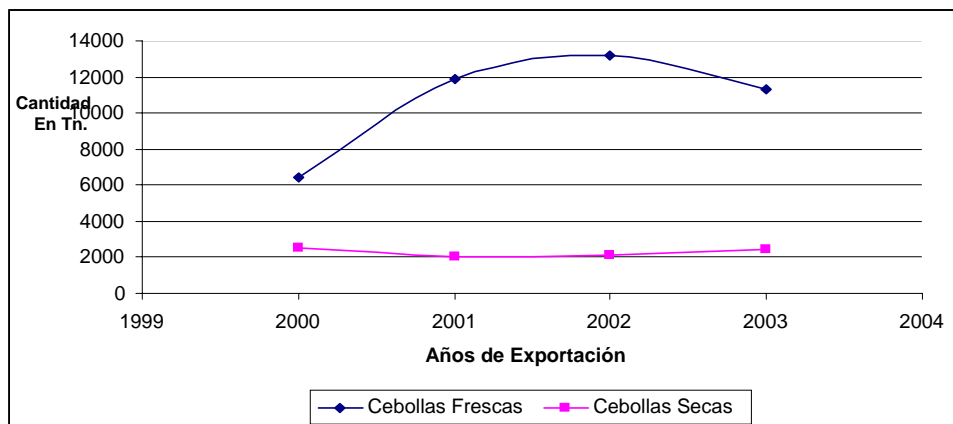
Tenemos la zona sur de Ica, Arequipa, Norte de Casma. Ver figura1. Según Vargas Delgado L. 1996; las cebollas se cultivan en zonas templadas, frió, sub húmedas de la sierra de Arequipa y Junín. Zonas productoras de mas importancia en el país con climas templado subtropical seco, valles de la costa sur, central y norte hasta la libertad, clima tropical seco como los valles de la costa norte de Piura y Tumbes, además de un clima tropical muy húmedo de los valles de San Martín.

**Ubicación de Zonas de producción de Cebolla para Exportación en Perú**



**Figura 1. Mapa de la distribución de zonas de Producción de *Allium cepa* para exportación.**

De acuerdo al ministerio de Agricultura señala que la exportación de cebollas frescas y secas se ha expandido, elevándose la productividad hasta 50 T; por Hectárea. Las cebollas frescas se han exportado a los Estados Unidos en un 98%, con flujos menores hacia Ecuador, Colombia, Chile, Alemania y Japón. Las cebollas secas son exportadas a Japón, Alemania, Estados Unidos y Colombia principalmente. Ver comportamiento



**Figura 2. Distribución de la cantidad de cebollas exportadas.**



## **2.5. Clasificación de Alliums**

### **2.5.1. Por forma**

Según Acosta 1989. Se puede diferenciar cebollas chatas, oblonga, globosa, como las más clásicas, las que pueden sufrir modificaciones por los sucesivos cruzamientos, tomando formas variadas como chata alargada, globo achatado o semiglobada.

### **2.5.2. Por color**

En el comercio se puede encontrar bulbos de color blanco, amarillo dorado, morado rojo, rosado, Acosta 1989.

### **2.5.3. Por Foto período**

La formación del bulbo puede ser clasificado en términos de días largos, días intermedios, y días cortos; esto relacionando con los fotoperíodos necesarios para diferenciar los cultivares, Brewster, 1990.

Acosta 1989, Brewster 1990. citan que la época de producción es muy dependiente del largo del día donde inicia la formación de bulbos. Las temperaturas cálidas aceleran las respuesta a largo del día y son necesarias para la maduración del bulbo. En cambio las temperaturas frías tienden a demorar la iniciación de la formación de bulbos aun si el largo del día es adecuado, 12-13 horas día luz estas variedades crecen en días cortos de invierno, si no darán bulbos pequeños en primavera.

Si se presenta 14 horas día luz, son variedades que se cosecha en Enero a febrero y se conserva a campo hasta Setiembre sin brotar.

## **2.6. Fuentes de Contaminación de enfermedades**

Identificar la fuente primaria de inóculo es punto crítico para un efectivo manejo de la enfermedad, hay un gran potencial para introducir y diseminar patógenos de plantas a través de semillas infectadas.

Los eventos que se pueden dar con las bacterias patogénicas es del ciclo de la enfermedad que incluye, sobrevivencia, diseminación e infección.

Goto Masao 1992, sobrevivencia en lesiones este tipo se da mas en cultivos perennes, incluyendo árboles frutales.

### **2.6.1. Semillas**

Las semillas son una fuente primaria de contaminación de diferente naturaleza así Velez & et al 2004, al analizar semillas de cebolla de marca comercial, detectaron *A. Niger* y *Rhizopus*.

### **2.6.2. Insectos**

Algunas bacterias y hongos patógenos también se transmiten mediante insectos vectores .Atlas 2002.

Vargas, 2002; el trip de la cebolla (*Thrips tabaci*) es la plaga mas importante de este cultivo, causando daños entre un 50-80% si no es controlado. Si el ataque se inicia cuando la planta esta pequeña la perdida de la producción puede ser total.

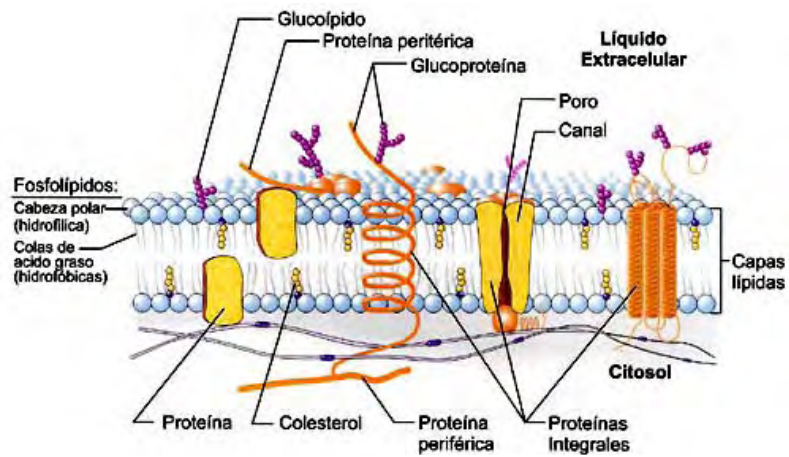
### 2.6.3. Bacterias

Las bacterias son divididas en 4 grandes grupos las Eubacterias Gram negativas que tienen pared celular, las Eubacterias Gram positivas, Las Eubacterias que no tienen pared celular, y las Arqueobacterias.

Cada una tiene diferente composición en la membrana o en la pared celular.

#### 2.6.3.1 Eubacterias Gram negativas con Pared celular

Son procariontes que tienen una compleja pared celular consistente de una membrana externa e interna, una capa de peptidoglucanos, la cual contiene ácido murámico, casi presentes en todos, pero hay una porción que ha perdido esto en su pared celular, y una serie de componentes fuera o entre capas, ver figura 3.



<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/images/f1-1-2-b.jpg>

Figura 3. Distribución teórica de la Pared celular.

Usualmente se tiñen de gram negativos. Las formas celulares pueden ser esféricas, ovaladas rectas, curvadas, bastonadas, helicoidales o filamentosas.

Su reproducción es por fisión binaria, pero algunos grupos presentan yemas, y un raro grupo de *Pleurocapsales* que presentan fisión múltiple. Pueden ser fototróficos, no fototróficos, ambos lito tróficos y heterotróficos e incluyen aerobios, anaerobios, o facultativos, y especies microaerófilos, algunos miembros son parásitos intracelulares obligados. Bergey'S Manual 1994.

### **2.6.3.2 Eubacterias Gram Positivas con Pared celular**

Procariotas con pared celular que se tiñen como gram positivas generalmente, las células pueden ser esferas, bastones o filamentos, los bastones y filamentos pueden ser no concatenados, pero muchos son ramificados. La reproducción celular es generalmente por fisión binaria, produciendo algunas esporas como formas de sobrevivencia o almacenamiento. Son no fotosintéticos, generalmente son quimiosintéticos heterótrofos e incluye aerobios, anaerobios, facultativos y microaerófilos. Bergey'S Manual 1994.

### **2.6.3.2 Eubacterias Que No tienen pared celular**

Son procariotes que no tienen pared celular comúnmente llamados micoplasmas e incluyen la clase mollicutes, no sintetizan los precursores de peptidoglucano. Las células son altamente pleomórficas, su reproducción puede ser por yemas, fragmentación y/o fisión binaria; Usualmente son no motiles, pero algunas especies presentan alta motilidad; Muchos requieren complejos medios de crecimiento con alta presión osmótica alrededor. Los

micoplasmas pueden ser saprofiticos, parasiticos o patogenicos, los patogenos pueden causar enfermedades de animales, plantas y cultivo de tejidos.

### **2.6.3.3 Archeobacterias**

Son predominante terrestres y acuaticos, presentandose en medios anaerobios, hipersalinos hidrotermales y geotermales, cambiantes extremos, tambien presentes en algunos sistemas digestivos como simbioses de animales.

Estan presentes aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos que crecen quimiolitroautotroficamente, organotroficamente, u organotrofos facultativos, Las arqueobacterias pueden ser mesofilas, termofilas con algunas especies que crecen sobre los 100 °C.

Una unica caracteristica bioquimica de las arqueobacterias es la presencia de isoprenil eter de glicerol lipido. No tiene mureina (acido muramico conteniendo peptidoglucano).

Con respecto a las secuencias de 5S, 16S, 23S RNAs ribosomales son muy diferentes de los correspondientes en eubacterias y eucariotes.

Las arqueobacterias pueden tener una diversidad de formas, incluyendo las esfericas, espiraladas, planas o cilindricas, formas unicelulares y multicelulares, en filamentos o agregados, Su multiplicacion se da por fisión binaria, yemas constrictoras, fragmentación, o mecanismos desconocidos, el color de las masas celulares puede ser rojo, púrpura, rosada, naranja, marrón verde, amarillo ploma, blanca, negras.

El mayor grupo de arqueobacterias incluye:

Las arqueobacterias metanogénicas, arqueobacterias sulfato reductoras, extremadamente halófilas o extremadamente termófilas que metabolizan azufre (S<sup>0</sup>). Bergeys Manual 1994.

## 2.7 Enfermedades Bacterianas reportadas de Alliums

La pudrición central de las cebollas fue primero observada en Georgia Sobre cebollas Sweet Vidalia en Mayo de 1997, Giatitis R, D. 1997.

Las perdidas por dicha enfermedad fueron desde un 20 % hasta un 80%. De igual manera se observó en campos comerciales durante 1998 y 2001 pero las perdidas fueron menores; EL agente causal de esta enfermedad bacteriana fue *Pantoea ananatis*, también conocida como *Erwinia herbicola* *syn. Erwinia uredovora*, esta bacteria también fue reportada en *Ananas comosus* “Piña”. La descomposición central también se dio por *Pantoea agglomerans* *syn E. Herbicola* reportado en África en 1981 Hattingh, M. J. & *etal.* 1981. Walcott 2002, presenta una hipótesis que la primera enfermedad en Georgia fueron asociados a los lotes de semilla infestados procedentes de Sud África, reportando similares síntomas en Colorado y Michigan en 1997.

Schwartz & *et al* 2002; Señaló que durante 1996 hasta 1999 en algunas áreas de Colorado estuvo presente *Xanthomonas campestris*, asociados a manchas foliares y *Pantoea ananatis*, generando perdidas en los cultivos dependiendo de las condiciones adversas de clima, asociados con lluvia, tormentas, temperatura y el estado de desarrollo de la planta.

Yañez *et al* 2003, en campos comerciales de México en 1989 detectó por primera vez una severa descomposición denominada “blanda” o “suave” en los bulbos de cebolla, determinando *Erwinia chrysanthemi*, estando presente en las semillas de la variedad Early supreme, Ringer grano, Texas grano todas variedades amarillas. De igual forma en muestras de suelo, agua y semilla, reporto, *Bacillus licheniformis*, *B. megaterim*, *B. subtilis* *var. Globigii*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia carotovora sub carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas cichorii*, *P. corrugada*, *Serratia marcescens*, *S. odorifera* y *Xanthomonas maltophilia*.

Otro agente causante es *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* una potencial bacteria de los almácigos causante de severas enfermedades, encontrado en América y Europa Rougmac 2003.

*Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii*. fue monitoreada en campos de producción de semillas de cebolla durante dos periodos, encontrándose un comportamiento diferente, siendo esta influenciada con la temperatura, siendo mas de 24° C la temperatura donde se desarrollo mejor la enfermedad después de inocular las plantas con *Xanthomonas*. Humeau L. & et al. 2006.

Se identificó *Pseudomonas syringae* como un agente causal de enfermedad en cebolla y como nuevo agente en poro (*Allium porrum*) reportado por Samson S. & et al 1998.

Durante 2002-2003 Gitaitis & et al 2004, reportaron una gran cantidad de campos de cebollas con manchas foliares y bulbos inaceptables, de donde hicieron aislamientos e identificando cepas como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*. Ambas especies las reportan como patogénicas pero presentan comportamiento diferente en cuanto a las cepas reportadas por el mismo autor en Georgia.

## **2.8 Géneros Bacterianos más comunes presentes en *Allium* cepa L.**

### **2.8.1. Género *Pantoea***

El género *Pantoea* fue registrado en 1989 por Gavini & et. al. Incluyendo dos especies, *Pantoea agglomerans*, (sinónimos: *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*), *Pantoea dispersa*, *Pantoea ananatis*.

### 2.8.1.1. Características del Género

Bastones rectos de, 0.5-1.0 X 1-3 µm. Móviles por peritricos, flagelos. La gran mayoría de cepas produce un pigmento amarillo. Son anaerobio facultativos. Su temperatura óptima es 30°C, fermentan carbohidratos incluyendo, L-Arabinosa, D-Galactosa, Maltosa, D-Manitol, D-Manosa, L-ramnosa, sucrosa, trealosa y D-xilosa. Aisladas de superficies de plantas, semillas, suelo, agua, así como fluidos animales y humanos, sangre, orina, es patógeno oportunista de humanos; manual de Bergey's. Ver cuadro 1.

**Cuadro1. Características del género pantoea según el manual de Bergey's.**

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Gram	Negativa
Oxidasa	Negativa
Catalasa	Positiva
Indol	Negativa
Voges Proskauer	Positiva
Citrato de Simons	Positiva
Lysina y Ornitina descarboxilasa 30%	Positiva
H <sub>2</sub> S	No produce
Urea	No hidroliza
HCN	Muchas cepas crecen
Malonato	Muchas especies usan
Reduce Nitratos	Positiva



### 2.8.2. Género *Enterobacter cloacae*

Bastones rectos, aproximadamente entre 0.6-1.0 µm de ancho y 1.2-3.0 µm de largo son móviles por peritricos y flagelos, excepto *E. asburiae*.

Anaerobio facultativo y quimiorganotrófico, teniendo un metabolismo fermentativo y respiratorio; su temperatura óptima va entre 30°C – 37°C, D-glucosa, es catabolizada con la producción de ácido y gas, la mayoría de las especies de este género fermentan L-arabinosa, Celobiosa, Maltosa, D-Manosa, trealosa, lentamente producen liquefacción la gelatina. Ampliamente distribuido en la naturaleza, agua fresca, suelo, vegetales, plantas, animales y heces humanas. Especies como: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, son patógenos oportunistas. Ver cuadro 2.

**Cuadro 2. Características del género *Enterobacter* según el manual de Bergey's.**

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Gram	Negativa
Oxidasa	Positiva/Negativa
Catalasa	Positiva/Negativa
Indol	Negativa
Voges Proskauer	Positiva
Citrato de Simons	Positiva
Lysina	Negativa excepto <i>E. gergoviae</i>
Ornitina	Positiva excepto <i>E. agglomerans</i>
H <sub>2</sub> S	No produce
Malonato	Usualmente usa
Reduce Nitratos	En su mayoría

### 2.8.3. Género *Xanthomonas*

Bastones largos, usualmente de 0.4-0.7X 0.7-1.8 µm predominan, gram negativa, presenta motilidad por medio de un flagelo polar, excepto *Xanthomonas maltophilia*, la que es multiflagelada, aeróbica, no denitrifica, reduce nitratos, excepto *X. maltophilia* que reduce nitratos para nitritos, su temperatura optima va entre 25-30 °C. Las colonia por lo general son amarillas, viscosa, oxidasa negativa, o débilmente positiva, catalasa positiva, quimiorganotrofica, su crecimiento es inhibido por 0.02% de Cloruro de Trifeniltetrazolium, patógeno de plantas; excepto *Xanthomonas maltophilia*, la cual es un patógeno oportunista de humanos, ver cuadro 3.

**Cuadro 3. Características del género *Xanthomonas* según el manual de Bergey's.**

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Gram	Negativa
Oxidasa	Positiva/Negativa
Catalasa	Positiva
Indol	Negativa
Reduce Nitratos	Negativa

### 2.8.4. Género *Pseudomonas*

Bastones curvados ligeramente, y bastones rectos, pero no helicoidales de 0.5 – 1.0X 1.5-5.0 µm.

Movilidad por uno o varios flagelos, aeróbico, varias especies crecen bajo condiciones acidas, quimiorganotrofica, algunas especies son quimiolitrotófos capaces de usar el hidrogeno y CO como fuente de energía, Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, algunas especies son patogénicas para humanos, animales y plantas. Ver cuadro 4.

**Cuadro 4. Características del Género *Pseudomonas* según el manual de Bergey's.**

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Gram	Negativa
Oxidasa	Positiva/Negativa
Catalasa	Positiva
Indol	ND
Reduce Nitratos	Positiva /Negativa

### **2.8.5. Género *Bacillus***

De forma bastonada, 0.5-2.5 1.2-10  $\mu\text{m}$  , generalmente esta en arreglos de pares o cadenas con finales cuadrados o redondeados, son móviles por medio de flagelos peritricos, forman endosporas ovales, o algunas veces cilíndricos, siendo resistentes muchas veces a condiciones adversas, no hay mas de una espora por célula, la esporulación no es reprimida por la exposición del aire, son aerobios, o facultativos, con amplia diversidad de habilidad fisiológica con respecto al calor, pH y salinidad; son quimiorganotrófos con metabolismo, fermentativo o metabolismo respiratorio. Usualmente se encuentra en una gran diversidad de habitas pocas especies son patogénicas de vertebrados e invertebrados.

La diferenciación entre especies de ese género es difícil por el gran número de descriptores incompletos, el predominante como patógeno de humanos y animales es el *Bacillus anthracis*, cercano de *B. cereus*. Bergey's Manual. 1994. Ver cuadro 5.

**Cuadro 5. Características del género *Bacillus* según el Manual de Bergey's.**

<b>Característica</b>	<b>Reacción</b>
Gram	Positiva
Oxidasa	Positiva
Catalasa	Positiva
Reduce Nitratos	Variable entre especies

## **2.9. Enfermedades Virales:**

Los virus se clasifican en función de su capacidad de causar una determinada enfermedad. Los vectores son importantes en el transporte de virus fitopatógenos presentes en el suelo, tejidos enfermos de las plantas susceptibles, insectos homópteros e himenópteros y también algunos nemátodos pueden actuar como vectores de enfermedades víricas en plantas.

Un atributo necesario de los virus en particular es la capacidad de sobrevivir fuera de las células hospederas hasta encontrar una nueva planta viva susceptibles al ataque .Atlas y Bartha 2002.

Los virus también pueden transmitirse por semillas, la dispersión de los virus hacia las estructuras de la planta que intervienen en la reproducción, como el polen y las semillas, les asegura la persistencia dentro de las poblaciones de plantas hospederas susceptibles a la infección.

La distribución de las enfermedades víricas en plantas a menudo sigue la distribución geográfica de los organismos vectores. Atlas y Bartha 2002.

### 2.9.1. Virus incidente en cebollas Iris Yellow Spot Virus – IYSV:

La incidencia de Iris Yellow Spot Virus (IYSV) del género Tospovirus de la familia Bunyaviridae en campos comerciales fue primero confirmada en el estado de Washington durante el 2003. (**Wild *Allium* spp. as Natural Hosts of *Iris yellow spot virus***). Pappu HR, Department of Plant Pathology, Washington State University, Pullman 99164; and B. C. Hellier and F. M. Dugan, USDA-ARS, Western Regional Plant Introduction Station, Washington State University, Pullman 99164. Plant Dis. 90:378, 2006; published on-line as DOI: 10.1094/PD-90-0378A. Accepted for publication 20 December. 2005).

Iris Yellow spot virus (IYSV) género tospovirus, familia Bunyaviridae viene siendo endémico en varias partes del mundo en cultivos comerciales y semilleros. Así en Estados Unidos como patógeno emergente o reemergente en Idaho en semilleros durante el 2002-2003 reportado por Crowe & *et al*, 2005. De igual manera en New México, Colorado y Washington Creamer R & *et al*. 2004.

Entre 2004 y 2005 fueron observados lesiones cloróticas y necróticas en forma romboide en campos de Sudamérica como, Brasil durante 1999, en Chile durante 2004 y 2005 Rosales & *et al*. 2005. De igual manera en los cultivos de cebolla para exportación de Perú se detecto por ELISA en campos de cebolla en las campañas de 2004 y 2005.

Mullis SW & *et al*. 2005. Este tospovirus es transmitido en una manera propagativa por *Thrips tabaci*. IYSV fue reportado en Supe, Ica en Perú en campos de cebolla comercial

Otros virus como TSWV, OYDS, y LYSV se detectaron en España.

## 2.10. Enfermedades producidas por hongos

Vélez & *et al* 2004. Detectaron hongos las semillas de cebolla como *Aspergillus Níger*, estando presente también en suelo, bulbos, y *Fusarium spp.* *Penicillium spp* fueron aislados frecuentemente del aire. *A. Níger*, *Fusarium* y *Cladosporium* del suelo y en los bulbos *A. Níger*, *Penicillium* y *Sclerotium rolfsii*. El género *Alternaria* fue el más común en el follaje de cebolla. En total 11 géneros de hongos asociados al follaje y un grupo de hongos desconocidos que no esporularón en su estudio fueron detectados.

## 2.11. Identificación Bacteriana

Diferentes grupos de moléculas son frecuentemente usadas como marcadores para la identificación, clasificación de microorganismos, en el caso de lípidos, en particular lípidos alifáticos (poseen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas) han tenido relevancia para la sistemática bacteriana.

### 2.11.1. Técnicas moleculares

Los ensayos basados en esta técnica basado en el ADN según Louis & *et al* citado por Schaad 2001. Es no dependiente de las condiciones ambientales, edad o fisiología del patógeno o blanco de estudio, pero si algunas técnicas dependen de la calidad de ADN extraído. El criterio importante para optar por esta técnica con otros protocolos incluye especificidad, sensibilidad y velocidad. La especificidad es determinada por los primers que son diseñados, específicos para los procariotas con género específico ejemplo *Pseudomonas* ó *Xanthomonas*, o grupos específicos como con fitoplasmas.

Los patólogos en plantas ven la identificación de patógenos que son asociados con complejo de enfermedades específicas con primers y protocolos que pueden ser específicos a la especie por ejemplo *Xanthomonas fragariae* o pathovar de *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* o aun el nivel de cepa por ejemplo *Xanthomonas campestre pv. citri* grupo A .

La identificación específica de un patógeno puede ser basado en la amplificación de un ADN o basado en la amplificación de patrones amplificados de productos (fingerprint patterns) después una separación electroforética o análisis de restricción.

Normalmente una prueba debería ser usada para confirmar la identidad de un producto amplificado.

La sensibilidad puede incluir bajo número de células (CFU) detectables en una muestra actual, o relacionado a un nivel de mantenimiento asociado a pérdidas económicas.

#### **2.11.1.1. Ribotyping**

Es otra técnica que es usada para la identificación bacteriana y análisis de cepas. EL ribotyping se refiere al uso de ácidos nucleicos para reconocer genes ribosomales. Según Maslow, J, N. 1993 citado por Schaad 2001.

Los genes que codifican para el RNA ribosomal son altamente conservados y en muchas bacterias son similares.

EL DNA es extraído, purificado y cortado con enzimas de restricción. El ADN digerido es corrido en un gel de agarosa para separar los fragmentos resultantes por tamaño. Las bandas de ADN son transferidos a una membrana de nylon y probadas con un operón marcado de RNA ribosomal, Los métodos radioactivos o no radioactivos de detección pueden ser usados, Los fragmentos marcados de ADN a partir de cada cepa producen un único patrón de bandas conocida como fingerprint.

Existen sistemas automáticos disponibles para escanear y grabar los datos de los geles, el análisis puede ser completado usando diferente software y programas estadísticos. Varios programas como el Taxtron son usados.

El ribotyping es una vía rápida de comparación la relación genética perteneciente a cada bacteria. Cuando el ribotyping es aplicado a un gran número de bacterias, esta técnica puede ser exacta y una herramienta útil para los estudios taxonómicos y epidemiológicos. Nassar, A & *et al* 1994.

### **2.11.2. Técnicas serológicas**

Los anticuerpos han sido usados extensivamente y en diferentes formas para la detección e identificación de bacterias.

Así Álvarez citado por Schaad. 2001. Señala como el más popular y de éxito incluyendo la aglutinación, el ensayo de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), inmunofluorescencia (IF) otra variante es los inmunoblots y perlas magnéticas que son usadas pero no ampliamente en una detección de rutina de un patógeno de semilla, materiales propagativos o muestras de campo.

El método de ELISA puede ser usado para identificar bacterias en plantas sintomáticas o tejidos sintomáticos con alta concentración de patógeno ( $>10^5$  CFU/ml.) Siendo una herramienta útil de identificación de blancos de cultivos mixtos de bacterias.

Una llave para el éxito del diagnóstico de cepas bacterianas, usando inmunodiagnóstico, es a través de anticuerpos específicos usados en la prueba.

### **2.11.3. Técnicas automáticas basadas en métodos fisiológicos y bioquímicas**

El Análisis de utilización de sustratos y ácidos grasos son dos técnicas utilizadas para identificar microorganismos.

#### **2.11.3.1. Utilización de sustratos**

Ha sido un método tradicional para la identificación y categorización de bacterias desconocidas.

Otro sistema de identificación es el BIOLOG. Este sistema automatizado utiliza 96 diferentes sustratos, las células bacterianas son cosechadas y suspendidas en un fluido de inoculación. La concentración celular es estandarizada usando un espectrofotómetro e inoculada dentro de cada



posillo, la utilización del sustrato es reconocido por la presencia de un color púrpura, que es el resultado de una reacción redox de tetrazolium violrys. El resultado es un fingerprint de lo desconocido.

Este sistema usa diferentes microplatos para bacterias gram negativas y para gram positivas las bacterias deben de crecer bajo condiciones estándares de nutrientes, tiempo y temperatura. Las células bacterianas son crecidas a 30°C por 24 horas en un medio BUG y los platos son leídos a 4 horas o 24 horas. Los platos son leídos manualmente o con un lector automático.

Hay otros kits disponibles comercialmente por medio del empleo del sustrato como enterotubos, Vitek, BBL cristal Microbial ID kit, son diseñados para uso en laboratorios médicos y tienen una limitada base de datos que no incluye las bacterias patogénicas de plantas.

### **2.11.3.2. Ácidos grasos**

Para el caso de ácidos grasos ha sido reconocido por más de 35 años y la información taxonómica se puede obtener por el examen de su perfil ácido graso de una cepa, muchas bacterias contienen 5-30 ácidos grasos individuales.

Según Behme, R.J. 1996 y Wells, J.M. 1993. Citados por Schaad, NW.2001 se han desarrollados sistemas inteligentes para procesar datos de ácidos grasos, como el mas sofisticado es el MIDI. Microbial Identification system, usando cromatografía gaseosa.

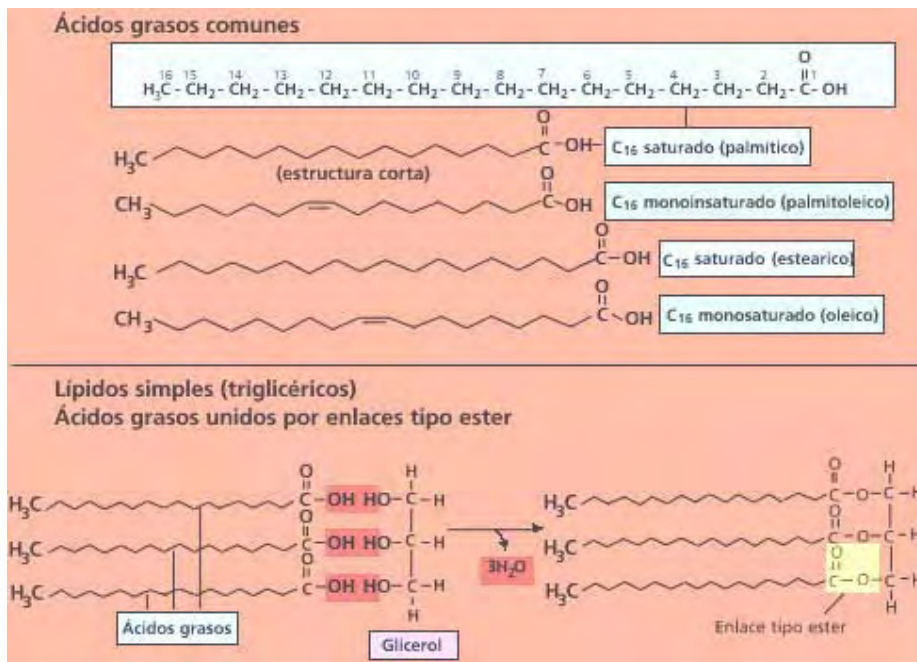
La base de datos es la mas útil para bacteriologistas en patógenos de plantas.

## **2.12. Ácidos grasos encontrados en bacterias**

Los ácidos grasos uno de los más esenciales componentes de los lípidos celulares. En las células bacterianas los ácidos grasos principalmente son de la membrana celular Kaneda 1991,

Según Tornabene 1985, la mayoría de los ácidos grasos en eubacterias son acilados al glicerol, azúcares o componentes amino, relativamente poca cantidad son ácidos grasos libres. Para el caso de las Arqueobacterias, los ácidos grasos son relativamente en menor cantidad con una gran proporción de ellos en forma de ácidos grasos libres. Langworthy, 1982 nombrado por Komagata & Suzuki 1987, señala que algunas bacterias metanogénicas y halófilas nombradas como arqueobacterias, contienen isoprenil gliceroéster tomando el lugar de los gliceroéster de ácidos grasos encontrados en muchas bacterias.

Komagata & Suzuki 1987, señalan que los ácidos grasos componentes de las bacterias esencialmente no cambian por condiciones culturales pero si la composición de ácidos grasos celulares es afectada por: Periodo de cultivo, temperatura, medio. Para comparar la composición de los ácidos grasos en un grupo bacteriano las condiciones de cultivo deben de estandarizarse para todas las cepas a ser analizadas. Ver figura 4.



[http://www.puc.cl/sw\\_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval2.1.3.1.html](http://www.puc.cl/sw_educ/biologia/bio100/html/portadaMlval2.1.3.1.html)

**Figura 4. Representación esquemática de ácidos grasos comunes y lípido simple.**

### 2.12.1. La aplicación para la sistemática bacteriana

Según Tornabene 1985, la mayor cantidad de ácidos grasos de las bacterias van del C-12 al C-20, de igual manera Sasser (1990), reporta que los ácidos grasos que predominan en las bacterias patogénicas de plantas van del C9 al C20 estos ácidos grasos están como acil constituyentes de los fosfolípidos de la membrana bacteriana. La diversidad de estructuras en ácidos grasos, los patrones característicos dentro de un taxón y su estabilidad a pesar de que los plásmidos muten, hace disponible este marcador para la identificación bacteriana.

Dentro de las clases de ácidos grasos en las bacterias tenemos, cadenas largas saturadas de (16:0), cadenas largas monoinsaturadas (16:1 W7cis), ciclopropanos (17:0 ciclopropano), iso-ramificados (15:0 iso), anteiso ramificados (15:0 anteiso), hidroxí ácidos de (12:0 2OH, 12:0 3OH), y mezclas (13:0 iso 3OH, 17:1 anteiso A). Stead Citado Schaad *et al.* 2001.

De otro lado Lechevalier 1982. Señala que lo más común en ácidos grasos monoinsaturados en bacterias son con una doble unión entre C9 y C10 (serie oleico), también entre C7 y C8 (ácido vacénico) contando desde el terminal metil sin embargo los ácidos grasos que hacen únicas a las bacterias son los  $\beta$  hidroxí, ciclopropanos y cadenas de ácidos grasos que no son comunes en otra parte.

Además las bacterias no contienen ácidos grasos poliinsaturados, las moléculas con uniones acetilénica ó esteroides comunes en otras formas de vida. En algunas bacterias, los ácidos grasos se presentan libremente o bajo la forma de glicéridos, o unidos principalmente a fosfolípidos, glicolípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos.

Las bacterias se pueden dividir dentro de 2 grupos basados en la estructura de ácidos grasos celulares.

La familia de ácidos grasos de cadena larga que incluye ácido graso palmítico, estearico, hexadecanoico, octadecanoico, ciclopropanico, 10

methylhexadecanoico, y 2 ó 3 hidroxil ácido, estos ácidos grasos se presentan comúnmente en las bacterias, ellos son sintetizados de acetyl Co A. como cadena primaria y malonil Co A, como una extensión de cadena, seguida en algunos casos por una modificación de los productos de ácido graso.

La otra familia de cadena ramificada de ácidos grasos las que incluye iso, anteiso, ácido graso  $\omega$ -alíclico, con o sin una substitución (insaturaciones o hidroxilaciones) la ocurrencia de este tipo de ácido graso no es muy común en bacterias pero es significativa.

La diferencia clara entre estas dos familias de membrana celular está en el mecanismo que controla su fluidez, así para el primer caso de acuerdo a Kaneda 1991, las cadenas rectas de ácidos grasos está regulado por la inclusión de ácidos grasos monoinsaturados. En el caso de los ácidos grasos de cadenas ramificadas es controlado principalmente por los ácidos 12 y 13 metiltetradecanoico.

Las bacterias requieren de insaturaciones en los ácidos grasos para crecer, pero en el caso de las bacterias con membranas de cadenas ramificadas no son esenciales estos ácidos grasos.

Un grupo que tiene cadena saturada de ácidos grasos ramificados iso y anteiso como mayor componente, ocurre predominantemente en bacterias gram positivas., ejemplo: *Bacillus*, Kaneda, 1977. Fulco 1983 citado por Tornabene 1985 y Komagata & susuki, 1987. *Staphylococcus* (Durham y Kloos, 1978).

El patrón de cadenas rectas saturadas y monoinsaturadas de ácidos grasos es encontrado en ambos, gram negativas como gram positivas. Como se da en las Bacterias ácidos lácticos, esta composición Veerkamp 1972, Uchida y Mogi, 1972 citado por Komagata y susuki, 1987.

Y muchas de las bacterias gram Negativas incluyendo las enterobacteriaceas demuestran este patrón de composición, teniendo como componentes generales de n-C<sub>16:0</sub>, n-C<sub>18:1</sub>, n-C<sub>16:1</sub>, y n-C<sub>18:0</sub>.

Las bacterias gram negativas presentan hidroxi ácidos grasos o ciclopropanos que son útiles en la clasificación, Estos Hidroxi ácido grasos usualmente 3-hidroxi ácido grasos son componentes de lipopolisacaridos, de la membrana. Los perfiles de hidroxi ácido grasos son útiles en la caracterización de *Pseudomonas* y bacterias relacionadas, según Oyaizu y Komagata 1983 citado por komagata y Susuki 1987. Las cadenas ramificadas de ácidos se observa en *Xanthomonas spp.* La cual también contiene hidroxiácido grasos (11:0 iso 3OH, 13:0 iso 3 OH). Stead Citado Schaad *et al.* 2001.

La diferenciación de las cepas se da por la composición de ácidos grasos y de lípidos totales. Ver Cuadro 6.

**Cuadro 6. Relación de tipos de Bacterias con los ácidos grasos y lípidos totales.**

<b>Diferenciación de cepas</b>		
<b>Ácidos grasos</b>	<b>Poliramificadas</b>	<b>Bacterias ácido rápidas</b>
	<b>Poliinsaturadas</b>	<b>Bacterias azul verdosas</b>
	<b>Metilramificadas</b>	<b>Bacterias Gram positivas</b>
	<b>Hidroxiladas</b>	<b>Gram negativas</b>
<b>Lípidos totales</b>	<b>Ácidos Grasos /lípidos neutrales</b>	<b>Eubacterias</b>
	<b>Glicerol alkil Lípidos. Iso, anteiso cadenas</b>	<b>Termodesulfobacterias</b>

## 2.13. Tipos de Cromatografía

### 2.13.1. Cromatografía líquida

El análisis de cromatografía líquida es suficientemente sensible para el análisis de ácidos grasos celulares, extraídos de unos miligramos de células secas no es necesario separar y determinar todos los picos para la identificación de la bacteria, Komagata y susuki 1987; Los patrones de cromatografía se pueden comparar con patrones de computadora, Tanaka 1977.

### 2.13.2. Cromatografía gaseosa

Sistema de un gas cromatógrafo

gas transportador (carrier gas)

La velocidad lineal del gas carrier o flujo apropiado directamente influye en el tiempo de retención y eficiencia.

La apropiada selección de ajuste del carrier es esencial para obtener los mejores tiempos de análisis, eficiencia y reproducibilidad. El carrier está controlado inicial a la columna a lo que denominamos head pressure, esta presión depende del carrier o transportador, la longitud de columna y el diámetro, temperatura de la columna y flujo.

Siendo:

$$\bar{u} \text{ (cm/sec)} = \frac{L}{t_M} \text{ donde:}$$

$\bar{u}$  = Velocidad lineal promedio

L = Longitud de columna (cm)

$t_M$  = tiempo de retención de un pico no retenido (sec)

El uso de gases de alta pureza da lugar a una larga vida de la columna tiempo de vida de la trampa.

Las principales impurezas del gas son oxígeno, agua e hidrocarburos, los tres degradan la sensibilidad, el oxígeno y el agua acelera la degradación de la fase estacionaria, especialmente a temperaturas altas de columna.

Estas impurezas deberían ser < 10ppm y para el caso del hidrogeno y helio deberían ser 99.999%.

Buyer 2003 cita, un cromatógrafo GC- 6890 con un autoinyector, split/splitless, septum merlin microseal , un detector tipo FID y controlado por un chemstation (agilent) y software sherlock (MIDI) usado para análisis de bacterias por medio de los FAMES.

## 2.14. Interpretación de un reporte

Cada reporte generado por el cromatógrafo tiene el mismo formato de: **Información general:** donde se presenta un código de la muestra, la fecha de análisis y el tiempo de análisis.

**El perfil de la muestra:** Aquí se observa cada pico del análisis cromatográfico de acuerdo al tiempo de retención (TR), respuesta y la relación área y altura (AR/HT), cada pico detectado es ploteado. También se incluye en el reporte la longitud de cadena equivalente (ECL), nombre del pico, los picos que no corresponden para los valores de cadena equivalente de ácidos grasos no conocidos son dejados como no nombrados y no se usan para la detección en la base de datos.

Las áreas de los picos son modificados por el factor de respuesta cuantitativa y son normalizados para el 100%, resultando un porcentaje en peso que se lista en el reporte respectivamente. La respuesta al factor de ajuste, deriva desde la corrida del estándar de calibración.

Así el área del solvente (pico del solvente) es directamente proporcional a la cantidad del solvente (Hexano/Metil ter butil) inyectado. El pico del solvente debería ser al menos de 15000000 áreas para asegurar que se analizo una cantidad apropiada por el sistema.

El pico del solvente no es incluido en los cálculos de porcentaje de peso.



Al pie del perfil se muestra siempre una sección de resumen donde es muy útil para detectar los problemas del sistema.

La respuesta total de los picos (total response) eluye entre C9:0 y C20:0 y esta relacionado con el extracto total de ácidos grasos extraídos. Los picos que eluyen fuera de este rango no son nombrados.

El área total de todos los picos nombrados lo tenemos como (Total Named) y es listado con el porcentaje nombrado (Percent Named), después de corregir las áreas de los picos por medio de el factor de respuesta y sumar nos da una cantidad total (total amount).

Para el análisis realizado en este trabajo la respuesta debería estar entre 1100,000 y 1500,000.

El número de picos de referencia (number referente Peaks) son usados cualitativamente de acuerdo al estándar interno, para ajustarse a los valores de ECL, el error entre los ECLs obtenidos y los esperados se expresan en términos de la desviación estándar del ECL(ECL Desviation)siendo una medida del sistema en termino de picos nombrados.

Y el ECL Shift es una medida de la estabilidad cromatográfica, es una forma de verificar como va trabajando el sistema, y cuando esta falla se adiciona al reporte mensajes de error.

#### **2.14.1. Interpretación del resultado de acuerdo a librería**

La librería consiste más de 100,000 cepas analizadas obtenidas de diferentes colecciones. Los cultivos fueron colectados alrededor del mundo para evitar influencia del potencial geográfico. Veinte cepas o más diferentes cepas por especie o subespecie fueron analizadas para hacer cada entrada.

Ver ejemplo de reporte y figura 5. Donde cada titulo en rojo resalta cada parte del reporte, todo es generado por muestra.

## Información General

Volume: DATA      File: E046234.99B      Seq Counter: 10      ID Number: 1443  
 Type: Samp      Bottle: 37      Method: TSBA50      Sample ID: 165.7

## Información de la Muestra (Perfil)

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Perce nt	Comment1	Comment2
1.633	3.315E+8	0.027	----	7.027	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.755	4998	0.045	----	7.258		----	< min rt	
1.911	1494	0.037	----	7.555		----	< min rt	
4.880	20495	0.030	1.041	12.000	12:0	4.44	ECL deviates 0.000	Reference -0.009
7.218	905	0.037	----	13.812		----		
7.425	4466	0.065	0.979	13.958	unknown 13.957	0.91	ECL deviates 0.001	
7.482	27083	0.036	0.978	13.999	14:0	5.51	ECL deviates -0.001	Reference -0.008
8.275	2789	0.041	0.968	14.503	unknown 14.502	0.56	ECL deviates 0.001	
9.060	774	0.042	0.960	15.000	15:0	----	ECL deviates 0.000	
9.360	1560	0.043	----	15.177		----		
9.884	48144	0.040	0.953	15.487	Sum In Feature 2	9.54	ECL deviates -0.001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10.446	126570	0.042	0.949	15.818	Sum In Feature 3	24.98	ECL deviates -0.004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.597	795	0.043	0.948	15.907	16:1 w5c	0.16	ECL deviates -0.002	
10.757	141203	0.041	0.947	16.001	16:0	27.81	ECL deviates 0.001	Reference -0.004
12.311	65201	0.044	0.939	16.889	17:0 CYCLO	12.73	ECL deviates 0.001	Reference -0.005
12.505	812	0.048	0.938	17.000	17:0	0.16	ECL deviates 0.000	Reference -0.006
13.864	1587	0.056	0.934	17.765	18:1 w9c	0.31	ECL deviates -0.004	
13.967	62505	0.046	0.933	17.823	18:1 w7c	12.13	ECL deviates 0.000	
14.278	2543	0.045	0.932	17.999	18:0	0.49	ECL deviates -0.001	Reference -0.007
15.059	1239	0.058	----	18.443		----		
15.866	1433	0.039	0.928	18.903	19:0 CYCLO w8c	0.28	ECL deviates 0.001	Reference -0.006
18.495	168	0.046	----	20.415		----	> max rt	
18.601	487	0.061	----	20.475		----	> max rt	
19.677	126	0.025	----	21.090		----	> max rt	
----	48144	---	----	----	Summed Feature 2	9.54	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	126570	---	----	----	Summed Feature 3	24.98	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

## Resumen

ECL Deviation: 0.002      Reference ECL Shift: 0.007      Number Reference Peaks: 7

Total Response: 509328      Total Named: 505624

Percent Named: 99.27%      Total Amount: 481563

## Identificaciones con la Librería

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0.894	<i>Pantoea-agglomerans</i> -GC subgroup B ( <i>Enterobacter</i> )
	0.700	<i>Salmonella-typhimurium</i> -GC subgroup B
	0.661	<i>Yersinia-bercovieri</i>
	0.659	<i>Yersinia-frederiksenii</i>
	0.541	<i>Enterobacter-intermedius</i>

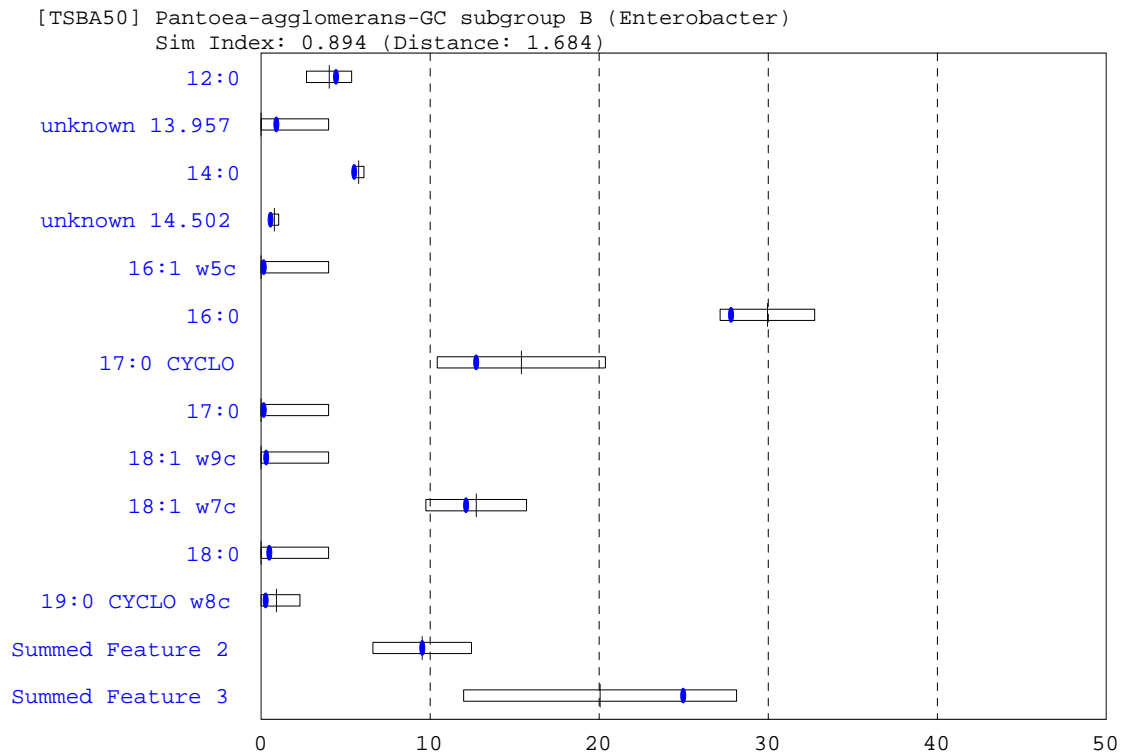


Figura 5. Gráfico generado por el Software MIDI para *Pantoea agglomerans*.

[TSBA50] Salmonella-typhimurium-GC subgroup B  
 Sim Index: 0.700 (Distance: 2.998)

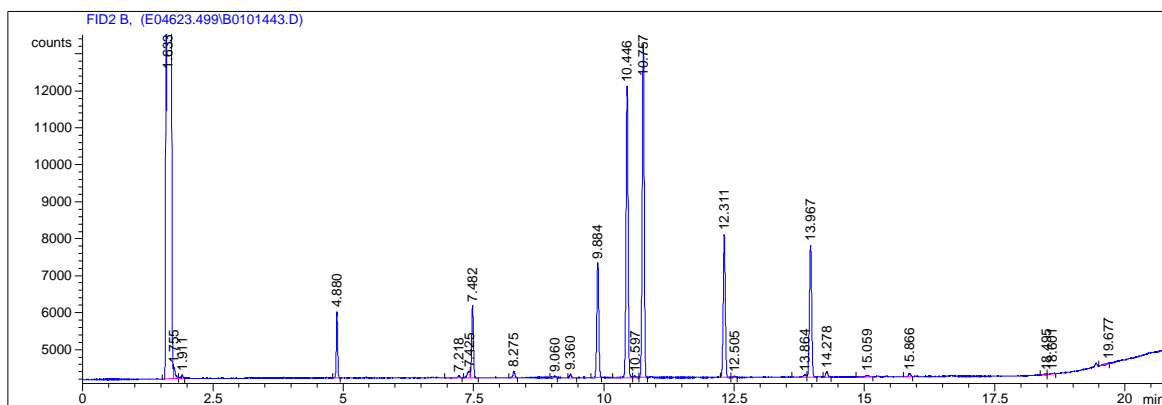
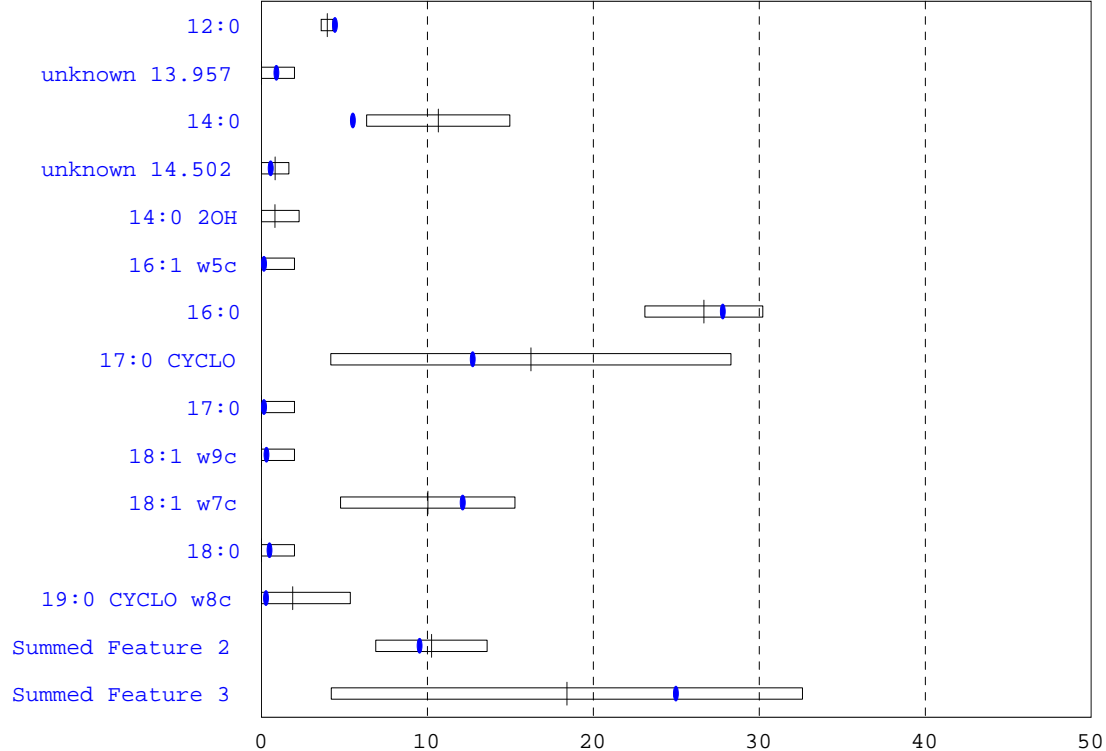


Figura 6 y 7. Representación para *Salmonella typhimurium* y vista de un cromatograma general. Fuente. MIDI Sherlock Manual.

### **III. Materiales Y Equipos**

#### **3.1. Material Biológico**

Se trabajó con 382 aislamientos a partir de semillas provenientes de 5 variedades (S1, S2, S3, S4, S5) de cebolla, obtenidos por el Laboratorio Vidalia Lab Inc. actualmente National Onion Labs, Inc- Perú).

- *Stenotrophomonas maltophilia* como control positivo del Método.
- *Pantoea agglomerans* ATCC. como control positivo de la Investigación.

#### **3.2. Otros materiales**

Todos los equipos y reactivos usados en el proyecto fueron proporcionados por el laboratorio: National Onion Labs, Inc-Perú.

#### **3.3. Equipos**

- Cromatógrafo HP- 5890 serie II.
  - Gas hidrogeno, 99,9 % como carrier
  - Regulador de hidrogeno CGA 305, Marca agilent, código 5183-4642.
  - Gas Nitrógeno 99,9% como makeup
  - Regulador del tanque de nitrógeno CGA 580 marca agilent código 5183-4644
  - Gas Aire para el FID.
- Regulador del tanque de aire marca agilent 5183-4645.
- Una columna capilar agilent ultra 2 para 5890, marca agilent, Código del Producto. 19091B-102.

- Jeringa de 23 ga punta tipo 2. marca agilent, código del producto 9301-0713.
- Férulas de grafito de 0.5mm, marca agilent, código del producto 50808853.
- Port liners activados rellenos marca Microbial ID, código del producto 1220.
- Estándares de calibración de 4ml marca Microbial ID código 1200 A.
- Baños Maria marca Fisher de 20 L.
- Hematology marca Fisher código 14-059.
- Vortex Genie 2 marca Fisher 12-812.
- Incubadoras de 50 Litros a 28°C.

### **3.4. Reactivos**

- Hidróxido de sodio grado ACS en pellets Marca Kossodo.
- Metanol , grado HPLC marca Fisher A451-1
- Hexano grado HPLC marca Fisher H302-1
- Cloruro de Sodio grado ACS marca Fisher S271-500
- Acido clorhídrico 6 Normal marca Fisher LC15370-2
- Metil ter butil en grado HPLC Aldrich 29321-0.
- Medio TSB marca BBL marca Fisher B 1171
- Agar granular marca BBL ó Merck.

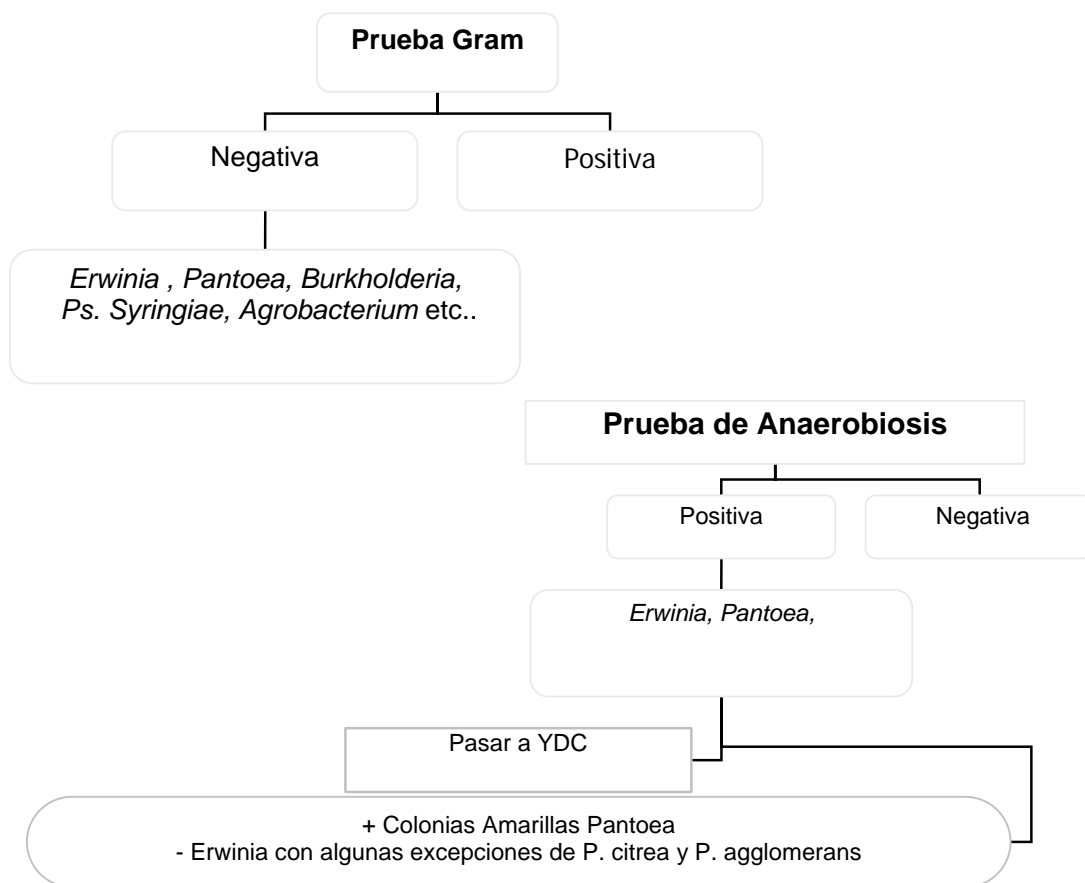
## IV. Métodos

### 4.1. Reactivación de las cepas

Las cepas aisladas se reactivaron en un medio general de agar nutritivo-NA (peptona al 0,3%, extracto de carne 0,5% y agar al 1,5%), tomando una asada de 10 µl y se sembró por estrías en placas con NA e incubó a 28°C por 24 horas. Todo se trabajó en condiciones de esterilidad. Se verificó su pureza y viabilidad. Antes de la extracción de ácidos grasos se realizó las pruebas bioquímicas.

### 4.2. Pruebas bioquímicas

Se realizó por métodos convencional, para su confirmación con la identificación. Anaerobiosis, indol, oxidasa, nitrato reductasa. Ver figura 8.



**Figura 8. Pruebas de gram y anaerobiosis.**

#### **4.2.1. Prueba de gram**

Esta prueba es esencial para diferenciar las bacterias patogénicas de plantas dentro de dos grupos: los gram positivos y negativos.

Se uso el método de KOH por ser un gran número de cepas.

Donde se mezcló dos asadas de bacterias con dos gotas de 3% de KOH cuando las bacterias son altamente gomosas se considera como gram negativas y para el caso opuesto gram positivas. Método Según Suslow, 1982. Citado por Schaad, 2001.

#### **4.2.2. Prueba de anaerobiosis**

Se sembró un cultivo puro en un medio de crecimiento anaeróbico, (Hugh and Leifson), compuesto de peptona 2 gramos, NaCl 5 gramos,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 gramos, agar 3.0 gramos, azul de bromotimol 3.0 ml en 1% de solución acuosa. Todo lo anterior es por litro y a pH de 7,1. Se dispensó 5 ml de medio basal en tubos de 13 cm de diámetro y esterilizo a 121 °C 15 psi por 20 minutos. Finalmente adicionar asépticamente 0,5 ml de solución de glucosa estéril por tubo o adicionar antes de dispensar en tubos estériles.

Se sembró una asada por picadura en cada tubo y se cubrió de vaselina estéril una profundidad de 1 cm. Después de esto se incubo a 24°C por 24-36 horas observando el cambio de color de un verde oscuro a un amarillo claro, considerando como positivos a estos que viraron a un color amarillo como un crecimiento anaerobio fermentativo.

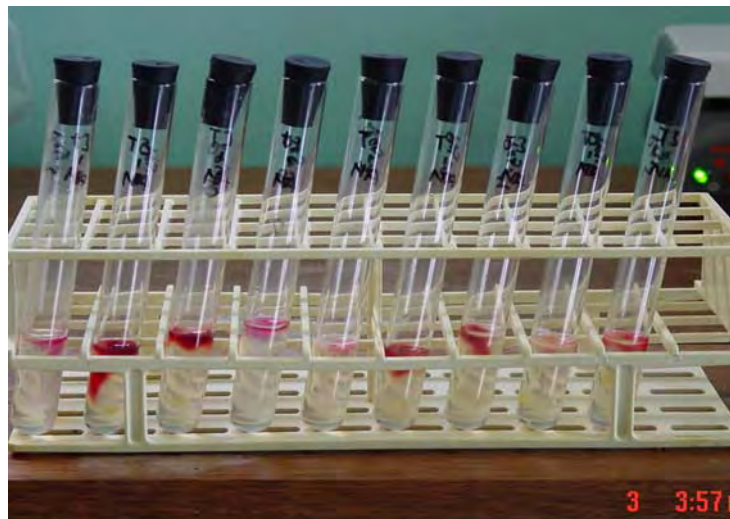
#### **4.2.3. Prueba de nitrato reductasa**

La característica de reducir nitrato ( $\text{NO}_3$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2$ ) de una especie es constante en determinados géneros y especies. La prueba se desarrollo con el uso de un medio de cultivo compuesto por  $\text{KNO}_3$



1 gramo, peptona 5,0 gramos, extracto de levadura 4,0 gramos, y oxid ion agar #2- 3 gramos todo lo anterior mencionado fue para un litro de medio a un pH de 7,0- 7,2. Se elaboro este medio y una vez esterilizado a 121 °C por 15 minutos se inoculo una asada de cultivo puro a cada tubo previamente etiquetado e identificada cada muestra; se incubó a 24 °C por 24hrs. y se evaluó con una solución de nitrato A (ácido sulfanílico al 0.8% en 5N de ácido acético), B(N, N-dimetil alfa naftilamino al 0.6% en 5N de ácido acético) y C (zinc en polvo) marca BBL.

Se adiciono 3-5 gotas de reactivo A y B individualmente, agitar suavemente para mezclar los reactivos, y observar la aparición de un color rosa/rojo, el organismo es nitrato positivo. Si no aparece ningún cambio de color a los 2 minutos, añade una pequeña porción de nitrato c si cambia de color del medio a rosa o rojo a los dos minutos esta presente el nitrato en el medio y el organismo no lo redujo, siendo nitrato negativo y si no hay nitrato presente en el medio es decir el organismo lo redujo a nitrógeno gaseoso y el organismos es nitrato positivo. Ver figura 9.



**Figura 9. Prueba de nitrato donde rosado o rojo sin presencia de zinc es nitrato positivo.**

#### **4.2.4. Prueba de indol**

Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptofano a indol Aragón V & *et al* citado por Díaz & *et al.* 1999. que se detecto por medio de las pruebas - Becton Dickinson. Para determinar si los microorganismos son positivos a esta prueba se uso microorganismos crecidos en Agar nutritivo a 30 °C después de 24 horas de incubación. La prueba de indol es positiva cuando da un color rosado intenso dentro de los 30 segundos a un minuto y negativo cuando la azada no varía de color, pero se observa falso negativos si se deja en reposo por varios minutos el microorganismo sobre el slide y se lee el resultado.

Ver figura 10.Lado izquierdo.

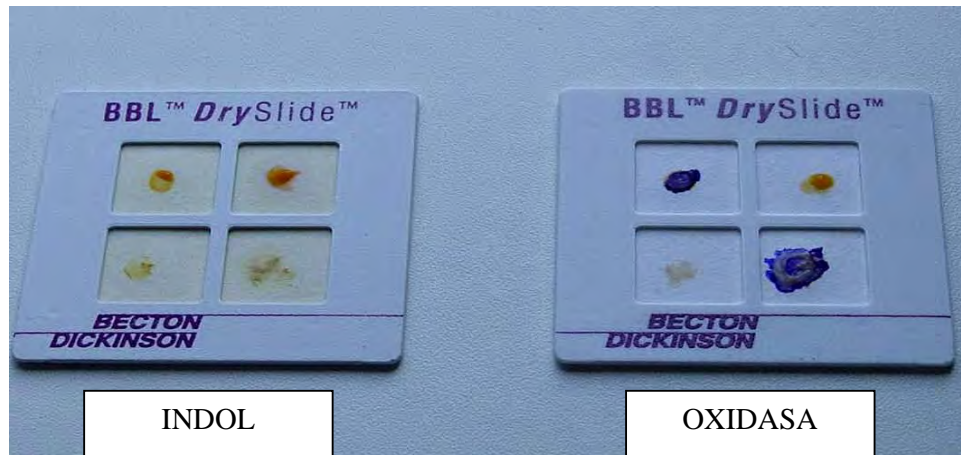
#### **4.2.5. Prueba de oxidasa**

Se realizo esta prueba para determinar la presencia del citocromo c oxidasa en las bacterias. Se basa en la capacidad del colorante tetrametil-p-fenilen-di amonio de oxidarse al ceder electrones al citocromo c. Este colorante es incoloro en estado reducido y puede oxidarse rápidamente en presencia del citocromo c produciendo una coloración azul-morada. Aragón V. & *et al* citado por Díaz & *et al.* 1999

Para determinar si los microorganismos son positivos a esta prueba se uso microorganismos crecidos en Agar nutritivo a 30 °C después de 24 horas de incubación se realizo pruebas de oxidasa, por pruebas de slides de oxidasa marca Becton Dickinson.

Donde se comprobaba por una coloración púrpura intensa a los 20 segundos de colocado una asada de microorganismo fresco el cambio de coloración y si era negativo quedaba en un color crema- amarillo color de la colonia, hay que resaltar que esta prueba después de un

minuto todas las colonias tornan en el color de positivo por la presencia de oxígeno. Para lo que se considero el tiempo como factor de importancia en esta prueba. Ver figura 10. Lado derecho



**Figura 10. Lado izquierdo prueba de indol y lado derecho prueba de oxidasa.**

#### **4.3. Producción de biomasa para la extracción de ácido grasos metil esterés**

Se usa un medio estándar para el crecimiento de los microorganismos, Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) este medio es elegido porque en el crecen la mayoría de microorganismos identificados por el MIDI, a su vez este medio no contiene una cantidad significativa de ácidos grasos pudiendo interferir con el análisis si esta presente, adicionalmente el medio es disponible comercialmente.

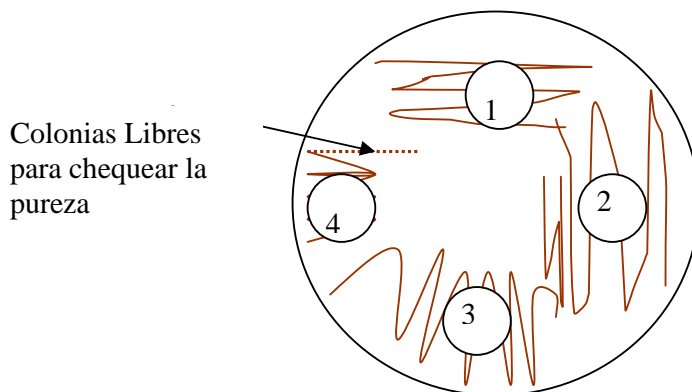
Se disolvió 30 g de TSBA en un litro de agua, y adicionó 15 g de agar granulado, todo se mezcló y llevó a esterilizar por 15 min. A 121 °C a 15 psi. Teniendo cuidado de no sobrecalentar el medio, se enfrió hasta los 60° C en baño maría y dispensó 20 a 25 ml del agar disuelto asépticamente

dentro de placas petri 100X 15 mm de diámetro, El agar fue de 2,5-3,2mm de profundidad.

Se dejó solidificar a temperatura ambiente. Cuando las placas se almacenaron fue sellada y refrigerada.

Para sembrar las placas se sembró una asada de 10  $\mu$ l por estrías formando 4 cuadrantes e incubó a 28 °C. Por 24 $\pm$  2 hrs.

**Ver figura 11.**



**Figura 11. Distribución de las colonias en cuatro cuadrantes.**

Se inició en el cuadrante 1 y en el 4 se confirmó la pureza del cultivo por medio de colonias individuales.

#### **4.4. Preparación de reactivos para separar ácidos grasos de los lípidos**

Para preparar los reactivos hay que considerar:

- Los tubos de cultivo fueron reusables pero fueron lavados con detergente que no genere residuos.
- Las tapas de los tubos de vidrio eran de teflón por la calidad de químicos que se usa y la composición de estas.

#### **4.4.1. Reactivo hidroximetanólico**

El reactivo resultante es cáustico, se mezcló 45 gramos de hidróxido de sodio (certificado como ACS) en 150 ml de metanol (HPLC grado) y con 150ml de agua destilada.

#### **4.4.2. Reactivo de metilación**

Es resultante de mezclar 325 ml. de ácido clorhídrico al 32 % - 6.00N con 275 ml de metanol en grado HPLC, este reactivo es de carácter ácido así que se uso guantes y mascarar de seguridad para mezclar ambos reactivos.

#### **4.4.3. Reactivo de extracción**

Adicionar 200ml de hexano en grado HPLC en un envase de vidrio previamente seco y mezcla con 200 ml de metil ter butil eter (MTBE) en grado HPLC también.

#### **4.4.4. Reactivo cáustico de lavado**

Este reactivo es una mezcla de hidróxido de sodio diluido, se mezcló 10,8 gramos de NaOH en grado certificado ACS con agua destilada.

#### **4.4.5. Solución sódica saturada**

Este reactivo fue opcional solo se uso para romper la emulsión producida al final del proceso de extracción, se elaboro con 100 g de ACS Cloruro de sodio en 250 ml de agua destilada, los cristales se observaban en esta mezcla por ser saturada.

## **4.5. Procedimiento de extracción de ácido grasos metil esterres**

### **4.5.1. Cosecha de la muestra**

Se selecciono una colonia bien aislada desde un repique primario y con un asa de köle estéril se repicó en TBSA agar distribuido en 4 cuadrantes como se señalo anteriormente, cada cuadrante en cada estría va diluyendo el inculo, de manera que el cuadrante 4 tiene las colonias bien separadas, en esta área se chequea la pureza de la cepa, la colonia debe ser cosechada desde el cuadrante mas diluido tendiendo a considerarse en fase Log tardía, el área de cosecha produce ácido graso mas estable.

La óptima área para cosecha es el cuadrante 3, y para el caso de las colonias de crecimiento lento se reemplazo por el cuadrante 2.

Una falla en el cuadrante correcto de la placa resulta en un pobre apareamiento con la base de datos, la cosecha se hizo de aproximadamente 40mg de células frescas, estas se llevaron a un tubo de vidrio limpio, seco de 13 mm por 100 mm con tapas de teflón. Se removi6 el asa de kölle, y paso al siguiente paso con previa verificación de codificar bien la muestra.

### **4.5.2. Saponificación**

En este proceso se uso un baño maria con temperatura controlada y un vortex; se adiciono 1 ml de reactivo Hidroximetan6lico, en cada tubo del bloque, aqu6 se considero no cerrar fuertemente por la presi6n que se generara en el proceso, se agito 5-10 segundos, y coloco a 100°C +/- 2 °C. Despu6s de 5 minutos los tubos se colocaron en agua fr6a r6pidamente, llevando al vortex por 5- 10 segundos y se retorno los tubos al ba6o Mar6a por unos 25 minutos, previamente revisando que ning6n tubo haya tenido fugas, evidente por la presencia de burbujas.

Después de un total de 30 minutos de saponificación, se sacaron los tubos y llevaron a un baño frío, el hielo no es necesario.

#### **4.5.3. Metilación**

En este paso se convirtieron los ácidos grasos (como sales de sodio) para metil ésteres ácidos grasos lo que nos incrementaron la volatilidad de los ácidos grasos en el análisis por cromatografía gaseosa.

Para la metilación se adiciono en cada tubo del bloque ha analizar  $2 \pm 0.1$  ml del reactivo de metilación, se cerro ajustadamente las tapas llevándolo a agitar a casa tubo al vortex por unos 5-10 segundos, el exceso de sal puede hacer observar unos gránulos precipitados de sal en el reactivo.

Seguidamente se llevaron los tubos a un baño maría a  $80 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 minutos.

Removiéndolo y enfriándolo rápidamente a temperatura ambiente, nuevamente no es necesaria la presencia de hielo.

El exceso de temperatura degradara los ciclo-propanos de los componentes, alterando el perfil del ácido graso.

#### **4.5.4. Extracción**

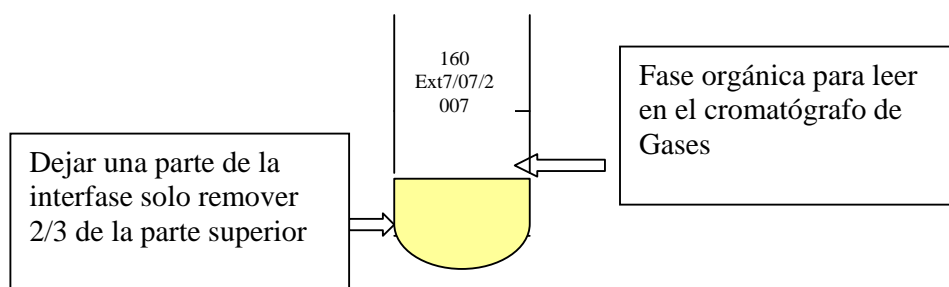
Los metil ésteres ácidos grasos son removidos de la fase acuosa y se transfiere para una fase orgánica con un procedimiento de extracción liquido-liquido. La combinación Hexano y metil ter butil éter son inflamables.

Se adiciono  $1.25 \pm 0.1$  ml de Reactivo de extracción a cada muestra, se tapó fuertemente y colocó en un rotor de laboratorio para agitar por 10 minutos, finalmente se removió con una pipeta pasteur cada fase de la base y descartar.

#### 4.5.5. Lavado

Para remover los ácidos grasos libres y reactivos residuales del extracto orgánico se adiciono una solución de 3ml del reactivo cáustico, se tapó fuertemente y agitó por 5 minutos adicionales al de la extracción en el rotor, para clarificar la interfase entre las fases cuando hubo emulsión presente se adicionó la solución sódica saturada.

La fase orgánica (superior) es removida en 2/3 a un vial de cromatografía, previamente identificada y etiquetada. La preparación es estable por 30 días. Ver Figura12.



**Figura 12. Representación de la fase orgánica e interfase antes de inyectar al GC.**

#### 4.6. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

El cromatógrafo usado fue un HP- 5890 split/splitless serie II- que uso como transportador ó carrier el hidrogeno a 30ml/min y 50psi, como makeup o gas auxiliar el nitrógeno a 30ml/min a 50 psi. Aire a 400ml/min a 60 psi. Para mantener la llama guardando una relación de 1/10 del hidrógeno aire. Y venteo o purga un flujo de 5ml/min. Antes de operar se calibro con un estándar comercial que es una mezcla de ácidos grasos saturados de 9-20 carbonos de largo (C9:0 a C20:0) y cinco hidroxí ácidos por ser sensibles a los cambios de presión /temperatura y contaminaciones en el portliner. La calibración fue cada 11 muestras para disminuir errores.



#### **4.6.1. Columna**

Se uso una columna capilar Agilent ultra HP-2 para un 5890 código 19091b-102 esta columna capilar de 25 m de largo x 0.2mm x 0.33 um de grosor de fenil metil silicona fundido en silica (Phenil methyl silicone fused silica capillary column) como fase estacionaria; de acuerdo a especificaciones técnicas del producto tiene las características para el análisis de extractos bacterianos. La columna es requerida para tener mas de 4000 platos teóricos por metro para picos con  $K= 7$  a 9. Sasser, 1990.

#### **4.6.2. Temperaturas**

Las temperaturas programadas en el cromatógrafo presentaron unas rampas de 170°C a 270°C con un incremento de 5°C por minuto seguido de una rampa de 310 a 40 °C/min

La llama del detector a 300 °C permite un buen rango dinámico y provee buena sensibilidad siendo el tiempo total de la corrida de 25 minutos.

### **4.7. Evaluación de las identificaciones**

#### **4.7.1. SIM**

Índice de similitud, o similaridad es un valor numérico que expresa cercanamente la composición de los ácidos grasos de uno desconocido con la composición de ácidos grasos de una cepa usada para crear la librería, la base de datos presenta el mejor apareamiento asociado por el índice de similaridad. Este valor es un cálculo generado por el software por medio de la distancia en la entrada de la librería, no es una probabilidad o un porcentaje, es una distancia relativa desde la media de la población, así un exacto apareamiento de los ácidos grasos

#### 4.7.2. Longitud de cadena equivalente (ECL)

El valor para cada ácido graso puede ser derivado de una función de su tiempo de elusión en relación a los tiempos de elusión de una serie de ácidos cadenas de ácidos grasos largos.

$$ECL_x = \frac{R_{tx} - R_m}{R_{t(n+1)} - R_m} + n$$

Donde:

- $R_{tx}$  es el tiempo de retención de los metil ester de ácidos grasos saturados procedentes de un microorganismo desconocido.
- $R_{t(n+1)}$  es el tiempo de retención de los metil ester de ácidos grasos saturados eluidos después del desconocido.

Por comparación de los estándares externos. El cromatógrafo de gases y la columna permite para ser calibrado o seteado alrededor de 0.010 ECL hasta dar una amplia precisión en resolución de isómeros.

Después de nombrar los picos de una muestra desconocida, Sherlock el software compara los valores de ECL para la serie más estable. Sasser 1990.

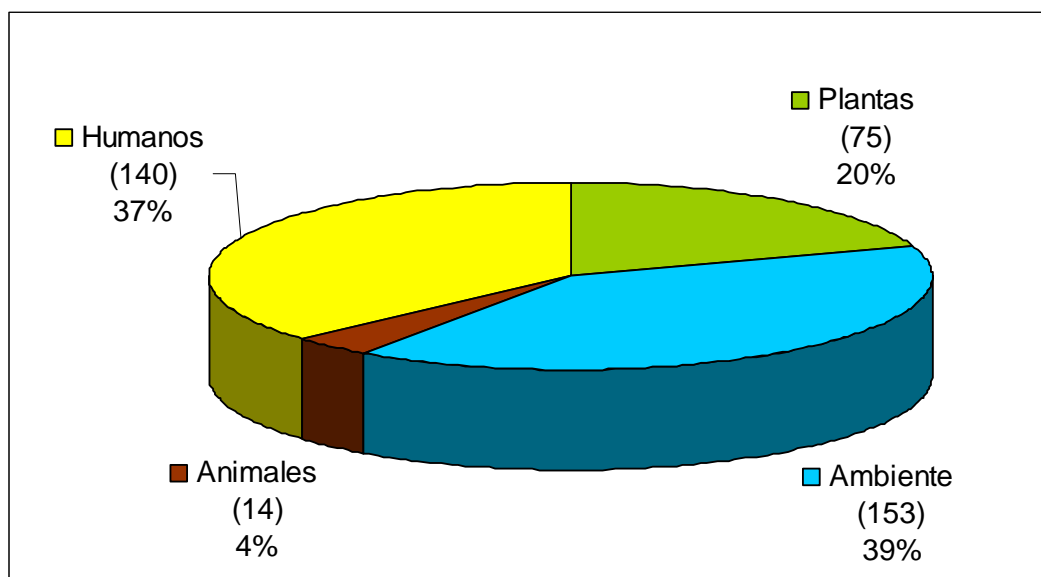
#### 4.8. Evaluación de la patogenicidad de las cepas aisladas

Para evaluar si los patógenos identificados afectan a bulbos de cebolla se elaboró una suspensión al 9% de cloruro de sodio con una asada, llevando a una concentración de  $10^5$  -  $10^6$  UFC aproximadamente e inoculó con esta suspensión en rodajas de cebolla sana, previamente colocadas en placas petri estériles para evaluarlas después de una semana a diez días si presenta o no descomposición y que tipo (húmeda o seca).

## V. Resultados

### 5.1. Reactivación de cepas

Después de analizar 382 cepas procedentes de aislamientos de cinco variedades de semilla de *Allium cepa*. L. “cebolla” se obtuvo microorganismos en un 20% que afectan cultivos de interés económico, 36% son patógenos de humanos, 4% patógenos de animales y 40% del ambiente. Ver figura 13.



**Figura 13. Distribución de microorganismos aislados a partir de cinco variedades de cebolla comercial.**

A su vez como se presenta en el anexo I. el mayor número de especies se dio para las cepas pertenecientes al ambiente, y la que tuvo menor cantidad de especies fueron las cepas con relación a los animales.

### 5.2. Pruebas bioquímicas

Para el caso de vegetales se obtuvo 75 cepas confirmadas como patógenas. Después de dividir por tinción Gram. Se obtuvo 3% de cepas gram positivas pertenecientes al género *Bacillus* y 97.7 % de gram negativas. Ver cuadro 7.

**Cuadro 7. Pruebas bioquímicas para las cepas que afectan cultivos vegetales de interés económico.**

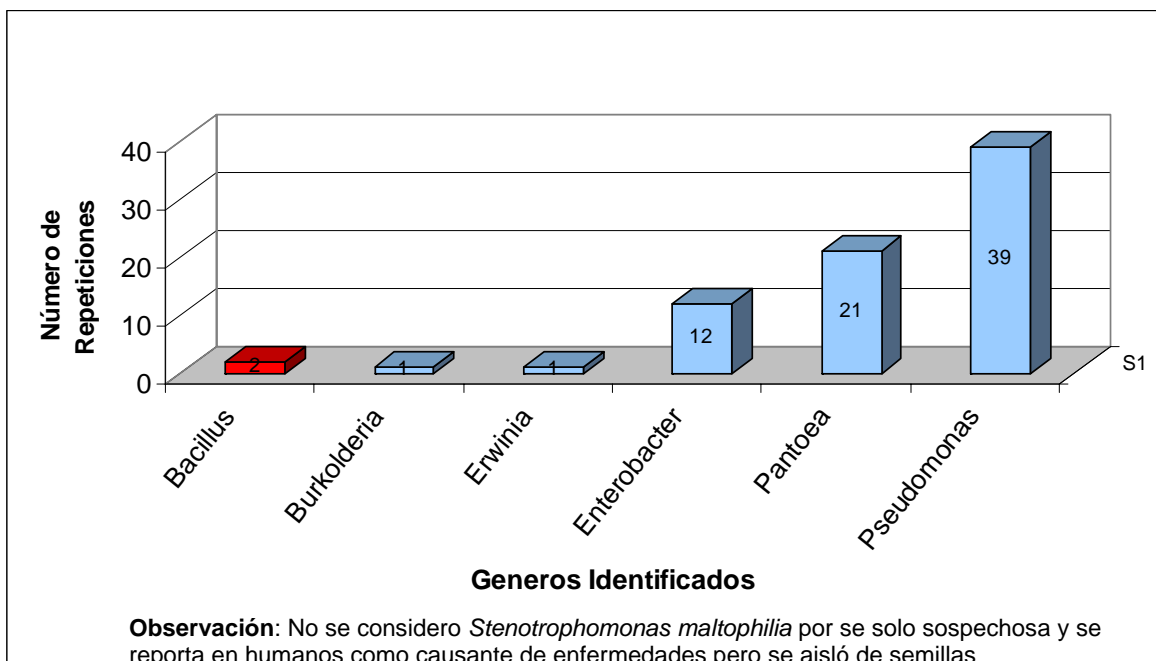
<b>Especies</b>	<b>KOH Prueba (Gram + ó -)</b>	<b>Anaerobio Facultativo</b>	<b>nitrito reductasa</b>	<b>Indol</b>	<b>Prueba de Oxidasa</b>	<b>cantidad</b>
<i>B. megaterium</i> GC subgroup A	+	-	+	-	+	1
<i>B. pumilus</i> GC subgroup B	No determinado					
<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgroup B (Ps. Cepacia=	-	-	-	-	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	+	-	-	12
<i>Erwinia rhapontici</i>	-	+	+	-	-	1
<i>P. agglomerans</i> GC subgroup B (Enterobacter)	-	+	+	-	-	6
<i>P. agglomerans</i> GC subgroup A	-	+	+	-	-	2
<i>P. agglomerans</i> GC Subgroup C (Enterobacter)	-	+	+	+	-	3
<i>P. agglomerans</i> GC subgroup D (Enterobacter )	-	+	+	-	-	1
<i>P. ananas</i> ( <i>Erwinia ananas</i> )	-	+	-	+	-	3
<i>P. ananas</i> ( <i>Erwinia uredovora</i> )	-	+	+	+	-	1
<i>P. ananatis</i> ( <i>Erwinia ananatis</i> )	-	+	-	-	-	3
<i>P. agglomerans</i> ( <i>Entb. agglomerans, Erwinia herbicola</i> )	-	+	+	-	-	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+, Z	-	+	8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype A	-	-	-	-	+	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype B	-	-	-	+	+	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype F	-	+	+	-	+	2
<i>Pseudomonas savastanoi</i> oleae	-	-		-	+	3
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxinus</i>	-	-	-	-	+	1
<i>Pseudomonas syringae</i> glicinea	-	+	-	-	+	1
<i>Pseudomonas syringae</i> syringae	-	+	-	-	-	6
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	-	-	+	-	+	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	+	-	-	12
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ( <i>Xanthomonas, Pseudomonas</i> )	-	-	+	-	-	3

La Especie *Stenotrophomonas maltophilia* la reporto como posible patógeno en plantas.

### 5.3. Resultados de la extracción de ácidos grasos metil esteres

De los 75 aislamientos pertenecientes al 20% se obtuvo un solo genero de gram positivas (*Bacillus*) y 5 géneros de gram negativas (*Burkolderia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas*) presentes en las semillas y afectan cultivos de importancia económica. Ver figura 14 y cuadro 7.

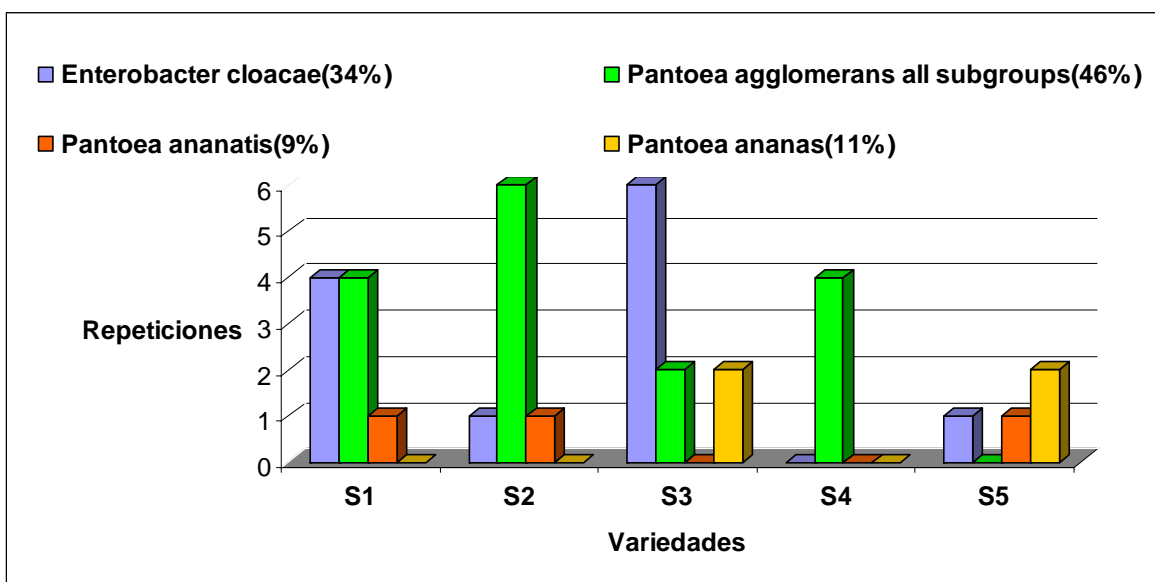
Para el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* a pesar de ser patógeno de humanos en este trabajo de investigación se observo como posible fitopatógeno, por atacar al follaje de *Allium cepa* L. Ver anexo II.



**Figura 14. Especies de patógenos encontrados en las semillas de *Allium cepa* L que afectan cultivos vegetales.**

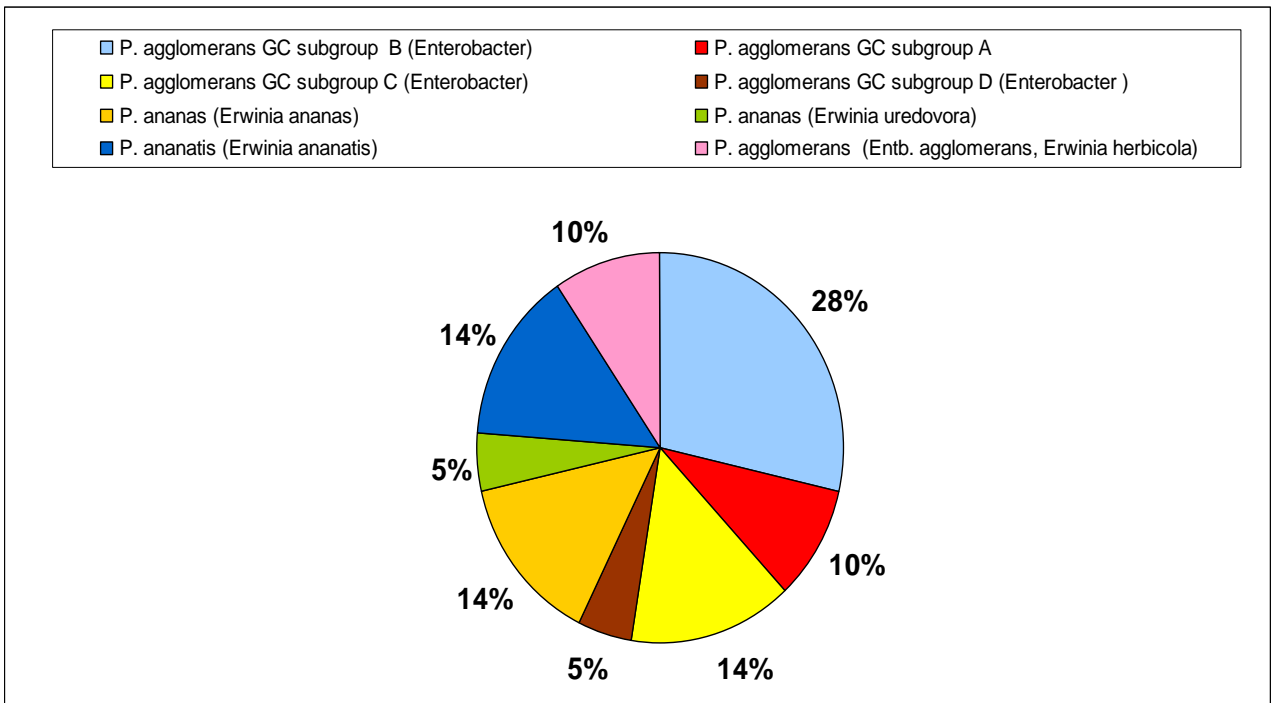
#### 5.4. La distribución microbiana en las cinco variedades de semilla de *Allium cepa* L.

El análisis de las cinco variedades muestra que la variedad S2 fue la de mayor cantidad de patógenos del género *Pantoea* y la variedad S3 presento mayor concentración de *Enterobacter cloacae*, ambos patógenos en semejante proporción se dio en la variedad S1. Todas las variedades por lo menos presentaron un patógeno de cebolla y 4 de ellas presentaron patógenos de otros cultivos también siendo la variedad S4 la que solo presento patógenos de cebolla y no de otros cultivos.



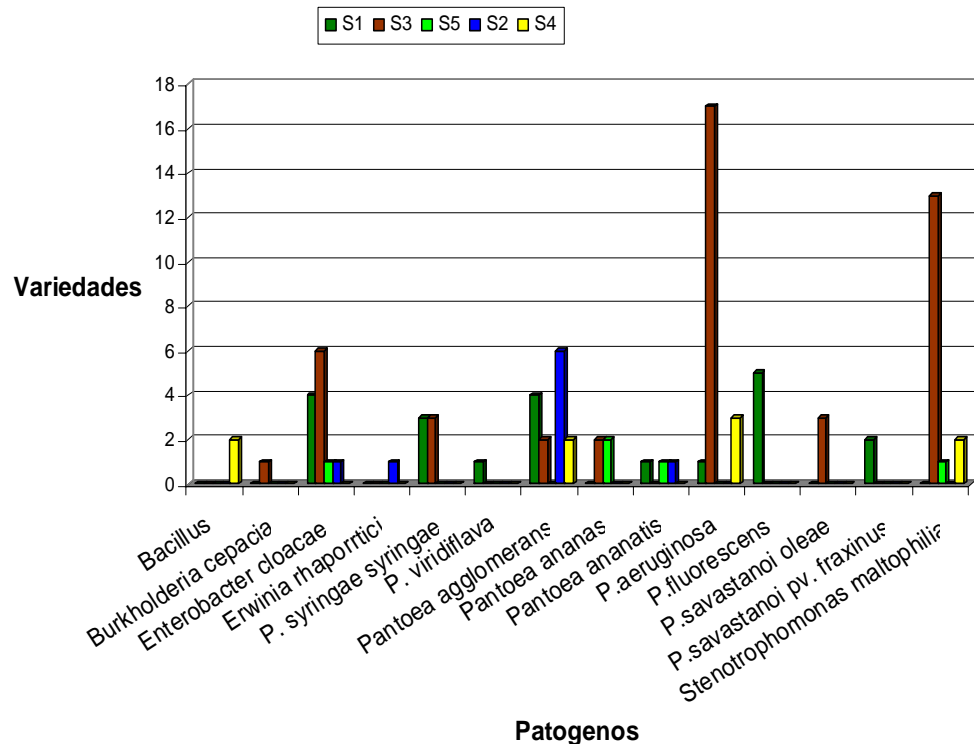
**Figura 15. Variedades de *Allium cepa* L. y patógenos identificados pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae**

El género *Pantoea* fue agrupado anteriormente para poder comparar con otros géneros, pero dentro del total de este género se determino 8 especies diferentes ver figura 16.



**Figura 16. Distribución de las especies del género Pantoea.**

A parte del Genero Pantoea se determino 9 diferentes especies de patógenos pertenecientes a otros cultivos y dos patógenos que atacan cebolla, así también otras especies que son de interés por afectar cultivos vegetales de importancia económica, ver figura 17.



**Figura 17. Bacterias Identificadas que afecta *Allium cepa* L. y otros cultivos vegetales.**

### 5.5. Distribución del SIM y ácidos grasos en el Género *Pantoea*

Después de analizar las cepas aisladas de las cinco variedades de semilla comercial y juntar todos los resultados que corresponden a *Pantoea agglomerans* y analizar el SIM (Índice de similitud) dentro del género *Pantoea* se observó un valor promedio mínimo de 0.589 perteneciente a la especie *Pantoea agglomerans* (*Entb. Agglomerans*, o reportada también como *Erwinia herbícola*). Y como máximo la especie *Pantoea agglomerans* GC subgroup A. con un promedio de 0.836 como se ve en el cuadro 9.

La distribución de los ácidos grasos se reporta en el cuadro 10. Diferenciándose cuatro subgrupos de *Pantoea agglomerans*.



**Cuadro 9. Distribución del SIM de las identificaciones pertenecientes al género *Pantoea*.**

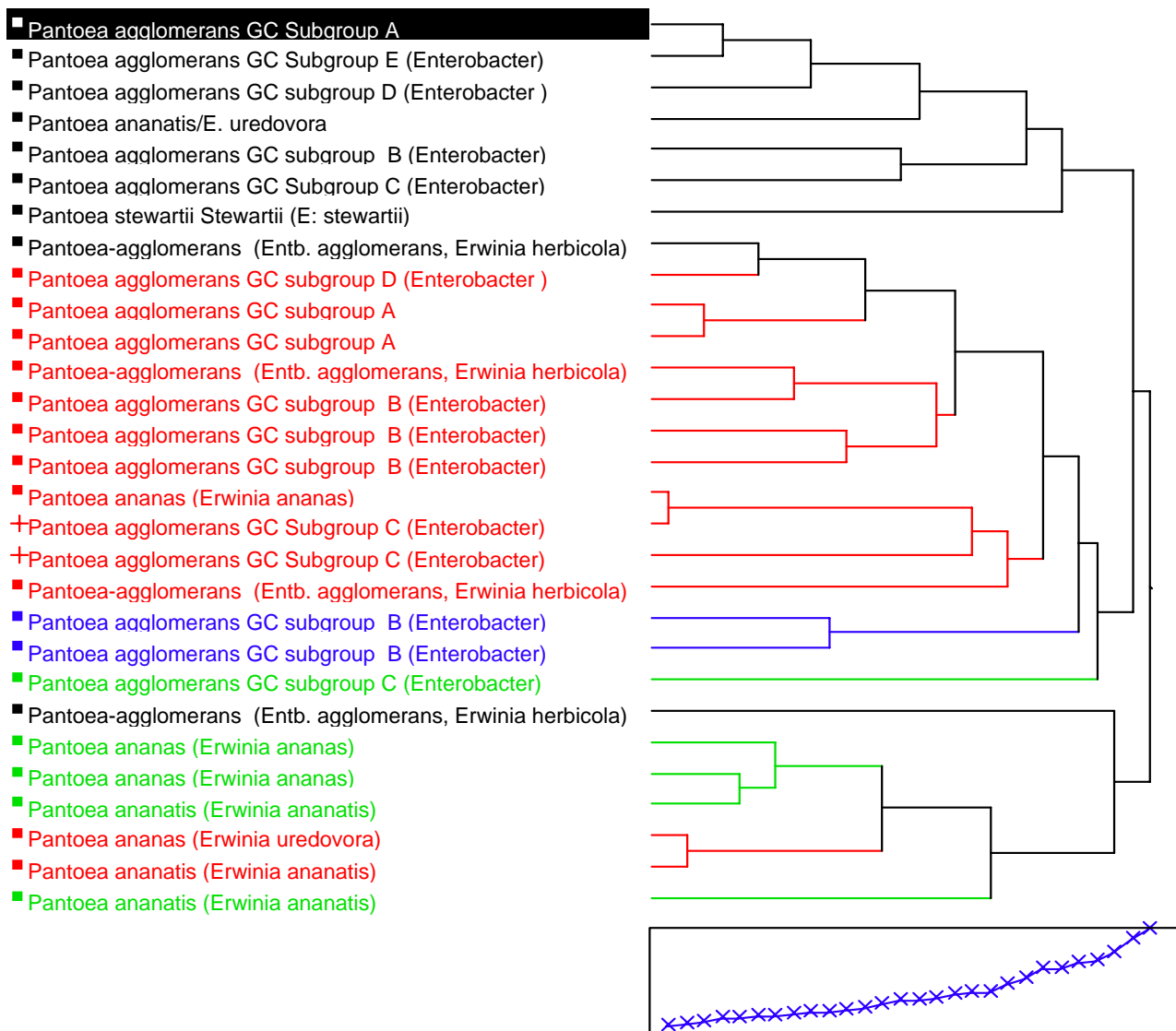
Identificaciones	Números de repeticiones	SIM		Nº de cepas SI valor de $\geq 0.50$	Nº de cepas SI valor de $\leq 0.50$
		Promedio	Rango		
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup B ( <i>Enterobacter</i> )	6	0.704	0.450-0.890	5(6)	1(6)
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup A	2	0.850	0.833-0.887	2	-
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup C ( <i>Enterobacter</i> )	3	0.711	0.70-0.723	3	-
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup D ( <i>Enterobacter</i> )	1	0.836	0.836	1	-
<i>Pantoea ananas</i> ( <i>Erwinia ananas</i> )	3	0.766	0.529-0.959	3	-
<i>Pantoea ananas</i> ( <i>Erwinia uredovora</i> )	1	0.644	0.644	1	-
<i>Pantoea ananatis</i> ( <i>Erwinia ananatis</i> )	3	0.700	0.497-0.832	2(3)	1(3)
<i>Pantoea</i> - <i>agglomerans</i> ( <i>Entb. agglomerans</i> , <i>Erwinia herbícola</i> )	2	0.589	0.445-0.732	1(1)	1(1)
<b>Total</b>	21	-	-	18(21)	3(21)

SIM: Índice de Similaridad.

**Cuadro 10. Ácidos grasos y clase total determinados para el género Pantoea.**

Acido graso y Clase total	<i>Pantoea-agglomerans</i> (Entb. agglomerans, <i>Erwinia herbicola</i> ) (2)*	<i>Pantoea agglomerans</i> GC Subgroup B (Enterobacter)(6)*	<i>Pantoea agglomerans</i> GC Subgroup A(2)*	<i>Pantoea agglomerans</i> GC Subgroup C (Enterobacter)(3)*	<i>Pantoea agglomerans</i> GC Subgroup D. (Enterobacter)(1)*	<i>Pantoea ananatis</i> ( <i>Erwinia ananatis</i> ) (3)*	<i>Pantoea ananatis</i> (4)*
12:00	5.945	4.24	3.45	6.06	4.24	4.33	5.02
13:00	0	0.075	0.035	0.24	0	0.046	0.035
Desconocido 13.957	0.45	0.375	0	0.7333	0	0.88	0.985
14:00	2.85	5.615	55.92	2.88	5.36	2.83	2.9
Desconocido 14.502	1.165	0.67	0.625	0.95	0.64	0.67	0.595
14:0 2OH	0	0	0	0	0	2.42	2.06
Sumas en 2 14:0 3OH/16:1 ISO I	9.25	9.18	8.2	8.31	8.5	8.59	8.8
16:0 N alcohol	0	0	0	0	0	0.34	0.22
Sumas en 3-16:1 Δ7C/15 iso 2OH	26.875	26.4	31.92	22.14	26.41	21.99	23.87
16:1 Δ5C	0	0.09	0.155	0.15	0.14	0.07	0.1015
16:00	26.485	28.45	30.19	28.41	28.51	30.04	30.16
17:0 Ciclo	4.61	11.72	7.43	10.09	2.17	4.67	4.11
17:00	0.205	0.426	0.2	0.97	0.1	0.56	0.35
17:0 10 metil	0	0	0	0	0	0.83	0.48
18:1 Δ7C	21.215	10.515	11.37	17.4	23.33	19.39	18.8
18:00	0.535	0.416	0.275	0.4	0.39	0.55	0.505
18:1 ISO H	0	1.2	0	0	0	0.88	0.38
19:0 ISO	0	0.01	0	0.08	0	0	0
19:0 Ciclo Δ8C	0	0.136	0.12	0.626	0	0.2	0.15
Características sumadas 2-14:0 3OH/16:1 ISO I	9.25	9.185	8.2	8.42	8.5	8.62	8.86
Suma de 3-15:0 SO2OH/16:1Δ7c	26.875	26.4	31.92	22.14	26.41	21.99	23.87

Si hacemos una comparación de estas especies determinadas en el cuadro 10 en base a los ácidos grasos presentes y representamos en un dendograma tendríamos la Figura 18.



**Figura 18. Dendograma generado en base a los ácidos grasos determinados para el género Pantoea**

Teniendo una distribución bien definida de *Pantoea agglomerans* y las pertenecientes a las *Pantoeas ananas* y *Pantoea ananatis*. y dándose la mayor distancia de *Pantoea agglomerans GC subgroup A* y *Pantoea agglomerans*

(*Entb. agglomerans*, *Erwinia herbicola*) siendo estas dos especies diferentes en composición de ácidos grasos a pesar de pertenecer al mismo género.

### 5.6. Distribución del SIM en los géneros de patógenos de cebolla diferente a *Pantoea*

*Stenotrophomonas maltophilia* tuvo 16 aislamientos con un SIM promedio de 0,64 y una identificación con SIM menor a 0,50, este aislamiento solo es considerado de ser sospechosa de producir enfermedad en plantas, pero si se puede aislar de material vegetal.

**Cuadro 11. Distribución del SIM determinado en los géneros de patógenos diferentes a *Pantoea***

Identificaciones	Números de repeticiones	SIM		Nº(%) de cepas SI valor de $\geq 0.50$	Nº(%) de cepas SI valor de $\leq 0.50$
		Promedio	Rango		
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	0.81	0.741-0.866	12	-
<i>Bacillus</i>	2	0.53	0.521-0.54	2	-
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0.107	0.107	-	1
<i>Erwinia rhaporttici</i>	1	0.718	0.718	1	-
<i>P. syringae syringae</i>	6	0.6372	0.467-0.809	5(6)	1(6)
<i>P. viridiflava</i>	1	0.694	0.694	1	-
<i>P.aeruginosa</i>	21	0.7336	0.321-0.966	17(21)	4(21)
<i>P.fluorescens</i>	5	0.611	0.428-0.809	3(5)	2(5)
<i>P.savastanoi oleae</i>	3	0.7123	0.658-0.807	3	-
<i>P.savastanoi pv. fraxinus</i>	2	0.649	0.605-0.807	2	-

SIM: Índice de Similitud.

### 5.7. Evaluación de la patogenicidad de las cepas aisladas e Identificadas como patógenas de *Allium cepa*. L

Después de Identificadas las especies citadas anteriormente como patógenas se inocularon en rodajas de cebolla fresca para ver si producía necrosis o descomposición de que tipo, obteniéndose una descomposición seca en su mayoría, de 55 pruebas 29 dieron positivas a este tipo de descomposición y 13 respondieron con alta descomposición húmeda y 13 como nula. Ver diferencia de descomposición húmeda y seca Ver figura 19.



Descomposición seca



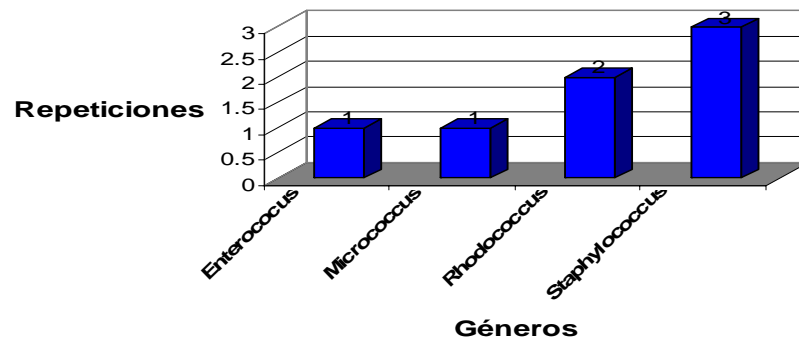
Descomposición húmeda

**Figura 19. Diferencias de una descomposición seca-húmeda en rodajas de cebolla fresca.**

Todos los síntomas fueron coherentes con pudriciones observadas naturalmente.

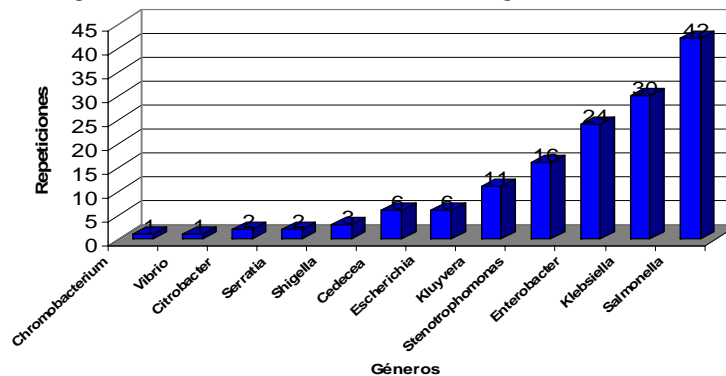
### 5.8. Patógenos que afectan animales, humanos y pertenecen al ambiente

Otro punto a resaltar son los patógenos de humanos, siendo estos no correspondientes a este estudio, pero se encontró la presencia de patógenos de especies que afectan humanos, clasificándose igualmente por medio tinción gram, donde se obtuvo 4 géneros de gram positivas siendo el género de *Staphylococcus*, el de mayor incidencia. Ver figura 20.



**Figura 20. Géneros de patógenos gram positivos que afectan Humanos**

Para el caso de los microorganismos gram negativos se tuvo la presencia de 12 géneros distintos siendo el de mayor incidencia el Género *Salmonella* y el de menor incidencia el género *Chromobacterium*. Ver figura 21.



**Figura 21. Géneros de patógenos gram negativos que afectan humanos**

## VI. Discusión

### 6.1. Reactivación de cepas y pruebas bioquímicas

Los resultados son relacionados con los reportados en el Manual de Bergey's a excepción de *Pseudomonas syringae syringae* que la encontramos como nitrato negativa siendo esta algunas veces que esta especie puede ser nitrato positiva como se reporta en el manual de Bergey's. así como *Pseudomonas viridiflava* se presenta como oxidasa positiva siendo esta algunas veces reportada como negativa, no se realizaron mas pruebas para esta especie por ser mínima la cantidad encontrada.

De igual manera reporta Braun & *et.al* a *Pseudomonas aeruginosa* como nitrato positiva pero para este trabajo algunas cepas respondieron como nitrato negativa pudiendo ser esta algún patovar diferente. Ver cuadro 7.

Cuando comparamos a *Pseudomonas fluorescens* entre biotipos se obtuvo diferencias por medio de las pruebas bioquímicas, siendo así entre *Pseudomonas fluorescens* biotipo A, biotipo B y biotipo F que este último respondió como positivo para anaerobio facultativo y nitrato reductasa en comparación con los dos primeros; para diferenciarlo a los biotipo A y B se usó pruebas de indol, *Pseudomonas fluorescens* biotipo A es indol negativo en comparación con el biotipo B que es positivo. Las pruebas bioquímicas convencionales siempre traen un grado de incertidumbre en la determinación de la especie si no se realiza otra herramienta de identificación adicional.

Al comparar *Pantoea ananas* (*E. ananas*) y *Pantoea ananas* (*E. uredovora*) en relación con *Pantoea ananatis* se observa que las diferencias se dan a nivel la prueba de Indol y Nitrato ya que *Pantoea ananas* es positiva indol en comparación

con ananatis. *Pantoea ananas* (*E. ananas*) con *Pantoea ananatis* no reaccionaron a la prueba de nitrato reductasa. Como si lo hace *Pantoea ananas* (*E. uredovora*). Mas adelante al reportar los ácidos grasos respectivos a este género si se observó diferencias; las pruebas bioquímicas convencionales no indican especificidad y traen confusión.

## 6.2. Identificación por medio de perfiles de ácidos grasos y evaluación

Todas las especies reportadas en el cuadro 7, se identificaron por medio de perfiles de ácidos grasos. Así Giatitis 1991; señala la identificación de patógenos de cebolla relativamente simple por medio de perfiles de ácidos grasos. De igual manera Sasser, 1990; Welch, 1991, citado por Norman & *et al* 1997; señalan a este método como el que minimiza costos, tiempo, permitiendo diferenciar un amplio número de cepas pertenecientes a bacterias fitopatógenas y saprofitas.

Cottyn B & *et al* 2000; señala que al analizar semillas de *Oriza sativa* L. "arroz" el 5% le inducía a necrosis superficial y era por causa de *Bacillus pumilus*, Esta especie presente también en las semillas de *Allium* y adicionalmente se presenta *Paenibacillus*. Siendo sus identificaciones hechas por análisis de ácido metil ester y Biolog System (Método basado en la Utilización de carbohidratos).

El género *Pantoea* y *Enterobacter* (cuadro 7), pertenecientes a una de las familias de patógenos predominantes las *Enterobacteriaceae*; donde el mayor porcentaje fue el perteneciente a *Pantoea agglomerans* con 46% del total, Ver figura 15. Seguido por *Enterobacter cloacae* con un 34% y un 11% de *Pantoea ananas* patógeno de *Ananas comosus* "piña"; según señala Cardona & *et.al.* 1994. *Erwinia ananas pv ananas* o *Pantoea ananas* es causante de la necrosis marrón del fruto de *Ananas comosus* ahora reportada en Venezuela, estado de Lara; finalmente *Pantoea ananatis* con un 9%, es el responsable de la lesión al tejido del cuello y posibles daños a diferentes escalas.



*Pantoea agglomerans* o llamada anteriormente *Erwinia Herbícola* se reporto en un 10%, siendo este un patógeno de amplia infección a cultivos de interés económico, así se determino en semillas de cebolla del valle de Quibor, Venezuela, la presencia de *Erwinia herbícola* después de analizar semillas de cebolla de tres cultivares de la zona. Martínez M. y et al. 1998.

Mansvelt & et al 1981 reporta un 16% de *Pantoea agglomerans* como patógeno de *Allium cepa* L. A nivel follaje, en floración y follaje (Hattingh & et al .1981) coincidiendo a nivel follaje; reportando en semillas y a su vez produciendo necrosis en bulbos a nivel el cuello (Gitaitis & et al.2003).

*Pantoea agglomerans* también se reporto en Sud África, pero estas cepas al ser comparadas con *P. agglomerans* de Georgia –USA no dieron síntomas semejantes lo que nos indicaría que son genotipos diferentes, pero sí *Pantoea ananatis* fue reportada por Giatitis 2003. como la causante de la muerte del follaje, afecciones a bulbo y muerte de la planta coincidiendo con los síntomas reportados para Sud África.

*Pantoea ananatis*, reportada en Georgia en 1997, esta última produciendo pudrición en la parte central del bulbo. Siendo la causa principal la pudrición de los ápices de germinados. En 1997 endémico en Georgia-USA. Giatitis.

Además Serrano 1928, Azad 2000, Brutton 1986 y Giatitis 2003, reportaron que *Pantoea ananatis* infecta *Eucalyptus spp*, *Cucumis melón* “Melón”, *Ananas comosus* ‘piña”, *Sorghum bicolor* L. “sudangrass”.

Durante el 2004-2005 en el Nor Este de Sud África *Pantoea ananatis* y *Pantoea agglomerans* afectaron de 10 a 70% los cultivos comerciales de *Zea mays* “maíz” con presencia de manchas marrones dentro del tallo, ruptura del primer nudo interno, con pardeamiento interno del tallo en dirección al ápice, sin permitir el desarrollo del fruto (coronta con los granos de maíz). Goszczyńska T. 2007.

La calidad de la cebolla ha sido afectada por diferentes patógenos, ver figura 17 así 2% de *Pseudomonas viridiflava* por ser causante de pudriciones en raíz, formar estrías en hoja (leaf streak) y ocasionando necrosis en bulbo de cebolla (bulb rot) bajo condiciones de humedad y frío (Gitaitis, R.D & et al 1991).

Con un 10% se reporta a *Pseudomonas syringae syringae* como causante de manchas foliares esta última causante de producir necrosis en hojas de cebolla bajo ciertas condiciones de crecimiento (Van hall citado por Davis, 1999).

De igual manera Dorothy H et al. 2006, reporto a *Pseudomonas syringae* como patogénica de bulbos de cebolla, ajos, challots, donde determinaron que todas las cepas de Nueva Zelanda, California, Francia era las mismas genéticamente con excepción de las cepas de procedencia japonesa, y a su vez ellos mantiene la hipótesis que fue a partir de los almácigos. Ver figura 17.

*Pseudomonas syringae pv. tomato* fue reportado por Masao Goto 1992, como un patógeno que ha estado presente en semillas secas de *Solanum lycopersicum* “tomate” por 20 años. La capacidad longeva de bacterias patogénicas es largamente dependiente de la capacidad de producir polisacáridos extracelulares. Dando la posibilidad que las bacterias son capaces de mantenerse en las semillas por largos periodos de tiempo.

Trujillo & et al. 1998, reporto a *Pseudomonas fluorescens* como patógeno de cebolla, encontrada en campos de Venezuela del área de Quibor, después de analizar 9 variedades de semilla suministrada por los productores de esa zona, coincidiendo con nuestro estudio en los que la presencia de *Pseudomonas fluorescens* esta en un 9% y diferentes biotipos como el A, F, y B; en la Variedad S1, única variedad que nos dio esta especie. Ver figura 17.

Identificamos en nuestro estudio un 27% de *Stenotrophomonas maltophilia* patógena de humanos, pero comúnmente se aísla de plantas (Norman D.J. & et.al 1997); lo incluimos como sospechosa de afectar al cultivo de cebolla, causando estrías foliares a concentraciones altas mayores a  $10^5$  UFC.

En campo también hemos observado el síntoma con estrías foliares sospechando que existe alguna especie de este género que puede producir enfermedad en *Allium cepa* L.

Pertenciente a la familia de las Enterobacteriáceas también se identificó un 16% de *Enterobacter cloacae*, esta bacteria de amplia distribución en la naturaleza se ha reconocido como patógeno nosocomial también, pero Neto & et al 2003 reporta que ha sido encontrado en muchos insectos como simbiote o entomopatogénico en las superficies vegetales; Coger & Dowling (1986) citado por Neto 2003 señalan la patogenicidad en cebollas almacenadas, Bshop & Davis 1990 citado por Neto 2003 encontraron algunas cepas de *E. cloacae* de origen clínico que también fue patogénico en papaya y cebollas. *E. cloacae* también se reporto como Patógeno de semillas de Macadamia nut y patógeno de otros cultivos como *Carica papaya* L. "papaya", *Zingiber officinale* "Kion". (Kaneshiro & et al. 2003). *E. cloacae* ocasiona necrosis o descomposición húmeda en bulbos de *Allium cepa* "cebolla".

De las 9 especies citadas en la figura 17, se conoce que dos afectan bulbos de cebolla y este se presenta en otros cultivos.

Todo nos muestra que en las semillas hay un gran porcentaje de patógenos viables.

### **6.3. Distribución del SIM y ácidos grasos en el género Pantoea**

El valor promedio mínimo de SIM fue 0,589 perteneciente a la especie *Pantoea agglomerans* (*Entb. Agglomerans*, o reportada también como *Erwinia herbícola*). Y como máximo la especie *Pantoea agglomerans* GC subgroup A. con un promedio de 0,836 dentro de las 21 repeticiones, dentro del mismo género se observa la mayor similitud a 0,5 lo que nos indicaría que el trabajo fue conducido a condiciones de crecimiento constante a temperaturas de 28 °C+/- 1 y un medio

semejante, ya que el análisis celular de cepas crecidas en un caldo y versus un agar muestran diferencias substanciales reportadas por Lechevalier 1982.

La edad de las células también es otro factor de influencia pero por obtenerse solo 3 cepas con similitud menor a 0,5 podríamos decir que para las bacterias de este género generalmente al ser cosechadas en fase estacionaria bajan los ácidos grasos saturados e incrementan las insaturaciones y ácidos grasos ciclo propanos comprobando que las cepas analizadas no sufrieron largas incubaciones y fueron cosechadas a las 24 hrs. como máximo.

De igual manera para este género *Pantoea* se hizo una comparación de los ácidos grasos presentes y si se observa que para las *Pantoeas ananas* y *Pantoeas ananatis* se da la presencia del hidroxí alfa ácido 14:0 2OH con la presencia de dos OH en el carbono 14 que se puede considerar como determinante entre especies de este mismo género. Ver cuadro 10.

De otro lado 16:0 N alcohol, con pobre presencia igual que 16:1  $\Delta^5C$  con doble enlace en el quinto carbono y ausencia de las cadenas ramificadas de 19:0 ISO y trazas del ciclo 19:0  $\Delta^8C$ . no influyen en la diferenciación de especies por ser menor a 0.5, así Miller y Berger 1985 señalan que cuando se compara perfiles de picos a partir de ácidos grasos metil ésteres menores de 0,5% del porcentaje del área total no se considera un indicador de especies relacionadas.

Siendo así para el caso de 17:0 10 metil y de las cadenas ramificadas 18:1 ISO H con excepción de las *Pantoea agglomerans* subgrupo B. que presenta también en mayor proporción que las *Pantoea ananas* y *P. ananatis*. Se podría considerar como los ácidos grasos que nos definen los subgrupos dentro de *Pantoeas*

Por otro lado *Pantoea agglomerans* (*Entb. agglomerans*, *Erwinia herbícola*) no presenta el ácido 13:0 en cadena larga,

Para el caso de las *Pantoeas agglomerans* subgrupos A, B, C, D, presentaron trazas de un ácido desconocido 14.502, 16:1  $\Delta^5C$ , Esteárico 18:0, siendo solo el subgrupo D que no presentó el ácido 13:0. Ver cuadro 10.

Lechevalier MP. 1982; Señala a las *Entero bacteriáceas* como la familia que ha reportado la presencia de ciclo propanos con excepción de *Proteus vulgaris*, además de la presencia de saturaciones e instauraciones propias de esta familia estableciendo una regla general que la cantidad de ciclopropanos excede a los ácidos grasos insaturados presentes en la fase estacionaria.

#### **6.4. Distribución del SIM determinado para los géneros diferentes a Pantoea**

Todas las especies consideradas como patógenos se presentaron con un rango mayor a 0,5 con excepción de *Burkholderia cepacia*, siendo el medio de crecimiento que pudo afectar ya que Buyer J. 2003, obtiene 0,877 de SIM para *Burkholderia* crecida en agar sangre (Blood Agar) en comparación con las cepas crecidas en TSBA que presentó un SIM de 0,375, lo que ocurre opuestamente con *Pseudomonas aeruginosa*, presenta un SIM de 0,733 en TSBA 40 en relación a un SIM de 0,485 en agar sangre., El medio jugaría un rol determinante en algunas especies. Osterhout G & *et al.* 1991, obtuvo un SIM promedio de 0.57 en un rango de 0,04-094, en comparación a nosotros que obtuvimos un promedio de 0,73 y un rango de 0,321-0,966. Todo crecido en TSBA.

*Stenotrophomonas maltophilia* con un SIM promedio de 0,64, seguida por dos repeticiones de *P. fluorescens* que presentó como mínimo 0,4 de SIM, siendo este mínimo valor mayor al reportado por Osterhout & *et al* 1991 que presenta un mínimo de 0,01 y un promedio para *Pseudomonas fluorescens* de 0,47.

De otro lado se observa que todas las cepas analizadas e identificadas de *Enterobacter cloacae* presentaron un SIM promedio de 0,81, *Erwinia rhapontici* que se presentó en la variedad MataHari con un SIM 0,7, *P. syringae syringae* con un SIM promedio de 0,63 ver cuadro 11.

## VII. Conclusiones

- De los aislamientos pertenecientes a las cinco variedades de semillas de *Allium cepa*. L se identificó 30% de patógenos que afecta humanos, 20% afecta cultivos vegetales de interés económico, 4% animales y 40% ambientales. Después de ser identificados por cromatografía gaseosa se encontró dentro de las *Enterobacteriaceae* un mayor porcentaje perteneciente a *Pantoea agglomerans* con 46% del total, seguido por *Enterobacter cloacae* con un 34%, 11% de *Pantoea ananás*, y *Pantoea ananatis* con un 9%.
- *Pantoea agglomerans* al ser comparada dentro de su mismo género muestra cuatro subgrupos (A,B,C,D) y unas denominadas solo *Pantoea agglomerans* quienes presentaron gran similitud en su composición de ácidos grasos con el subgrupo A; el género *Pantoea* presentó ácidos grasos dentro del rango de C9:C20 mostrando las mayores concentraciones en C14:0, 16:0, 17:0 cyclo, 18:1Δ7C.
- Todas las variedades analizadas presentaron patógenos, la mayor diversidad del género *Pantoea* se obtuvo en la variedad S2, la mayor concentración de *Enterobacter cloacae* se obtuvo de la variedad S3, ambos patógenos se presentaron en proporción semejante en la variedad S1, siendo la variedad S4 de cebolla roja la única que presentó solo patógenos de cebolla y no de otros cultivos.
- Se demuestra que hay bacterias patógenas de plantas y que estas pueden afectar el bulbo de cebolla por medio de una descomposición seca en un 53% a condiciones de laboratorio y húmeda en 24% inoculadas con (*Pseudomonas viridiflava*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea ananatis*).

- De los 382 aislamientos analizados el 3% fueron bacterias Gram positivas y 97 % gram negativas, respectivamente de las cuales el 20% afecta *Allium cepa* L. y cultivos vegetales de interés económico.

## **VIII. Recomendaciones**

- Se recomienda un control de las semillas de importación para los cultivos vegetales por ser fuente de inóculos para nuevas enfermedades virales, bacteriana o por hongos, si no se toma el debido control.
- Se recomienda generar un mínimo permitido de unidades formadoras de colonia (UFC). Como un estándar de control para las semillas o material vegetal que se importa al Perú.



## **IX. Anexos**

**Anexo I. Distribución de cepas y géneros aislados a partir de semillas de cebolla comercial.**

<b>Fuente</b>	<b>Número de Cepas</b>	<b>Número de Géneros</b>
<b>Plantas</b>	76	6
<b>Ambiente</b>	153	12
<b>Animales</b>	14	3
<b>Humanos</b>	139	16
<b>total</b>	382	37

**Anexo II. Porcentaje de patógenos encontrados en las semillas de *Allium* sp. L que afectan humanos.**

<b>Tipo de Tinción</b>	<b>Número de cepas</b>	<b>Número de Géneros</b>	<b>Porcentaje por total de repeticiones</b>	<b>Porcentaje por total de Géneros</b>
Gram Positivas	7	4	5	25
Gram Negativas	143	12	95	75
<b>total</b>	150	16	100	100

**Anexo III. Géneros reportados como patógenos de humanos.**

<b>Tipo de Tinción</b>	<b>Géneros</b>	<b>Número de repeticiones</b>
<b>Gram Negativos</b>	Chromobacterium	1
	Cedecea	6
	Citrobacter	2
	Enterobacter	12
	Escherichia	6
	Klebsiella	30
	Kluyvera	11
	Salmonella	42
	Serratia	2
	Shigella	3
	Stenotrophomonas	16
	Vibrio	1
	<b>Gram positivos</b>	Enterococcus
Micrococcus		1
Rhodococcus		2
Staphylococcus		3
<b>Total</b>		<b>139</b>

**Anexo IV. Géneros de microorganismos encontrados en las semillas de  
*Allium sp. L* pertenecientes al ambiente.**

<b>Tipo de Tinción</b>	<b>Géneros</b>	<b>Cantidad de cepas</b>	<b>Número de Géneros</b>
Gram Positivas	Enterococcus	1	1
	Enterobacter	32	11
Gram Negativas	Aquaspirillus	3	
	Escherichia	4	
	Exiguobacter	1	
	Klebsiella	1	
	Micobacterium	1	
	Pandoraea	1	
	Paucimonas	4	
	Pseudomonas	98	
	Variovorax	1	
	Yersinia	6	
<b>Total</b>		153	12

**Anexo V. Número de cepas y porcentajes de repeticiones -géneros pertenecientes al ambiente.**

<b>Tipo de Tinción</b>	<b>Número de cepas</b>	<b>Número de Géneros</b>	<b>Porcentaje por total de repeticiones</b>	<b>Porcentaje por total de Géneros</b>
Gram Positivas	1	1	1	8
Gram Negativas	152	11	99	92
<b>Total</b>	153	12	100	100

**Anexo VI. Porcentaje de patógenos encontrados en las semillas de *Allium sp.* L que afectan animales.**

<b>Microrganismos que afectan Animales</b>			
<b>Tipos de Tinción</b>	<b>Géneros</b>	<b>Cantidad de cepas</b>	<b>Numero de Géneros</b>
Gram Positivas	Bacillus	2	2
	Enterococcus	3	
Gram Negativas	Pseudomonas	9	1
Total		14	3

**Anexo VII. Número de cepas y porcentajes de repeticiones - géneros pertenecientes a microorganismos que afectan animales.**

<b>Tipo de Tinción</b>	<b>Número de cepas</b>	<b>Número de Géneros</b>	<b>Porcentaje por total de repeticiones</b>	<b>Porcentaje por total de Géneros</b>
Gram Positivas	5	2	36	67
Gram Negativas	9	1	64	33
<b>Total</b>	14	3	100	100

**Anexo VIII. Formato de Identificación en la torre de cromatografía y controles internos usados para el proceso.**

<b>Extractor</b>		<b>Ingreso de Datos</b>	
Nombre	_____	Nombre	_____
Fecha	_____	Fecha	_____
	<b>Identificación de Muestra</b>		<b>Posición #</b>
1	Calibración		
2	_____		
3	_____		
4	_____		
5	_____		
6	_____		
7	_____		
8	_____		
9	_____		
10	_____		
11	_____		
12	_____		
13	Calibración		
14	_____		
15	_____		
16	_____		
17	_____		
18	_____		
19	_____		
20	_____		
21	_____		
22	_____		
23	_____		<b>Lot #</b>
24	_____		Calibración mix
25	_____		Reagent #1
26	_____		Reagent #2
27	_____		Reagent #3
28	_____		Reagent #4
29	_____		Saturaded NaCl/H2O
30	_____		

**Anexo IX. Relación total de especies identificadas a partir de  
aislamientos de cinco variedades de cebolla comercial.**

<b>Especies</b>	<b>ECL</b>	<b>SIM</b>	<b>Número de picos</b>	<b>Repeticiones</b>
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	0.0027	0.28	10	3
<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A	0.0020	0.52	12	1
<i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B	0.0020	0.54	13	1
<i>Bacillus sphaericus</i> GC subgroup E	0.0010	0.49	8	1
<i>Bacillus-mycoides</i> -GC subgroup A ( <i>Bacillus cereus</i> group)	0.0020	0.41	13	1
<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgroup B ( <i>Ps. Cepacia</i> =	0.0020	0.11	8	1
<i>Cedecea davisae</i>	0.0028	0.59	8	5
<i>Cedecea neteri</i>	0.0030	0.51	8	1
<i>Chromobacterium-violaceum</i>	0.0020	0.91	4	1
<i>Citrobacter freundii</i>	0.0030	0.81	8	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.0025	0.82	8	2
<i>Enterobacter aerogenes</i> GC subgroup A	0.0040	0.93	8	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> GC subgroup B	0.0040	0.80	8	2
<i>Enterobacter cancerogenus</i> ( <i>Erwinia cancerogena</i> )	0.0028	0.74	9	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0026	0.82	7	12
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0.0026	0.69	8	29
<i>Enterobacter intermedius</i>	0.0033	0.67	7	3
<i>Enterococcus faecalis</i> GC Subgroup A	0.0040	0.40	3	1
<i>Enterococcus avium</i>	0.0030	0.47	2	1
<i>Enterococcus casseliflavus/gallinarum</i> ( <i>Streptococcus</i> )	0.0025	0.55	3	2
<i>Enterococcus-faecium</i> -GC subgroup B ( <i>Streptococcus faecium</i> )	0.0020	0.51	4	1
<i>Erwinia rhapontici</i>	0.0020	0.72	5	1
<i>Escherichia coli</i> GC subgroup D (DNA homology with <i>Shigella</i> )	0.0030	0.66	7	1
<i>Escherichia coli</i> GC subgroup F (DNA homology with <i>Shigella</i> )	0.0020	0.77	8	1
<i>Escherichia coli</i> -GC subgroup C (DNA homology with <i>shigella</i> )	0.0020	0.74	7	2
<i>Escherichia fergusonii</i>	0.0030	0.71	8	1
<i>Escherichia vulneris</i>	0.0037	0.59	5	3
<i>Escherichia-coli</i> -GC subgroup E (DNA homology with <i>Shigella</i> )	0.0025	0.64	8	2
<i>Exiguobacter m...</i> Gc Subgroup	0.0020	0.20	15	1
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> GC subgroup B	0.0026	0.80	8	28
<i>Klebsiella planticola</i>	0.0010	0.91	9	1
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> GC subgroup A	0.0025	0.77	8	2
<i>Kluyvera cryocrescens</i> GC subgroup B	0.0025	0.78	8	4
<i>Kluyvera cryocrescens</i> GC subgroup A	0.0032	0.78	9	5
<i>Kluyvera cryocrescens</i> GC subgrupo C	0.0030	0.65	9	2
<i>Micobacterium lacticum</i>	0.0020	0.83	9	1
<i>Micrococcus-lylae</i> -GC subgroup A	0.0020	0.93	11	1
<i>Pandoraea pnomenusa</i>	0.0010	0.23	9	1
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup B ( <i>Enterobacter</i> )	0.0027	0.70	7	6
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup A	0.0015	0.85	8	2
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup C ( <i>Enterobacter</i> )	0.0047	0.71	7	3

<b>Especies</b>	<b>ECL</b>	<b>SIM</b>	<b>Número de picos</b>	<b>Repeticiones</b>
<i>Pantoea agglomerans</i> GC subgroup D ( <i>Enterobacter</i> )	0.0020	0.84	7	1
<i>Pantoea ananas</i> ( <i>Erwinia ananas</i> )	0.0017	0.77	8	3
<i>Pantoea ananas</i> ( <i>Erwinia uredovora</i> )	0.0010	0.64	8	1
<i>Pantoea ananatis</i> ( <i>Erwinia ananatis</i> )	0.0027	0.70	8	3
<i>Pantoea-agglomerans</i> ( <i>Entb. agglomerans</i> , <i>Erwinia herbicola</i> )	0.0020	0.59	6	2
<i>Paucimonas lemoignei</i>	0.0023	0.58	6	4
<i>Pseudomonas mendocina</i>	0.0020	0.76	9	1
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0.0010	0.72	8	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.0060	0.73	8	21
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	0.0010	0.67	8	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype A	0.0025	0.75	6	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype B	0.0010	0.43	2	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotype F	0.0030	0.56	6	2
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	0.0023	0.80	6	6
<i>Pseudomonas putida</i>	0.0050	0.58	6	1
<i>Pseudomonas putida</i> biotype A	0.0018	0.76	7	90
<i>Pseudomonas putida</i> biotype B	0.0038	0.36	8	5
<i>Pseudomonas savastanoi</i> oleae	0.0043	0.71	7	3
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxinus</i>	0.0015	0.65	5	2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.0020	0.88	9	1
<i>Pseudomonas syringae</i> glicinea	0.0020	0.80	7	1
<i>Pseudomonas syringae</i> syringae	0.0028	0.64	6	6
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	0.0040	0.70	10	1
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	0.0040	0.69	2	1
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.0040	0.31	9	1
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> GC subgroup C	0.0030	0.77	4	1
<i>Salmonella choleraesuis</i> diarizonae	0.0040	0.87	9	1
<i>Salmonella bongori</i>	0.0030	0.89	6	3
<i>Salmonella choleraesuis</i> choleraesuis	0.0025	0.87	8	2
<i>Salmonella choleraesuis</i> choleraesuis GC subgroup A	0.0020	0.86	6	1
<i>Salmonella choleraesuis</i> choleraesuis GC subgroup B	0.0032	0.78	10	5
<i>Salmonella choleraesuis</i> diarizonae	0.0030	0.83	9	10
<i>Salmonella choleraeuis</i> houtense	0.0020	0.81	7	2
<i>Salmonella thyphimurium</i> GC Subgroup A	0.0022	0.82	8	15
<i>Salmonella thyphimurium</i> GC Subgroup B	0.0045	0.66	9	2
<i>Salmonella vongori</i>	0.0040	0.62	8	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.0025	0.80	8	2
<i>Shigella boydii</i> GC subgroup B (high DNA homo. With <i>E. coli</i> )	0.0050	0.81	7	1
<i>Shigella dysenteriae</i> (high DNA homology with <i>E. coli</i> )	0.0020	0.85	7	2
<i>Staphylococcus equarum</i>	0.0020	0.77	13	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.0010	0.45	14	1
<i>Staphylococcus-schleiferi</i>	0.0030	0.07	7	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.0021	0.64	15	13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ( <i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> )	0.0020	0.65	17	3
<i>Variovorax paradoxus</i> GC subgroup A ( <i>Alcaligenes paradoxus</i> )	0.0060	0.53	5	1
<i>Vibrio hollisae</i>	0.0030	0.37	5	1
<i>Yersinia frederiksenii</i>	0.0017	0.60	7	6



## XI. Referencias Bibliográficas

1. Acosta AR, Gaviota JC. Manual de producción de semilla de cebolla. Red de cooperación técnica en Producción de cultivos alimenticios FAO. E Instituto nacional de Tecnología Agro. Santiago. 50p. 1989.
2. Atlas RM, Bartha R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4<sup>ta</sup> edición Addison Wesley. 2002;Cap 4.
3. Azad HR, Colmes GJ and Cooksey DA. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. Plant Dis. 2000. 84:973-979.
4. Bailey LH. The standard cyclopedia of Horticulture. Eds. MacMillan. USA-NY; 1929.
5. Braun AK, Sands DC. Gram negative Bacteria "*Pseudomonas*". Third edition. Shaad NW, Jones JB, Chun W. Editors. Plant Pathogenic Bacteria. APS Press; 2001
6. Brewster JL. La cebolla y otros Alliums. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. 2001. Cáp.2:21-43.
7. Brewster JL. Physiology of crop growth and bulbing. Onions and allied crops. Eds HD Rabinowitch and JL. Brewster CRC Press.1990. Vol 1: 53-88.
8. Brutton BD, Wells JM Lester GE. Pathogenicity of *Erwinia ananas* muskmelon in Texas. (abst) phytopathology . 1986. 76: 1136.
9. Buyer Jeffrey S. Improved fast gas chromatography for FAME analysis of Bacteria. Journal of Microbiological methods. 2003. 54 : 117-120.
10. Córdoba SC, Martínez PL, Muñoz GR. Iris yellow spot virus: A New Onion disease in Spain. Plant Dis. 2005.89:1243.
11. Cottyn B, Regalado E, Lanoot B, de Cleene M, Mew TW, Swings J. Bacterial population associated with rice seed in the tropical environment. Phytopathology. 2001. 91:282-292.
12. Creamer R, Sanogo S, Moya A, Romero J, Molina BR, Cramer C. Iris yellow spot virus on Onion in New Mexico. Plant DIS. 88: 1049.

13. Crowe F J, Pappu H R. Outbreak of Iris yellow spot virus in Onion Seed Crops in Central Oregon. *Plant Dis.* 89:105.
14. Díaz R, Gamazo C, López GI. Manual práctico de microbiología Editorial Masson, 2da edición. Cap. 17. 1999.
15. DIFCO, 1999. Nitrate A, Nitrate B and Nitrate C reagent droppers. Becton Dickinson Microbiology systems. Spanish page 7-9pp. <http://www.bd.com/microbiology>.
16. Dorothy H, Noblel EJ, Cotherl DL, Hailstones M, Oxspring L, Hall B. Characterization of *Pseudomonas syringae* strains associated with a leaf disease of leek in Australia. *European Journal of plant Pathology.* 2006; Aug. 15(4): 419-430.
17. Du Toit L J, Pappu HR, Druffel KL, Welter GQ. Iris Yellow Spot Virus in onion bulb and Seed crop in Washington. *Plant Dis.* 2004; 88:222. Publisher on line as D-2003 -1201-03N, 2004.
18. Fritsch RM; Friesen N. Evolution, Domestication and taxonomy. *Allium* crop Science: Recent Advances Eds H.D. Rabinowitch and I. Currah. 2002. Chapter 1. pp 5-7.
19. Gavini FJ, Mergaert A, Beji C, Mielcarek D, Izard K, Kersters, De ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen nov. as *Pantoea dispersa* sp. Nov. *Journal Syst. Bacteriol.* 1989. 39: 337-345.
20. Gitaitis RD, Baird RE, Beaver RW, Summer DR, Gay JD, Smittle DA. Bacterial Blight of sweet onion caused by *Pseudomonas viridiflava* in *Vidalia* Georgia. *Plan Dis.* 1991. Jun. 75: 1180-1182.
21. Gitaitis RD, Sanders FH, Walcott RR, Burrell D. Bacterial leaf blight and bulb rot of onion in Peru caused by *Pantoea agglomerans* and *P. ananatis*. *Plant pathology online.* 2004.
22. Gitaitis RD, Walcott RR, Wells ML, Diaz Perez JC, Sanders FH. Transmission of *Pantoea ananatis*, Casual Agent of center Rot of Onion, by tobacco thrips, *Frankliniella fusca*. *Plant Dis.* 2003. June. 87:675-678.

23. Goszczynska T, Botha WJ, Venter SN, Coutinho. Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. *Plant Dis.* 2007 Jun; 91(6):711-718.
24. Goto M. Life cycles and dispersal of plant pathogenic prokaryotes. *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology.* Tokyo. Academic Press; 1992. P.184-283.
25. Hanlet P. Taxonomy, evolution and history. Onions and allied crops In H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds). CRC Press, Boca Raton, FLa.1990; Vol 1 :( 1-26).
26. Hatting MJ and Walters DF. Stalk and leaf necrosis of onion caused by *Erwinia herbicola*. 1981. *Plant Dis.* 65:615-618.
27. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey'S Manual of Determinative Bacteriology.* Ninth Edition Maryland. USA. 1994.
28. Humeau L, Roumagnac P, Picard Y, Robene-Soustrade I, Chiroleu F, Gagnevin L, Pruvost O. Quantitative and Molecular epidemiology of Bacterial Blight of Onion in Seed production fields. 2006. *Phytopathology* 96: 1345-1354.
29. Kaneda T. Iso-and Anteiso-fatty acids in Bacteria: biosynthesis, function, and Taxonomic significance. *Microbiological Reviews.* 1991. June 5:288-302.
30. Komagata K, Susuki KI. Lipid and cell –Wall Analysis in bacterial Systematics. 1987. *Methods in microbiology* Vol.19 (4).
31. Kopsell DE. Changes in bulb Quality during storage of short-, intermediate-, and Long Day Long – Day Cultivars of *Allium cepa* L. Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the University of Georgia in Partial Fulfillment of the requirements for the degree Master of Science; 1995.
32. Kopsell DE. Changes of flavor components in different cultivars of *Allium cepa* L. during storage. Dissertation submitted to the graduate faculty of the University of Georgia in partial fulfillment of the requirement for the degree Doctor of Philosophy; 1999.

33. Lechevalier M P. and Laskin H.A. editors. "Lipid in bacterial taxonomy" .CRC handbook in microbiology, 2nd edition, vol. 4, CRC Press Inc. Boca Raton, FL .1982.
34. Martínez MC, Colmenarez J, Leal G, Vargas N, Contreras N. Identificación y Patogenicidad de Bacterias Patógenas asociadas a semilla de cebolla. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Bacteriología.1998.
35. MIDI (Microbial Identification System) MIS operating Manual Newark. US. 2002 July. Part Number 2080(07/02).
36. Miller L, Berger T. Bacteria identification by Gas chromatography of Whole cell fatty acids. Application note 1985; 228-241.
37. Mullis SW, Gitaitis RD, Nischwitz C, Csinos AS, Rafael MZ, Inguil RE. First report of Onion (*Allium cepa*) naturally infected with Iris Yellow spot virus in Perú. Plant Dis.2006; 90:377.
38. Nassar A, Bertheau V, Dervin C, Narcy JP, Lemattre M. Rybotiping of *Erwinia caryophylli* strains in relation to their pathogenic and geographical distribution. App. Environ. Micro. 1994; 60:3781-3789.
39. Neto RJ, Yano T, Beriam LOS, Destefano SAL, Oliveira VM, Rosato YB. Comparative RFLP-ITS analysis between *Enterobacter cloacae* strains isolated from Plants and clinical Origin. Arq. Inst. Biol, 2003; Set. Vol.70 (3):367-372.
40. Norman DJ, Chase AR, Hodge NC, Stall R E. Differentiation of three species of *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas maltophilia* using cellular fatty acid analyses. European Journal of Plant Pathology 1997; 103: 687-693.
41. Osterhout GJ, Shull VH, Dick JD. Identification of clinical isolates of Gram negative Non fermentative Bacteria by an automated cellular fatty acid Identification System. Journal of Clinical Microbiology 1991.; Sep. vol 29. (9): 1822-1830.
42. Rosales M, Pappu HR, López L, Mora R, Alfaro A. Iris yellow spot virus in onion in Chile. Plant Dis 2005; 89:1245, published on-line as DOI.10.1094/PD -89-1245C.

43. Roumagnac P, Gagnevin L, Pruvost O. Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly development semiselective isolation médium. European Journak of Plant pathology. 2000; 106: 867-877.
44. Roumagnac P, Pruvost O, Chiroleu F, Hughes G. Spatial and temporal analyses of Bacterial blight of Onion caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Allii* . phytopathology 2003.94:138-146.
45. Samson R, Shafik H, Benjama A, Gardan L. Description of the Bacterium causing blight of leek as *Pseudomonas syringae* pv. *Porri* (pv nov). Phytopathology 1998; 88:844-850.
46. Sasser M. Identification of Bacteria by Gas chromatography of cellular Fatty acids. Technical note #101- [www.midi-inc.com](http://www.midi-inc.com)- Newark USA. 2001.
47. Sasser M. Identification of Bacteria through fatty acid analysis. Printed 1990; Chapter I.11. 199-203
48. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria. Third edition. APS press. USA. 2001.
49. Schwartz HF, Otto K L, Gent DH. Relation of Temperature and rainfall to development of *Xanthomonas* and *Pantoea* leaf blights of Onion in Colorado. Plant dis. 2002; 87:11-14.
50. Serrano FB. Bacterial fruitlet brown rot on pineapple in the Philippines. Philippine J. Science. 1928; 36:271-305.
51. Tornabene TG. Lipid analysis and the relationship to chemotaxonomy. Methods in Microbiology. Vol. 18 (7): 209-234.
52. Trujillo G, Hernández R, Figueroa A, Subero L. situación Sanitaria de la semilla de cebolla utilizada en el valle de Quibor estado de Lara, con relación a bacterias fitopatógenas. XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Bacteriología; 1998.
53. Vargas Delgado LF. Simulación del secado de cebolla blanca (*Allium cepa*) por flujo de aire caliente y evaluación en la perdida de su pungencia. Tesis para optar el título de Magíster Scientiae; 1996.

54. Vargas Ramón M. Programa de Insecticidas químicos y de Origen Biológico y orgánico en el control de thrips (*thrips tabaci*) en la cebolla granex. Honduras. fundación hondureña de Investigación Agrícola. Enero 2002. Informe técnico 2001; Pg 26-29.
55. Vélez L, Rivera LI, Rodríguez RP, Cabrera I. Hongos asociados al cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) en la zona sur de Puerto Rico. J. Agri. Univ. Puerto Rico 2004; 88 (1-2): 55-72.
56. Walcott RR, Gitaitis RD, Castro AC, Sanders JFH, Díaz Pérez JC. Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis*. Causal Agent of Center rot. Plant disease 2002; Vol 86: 106-111. N°2.
57. Yañez Morales M, Fucikovsky Zak L, Lorbeer JW, González JA, Aranda OS. *Erwinia chrysantemi* Burkholder, McFadden , Dimock y otras fitobacterias agentes causales de la pudrición suave de los bulbos de cebolla (*allium cepa* L.) y su detección. Rev Mexicana de Fitopatología 2003; Vol. 21, Enero- Junio.

