



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**“Caracterización de bacterias patógenas en tomate asociadas a la  
enfermedad de las “raíces pilosas” y su biocontrol con cepas de *Bacillus* y  
*Pseudomonas*”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta  
IBQ. Fátima Medina Tinoco

Dirigido por:  
Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Centro Universitario, Querétaro, Qro, México, diciembre de 2025

**La presente obra está bajo la licencia:**  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



## CC BY-NC-ND 4.0 DEED

### Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

#### **Usted es libre de:**

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

#### **Bajo los siguientes términos:**



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

#### **Avisos:**

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**“Caracterización de bacterias patógenas en tomate asociadas a la  
enfermedad de las “raíces pilosas” y su biocontrol con cepas de *Bacillus* y  
*Pseudomonas*”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta  
IBQ. Fátima Medina Tinoco

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Presidente  
Dr. Juan Campos Guillén  
Secretario  
Dr. José Alberto Rodríguez Morales  
Vocal  
Dr. Aldo Amaro Reyes  
Sinodal  
Dr. Alejandro Hernández Morales  
Sinodal

Centro Universitario, Querétaro, Qro, México, diciembre de 2025

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:**

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Fátima Medina Tinoco

Nombre del estudiante

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada con todo mi cariño y gratitud a mis padres, quienes han sido mi mayor fuente de inspiración y fortaleza. Gracias por su apoyo incondicional, por inculcarme los valores que hoy guían cada paso de mi vida. Su esfuerzo, paciencia y amor han sido el pilar que me permitió llegar hasta este momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis y a los profesores sinodales, les agradezco profundamente por su orientación, por el tiempo que dedicaron a guiarme, por su confianza y por las enseñanzas que me dejaron más allá del aula o el laboratorio. Su acompañamiento constante, así como los gratos momentos compartidos fuera del ámbito académico, marcaron una etapa en mi formación profesional y personal.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por su amistad, por los consejos sinceros y por todas las experiencias que hicieron de esta maestría una etapa tan especial. Cada experimento, desvelo, risa y anécdota compartida con ustedes se convirtió en un recuerdo que siempre llevaré conmigo.

A los estudiantes de servicio, les agradezco su entusiasmo, apoyo y disposición durante la parte experimental. Fue un gusto coincidir con ustedes, compartir conocimientos, risas y motivarlos a seguir persiguiendo sus metas.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo económico otorgado, el cual fue fundamental para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Finalmente, a todas las personas que, de una u otra forma, formaron parte de este camino: gracias por acompañarme, por sus palabras de aliento y por hacer de este proceso una experiencia llena de aprendizaje, crecimiento y satisfacción.

## ÍNDICE

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ABREVIATURAS Y SIGLAS .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Contaminación por uso de agroquímicos .....	5
2.2 Principales hortalizas producidas en México.....	5
2.3 Pérdidas en cultivos por plagas y enfermedades agrícolas .....	6
2.4 Principales enfermedades del cultivo de tomate .....	6
2.4.1 Enfermedad de las “raíces pilosas” .....	8
2.4.1.1 Mecanismo de infección .....	8
2.4.1.2 Métodos para su caracterización e identificación.....	10
2.5 <i>Agrobacterium</i> spp.....	11
2.5.1 Características morfológicas y fisiológicas.....	11
2.5.2 Taxonomía .....	13
2.6 Control biológico de fitopatógenos en tomate.....	15
2.6.1 Métodos de control para la enfermedad de las “raíces pilosas”.....	16
2.6.1.1 Prácticas culturales.....	16
2.6.1.2 Métodos químicos .....	17
2.6.1.3 Métodos de control biológico .....	18
2.7 Microbioma de la raíz de tomate .....	19
2.7.1 <i>Bacillus</i> spp.....	20
2.7.2 <i>Pseudomonas</i> spp. ....	21

3.	HIPOTESIS.....	24
4.	OBJETIVOS .....	25
5.	METODOLOGÍA .....	26
5.1	Sitio de estudio.....	26
5.2	Material biológico .....	26
5.3	Muestreo y aislamiento de bacterias patógenas .....	27
5.4	Caracterización de los aislados bacterianos .....	27
5.4.1	Tinción de Gram y prueba con KOH 3%.....	28
5.4.2	Medio MG-Te .....	29
5.4.3	Medio Mac Conkey.....	29
5.4.4	Prueba catalasa .....	30
5.4.5	Medio alcalino de Hofer.....	30
5.4.6	Medio 2E.....	31
5.4.7	Agar Kligler hierro.....	31
5.4.8	Prueba 3-cetolactosa.....	32
5.5	Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S.....	32
5.6	Prueba de sensibilidad a los antibióticos.....	34
5.7	Ensayos de patogenicidad .....	34
5.7.1	Ensayos de patogenicidad en frijol cv. Negro Jamapa.....	34
5.7.2	Ensayos de patogenicidad en tomate cv. Alfredo .....	36
5.8	Análisis genómico de los aislados con mayor actividad rizogénica .....	39
5.9	Ensayos <i>in vitro</i> de biocontrol.....	39
5.10	Ensayos de inhibición con agroquímicos.....	40
5.11	Diseño experimental y análisis estadístico .....	40
6.	RESULTADOS.....	42
6.1	Muestreo y aislamiento de bacterias .....	42
6.2	Caracterización de aislados bacterianos.....	42
6.3	Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S .....	44
6.4	Prueba de sensibilidad a los antibióticos .....	46
6.5	Ensayos de patogenicidad .....	47
6.5.1	Ensayos de patogenicidad en germinados de frijol negro ( <i>P. vulgaris</i> ) .....	47

6.5.2 Ensayos de patogenicidad en plántulas de tomate ( <i>S. lycopersicum</i> ).....	49
6.8 Ensayos de inhibición con agroquímicos .....	74
7. DISCUSIÓN .....	76
8. CONCLUSIONES .....	83
9. PERSPECTIVAS .....	84
10. REFERENCIAS.....	86

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades del cultivo de tomate.....	7
Tabla 2. Características fisiológicas de <i>Agrobacterium</i> .....	12
Tabla 3. Clasificación de cepas del género <i>Agrobacterium</i> .....	14
Tabla 4. Microorganismos utilizados en el biocontrol de fitopatógenos del tomate.....	15
Tabla 5. Capacidad antagónica de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> frente a fitopatógenos.....	22
Tabla 6. Capacidad antagónica de cepas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> frente a fitopatógenos.....	23
Tabla 7. Pruebas bioquímicas de los aislados para el escrutinio de <i>Agrobacterium</i> .....	44
Tabla 8. Aislados identificados en las muestras ambientales. ....	45
Tabla 9. Efecto de aislados microbianos en la inducción de rizogénesis en plantas de frijol.....	48
Tabla 10. Inducción de rizogénesis en el hipocótilo de plántulas de tomate por aislados microbianos.....	49
Tabla 11. Caracterización genómica de <i>A. deltaense</i> M8R5 mediante BV-BRC.....	52
Tabla 12. Posibles genes de virulencia en <i>A. deltaense</i> M8R5 identificados con BV-BRC.	55
Tabla 13. Clasificación de genes presentes en el plásmido pRiM8R5. ....	58
Tabla 14. Caracterización genómica de <i>Shinella</i> sp. Ar534 mediante BV-BRC.....	63
Tabla 15. Posibles genes de virulencia en <i>Shinella</i> sp. Ar534 identificados con BV-BRC.	67
Tabla 16. Clasificación de genes presentes en pAr534.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de tomate de un invernadero con incidencia de “raíces pilosas”.	9
Figura 2. Mecanismo de infección de <i>Rhizobium rhizogenes</i> .	10
Figura 3. Abundancia de phyla procariotas en la rizosfera de tomate.	20
Figura 4. Condiciones de amplificación del gen ARNr 16S en el termociclador.	33
Figura 5. Metodología para evaluar la patogenicidad en germinados de frijol.	35
Figura 6. Parámetros medidos en plántulas de frijol 15 días después de la infección.	36
Figura 7. Metodología para evaluar la patogenicidad en plántulas de tomate.	38
Figura 8. Comparación de raíces de <i>S. lycopersicum</i> en fibra de coco.	42
Figura 9. Prueba de catalasa.	43
Figura 10. Resultados de las pruebas bioquímicas en el escrutinio de cepas de <i>Agrobacterium</i> .	43
Figura 11. Análisis filogenético de las cepas Ar534, M15R5, M8R5, M6A13 y 1M7A3.	45
Figura 12. Mapa de calor de la sensibilidad a antibióticos de las cepas M8R5, M15R5, Ar534, M6A13 y 1M7A3.	47
Figura 13. Plántulas de frijol 15 días después de la infección.	48
Figura 14. Evaluación de la inducción de rizogénesis en raíces de tomate 25 días postinfección.	50
Figura 15. Árbol filogenético de <i>Agrobacterium deltaense</i> M8R5.	51
Figura 16. Genoma circular de <i>A. deltaense</i> M8R5 con la distribución de subsistemas	57
Figura 17. Comparación genómica del plásmido pRiM8R5 con pRiO132 y pRiNCPPB1855	58
Figura 18. Árbol filogenético de <i>Shinella</i> sp. Ar534.	60
Figura 19. Genoma circular de <i>Shinella</i> sp. Ar534 con la distribución de subsistemas	62
Figura 20. Comparación genómica del plásmido pAr534 con UPHL-collab-2 plasmid y pZ25.	69
Figura 21. Ensayos de antagonismo por estrías cruzadas contra <i>Agrobacterium deltaense</i> M8R5 tras 7 días a 25, 30 y 35 °C.	72

Figura 22. Confrontación bacteriana por estrías cruzadas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> K599 tras 7 días a 25, 30 y 35 °C.....	73
Figura 23. Sensibilidad de <i>A. rhizogenes</i> K599 y <i>A. deltaense</i> M8R5 a Busan® 1129 .....	75
Figura 24. Sensibilidad de <i>A. rhizogenes</i> K599 y <i>A. deltaense</i> M8R5 a FITO TSP® .....	75

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

**TCMTB:** 2(tiocianometiltio)benzotiazol

**pRi:** Root inducing plasmid - Plásmido inductor de raíces

**Ti:** Tumor inducing - inductor de tumores

**Ri:** Root inducing - inductor de raíces

**Sym:** Symbiosis - Simbiosis

**PCR:** Polymerase Chain Reaction - Reacción en cadena de la polimerasa

**NGS:** Next-Generation Sequencing - Secuenciación de Nueva Generación

**AMPs:** Antimicrobial Peptides - Péptidos Antimicrobianos

**LB:** Medio Luria-Bertani

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional para la Información Biotecnológica

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**MS:** Medio de Murashige y Skoog

**GTDB:** Genome Taxonomy Database - Base de Datos de Taxonomía Genómica

**ANOVA:** Analysis Of Variance - Análisis de varianza

**2E:** 2E médium - Medio 2E

**ANIb:** Average Nucleotide Identity using BLAST - Identidad Nucleotídica Promedio usando BLAST

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool - Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico

**G + C:** Contenido de Guanina y Citosina

**GC:** Guanina y Citosina

**GC Skew:** Sesgo de Guanina y Citosina

**ORF:** Open Reading Frame - Marco Abierto de Lectura

**ADN-T:** ADN de transferencia

**ATP:** Trifosfato de Adenosina

**BV-BRC:** Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center - Plataforma bioinformática

bacteriana y viral

**PATRIC:** Pathosystems Resource Integration Center - Centro de Integración de Recursos para Patósistemas

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto

**Victors:** Virulence Factors of Classified Bacterial Pathogens - Factores de Virulencia de Patógenos Bacterianos Clasificados

**VFDB:** Virulence Factors DataBase - Base de Datos de Factores de Virulencia

**PATRIC\_VF:** Módulo de Factores de Virulencia de PATRIC

**CARD:** Comprehensive Antibiotic Resistance Database - Base de datos completa sobre resistencia a los antibióticos

**NDARO:** National Database of Antibiotic-Resistant Organisms - Base de Datos Nacional de Organismos Resistentes a los Antibióticos

**TCDB:** Transporter Classification Database - Base de Datos de Clasificación de Transportadores

**DrugBank:** Base de Datos de Fármacos y Diana Farmacológicas

**CDS:** Protein coding sequences - Secuencias de proteínas codificantes

## RESUMEN

La enfermedad de las “raíces pilosas” en cultivos de tomate, caracterizada por una proliferación anormal de raíces inducida por bacterias del género *Agrobacterium*, representa un problema emergente. En este trabajo se aislaron y caracterizaron bacterias provenientes de la rizosfera y del sistema de riego de un invernadero en el estado de Querétaro, México con incidencia recurrente de la enfermedad. Mediante pruebas bioquímicas y análisis del gen 16S ARNr se identificaron aislados pertenecientes a las clases  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria y  $\gamma$ -proteobacteria, destacando los aislados rizosféricos: *Agrobacterium deltaense* M8R5 y *Shinella* sp. Ar534. Los ensayos de patogenicidad en frijol y tomate confirmaron la capacidad rizogénica de *A. deltaense* M8R5, la cual indujo un desarrollo radicular similar al control positivo de *Agrobacterium rhizogenes* K599. El análisis genómico de M8R5 reveló la presencia de un novedoso plásmido tipo Ri (pRiM8R5), el cual contiene los genes causantes de la patogenicidad (*rol* y *vir*), y otros más (*addA*, *recB*, *dnaK*, *edd*, *odh*, *ghrB*, *nagR*) que pudieran conferirle ventajas fisiológicas adaptativas como patógeno. En contraparte, en el análisis genómico de *Shinella* sp. Ar534 no se encontraron genes de virulencia, indicando que podría ser una cepa simbiótica o adaptativa. En ensayos de antagonismo *in vitro* contra *A. deltaense* M8R5, *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu ejercieron una respuesta competitiva, principalmente mediante movilidad dirigida y competencia por espacio a 30 y 35 °C. En los ensayos de control químico, FITO TSP® presentó una mayor actividad inhibitoria que Busan® 1129, aunque su uso prolongado podría favorecer la aparición de resistencia bacteriana. En conclusión, los resultados confirman a *A. deltaense* M8R5 como un potencial agente causal de la enfermedad “raíces pilosas” en tomate y destacan el potencial de cepas de *Bacillus* como alternativas de biocontrol más sostenibles frente al uso de agroquímicos convencionales.

**Palabras clave:** Análisis genómico, Biocontrol, Plásmido, Rizogénesis, Secuenciación de Nueva Generación (NGS), T-ADN.

## ABSTRACT

The “hairy root” disease in tomato crops, characterized by abnormal root proliferation induced by *Agrobacterium* species, represents an emerging problem. In this study, bacteria were isolated and characterized from the rhizosphere and irrigation system of a greenhouse in Querétaro, Mexico, where the disease has been recurrent. Biochemical tests and 16S rRNA gene analysis identified isolates belonging to the  $\alpha$ -proteobacteria,  $\beta$ -proteobacteria and  $\gamma$ -proteobacteria classes, highlighting *Agrobacterium deltaense* M8R5 and *Shinella* sp. Ar534 from the rhizosphere. Pathogenicity assays in bean and tomato confirmed the rhizogenic capacity of *A. deltaense* M8R5, which induced root development comparable to the positive control *A. rhizogenes* K599. Genomic analysis of M8R5 revealed a novel Ri-type plasmid (pRiM8R5) containing pathogenicity-related genes (*rol*, *vir*) and others (*addA*, *recB*, *dnaK*, *edd*, *odh*, *ghrB*, *nagR*) potentially associated with adaptive physiological traits. Conversely, *Shinella* sp. Ar534 showed no virulence genes, suggesting a symbiotic or adaptive nature. In vitro antagonism assays against *A. deltaense* M8R5 demonstrated that *Bacillus subtilis* Q11 and *Bacillus* sp. PEu exerted competitive inhibition mainly through directed mobility and space competition at 30 and 35 °C. Among chemical controls, FITO TSP® exhibited greater inhibitory activity than Busan® 1129, though prolonged use may promote bacterial resistance. Overall, the findings confirm *A. deltaense* M8R5 as a potential causal agent of tomato “hairy roots” disease and highlight *Bacillus* strains as sustainable biocontrol alternatives to conventional agrochemicals.

**Keywords:** Genomic analysis, Biocontrol, Plasmid, Rhizogenesis, Next-Generation Sequencing (NGS), T-DNA.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de agroquímicos por parte de los agricultores como un medio para controlar plagas y enfermedades en los cultivos ha contaminado el ambiente. Algunas de las afectaciones al suelo, es la disminución de la densidad y diversidad microbiana, también ha causado daño en los ecosistemas a través de la contaminación del agua, afectaciones a la salud de la población, entre otras. Para reducir el impacto ambiental que tienen los agroquímicos, se ha propuesto el uso de nuevas tecnologías aplicadas a la agricultura como el control biológico. Este método consiste en el uso de microorganismos benéficos con capacidad antagónica o aceites esenciales de plantas como un método para controlar plagas o enfermedades en las plantas.

Entre las hortalizas más producidas en México y con mayor importancia a nivel mundial se encuentra el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con una producción aproximada de 3,637,000 ton en 2023, la cual aumento un 5.1 % respecto al año anterior, situado a México en el séptimo lugar como productor en el ranking mundial. Durante su cultivo, el tomate es afectado por numerosas enfermedades causadas por hongos de géneros como *Fusarium*, *Alternaria* y *Phytoptora*, por virus como el virus café rugoso del tomate y por bacterias de géneros como *Clavibacter*, *Pseudomonas* y *Agrobacterium*. Esta última, causa la enfermedad conocida como “raíces pilosas” o “*hairy root*”, cuyo principal síntoma es la producción excesiva de biomasa radical.

Los síntomas de la enfermedad aparecen como resultado de la acción de *Rhizobium rhizogenes* (Anteriormente llamado *Agrobacterium rhizogenes*), que lleva a cabo una transformación genética de las células de la raíz del hospedero, a través de la transferencia de un segmento del ADN-T del plásmido (pRi), el cual porta un conjunto de genes oncogénicos de raíz (genes *rol*), y su expresión en las células vegetales induce un desarrollo anormal de las raíces, aumentando la sensibilidad de las plantas a las auxinas endógenas y aumentando la síntesis de metabolitos secundarios en las células vegetales transformadas. Por consecuencia, la planta reduce su crecimiento y vitalidad, dejándola susceptible a infecciones secundarias. Otros síntomas también incluyen la floración temprana, la

presencia de hojas arrugadas, cambios en la dominancia apical y una longitud de entrenudo más corta. Esta enfermedad puede llegar a ocasionar pérdidas económicas significativas debido a la reducción del 15 al 50 % en el rendimiento de la producción.

Actualmente las técnicas empleadas para el control de esta enfermedad no han sido del todo satisfactorias para los agricultores, debido a que no disminuyen en gran medida los síntomas causados por la enfermedad o son métodos muy costosos e insostenibles. Ante ello, estudios recientes sobre el microbioma de la raíz han revelado diferencias microbianas entre plantas sanas y enfermas, destacando la presencia de géneros como *Bacillus* y *Pseudomonas*, con capacidad de biocontrol frente a bacterias fitopatógenas. En el presente trabajo se caracterizaron aislados bacterianos provenientes de agua de riego y la rizosfera de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de un invernadero con incidencia de la enfermedad “raíces pilosas”, mediante pruebas bioquímicas, moleculares y ensayos de patogenicidad en plantas modelo. Esto con la finalidad de identificar nuevas cepas potenciales con capacidad de rizogénesis y establecer posibles estrategias de biocontrol mediante el antagonismo *in vitro* con cepas de *Bacillus* spp y *Pseudomonas fluorescens*.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Contaminación por uso de agroquímicos**

Los suelos agrícolas reciben grandes descargas de diversas sustancias contaminantes, derivadas del uso indiscriminado e incontrolado de agroquímicos aplicados para el manejo de plagas, enfermedades o malezas (Buriticá, 2019). Este uso excesivo afecta a todos los organismos del ecosistema, ya que muchos de estos compuestos presentan alta toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación, lo que les permite permanecer por largos períodos en el suelo, agua, aire y en organismos vivos. En consecuencia, las poblaciones que habitan cerca de zonas agrícolas se encuentran constantemente expuestas a mezclas de agroquímicos, a menudo sin ser conscientes de ello (Quijada y Gómez, 2019).

Entre estos compuestos destaca el TCMTB (2-(tiocianometiltio)benzotiazol), ampliamente utilizado como fungicida y bactericida en la industria agrícola, incluidos los tratamientos para el control de enfermedades causadas por *Agrobacterium* spp. (datos no documentados). Sin embargo, diversos estudios han evidenciado que el TCMTB presenta alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y efectos ecotóxicos significativos sobre microorganismos del suelo, lombrices, peces y plantas, alterando los procesos biogeoquímicos esenciales y afectando la estructura microbiana del suelo (Braun *et al.*, 2006; Nawrocki *et al.*, 2005).

La exposición a agroquímicos puede provocar graves efectos sobre la salud, incluyendo alteraciones en el sistema inmunológico, desequilibrios hormonales, dificultades en el aprendizaje, malformaciones congénitas, problemas reproductivos y ciertos tipos de cáncer, debido a que muchos de estos compuestos están clasificados como disruptores endocrinos (Polanco *et al.*, 2019).

### **2.2 Principales hortalizas producidas en México**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), también conocido como tomate rojo, se posiciona entre las más consumidas a nivel global. En México, se cultivan diversas variedades, entre

ellas saladette, bola, cherry, cóctel y uva. Durante 2023, la producción nacional alcanzó los 3,637,000 ton, lo que representó un incremento del 5.1 % en comparación con el año anterior, siendo la segunda cifra más alta de la última década, por encima de la registrada en 2018 con 3,871,000 ton. El comportamiento de las exportaciones mexicanas de hortalizas está marcado principalmente por la demanda de Estados Unidos. A lo largo del 2023, los envíos hacia ese país sumaron 1,793,000 ton, con un valor de 2,182,000 dólares, lo que representó el 99.8 % del total exportado. Otros destinos frecuentes incluyen Canadá, Japón y Guatemala (SIAP, 2024).

### **2.3 Pérdidas en cultivos por plagas y enfermedades agrícolas**

La seguridad alimentaria de la población mundial además de verse afectada por el uso de agroquímicos también lo es por las plagas y enfermedades en los cultivos ya que estos han ocasionado grandes pérdidas económicas además de no cubrir con la demanda de alimentos que actualmente ha ido en aumento. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en 2019 se reportó la pérdida del 40 % de la producción agrícola mundial debido a plagas y enfermedades que logran afectar diversos cultivos. Anualmente esto provoca pérdidas de aproximadamente 220,000 millones de dólares EE. UU. en el comercio agrícola, perjudicando la fuente de ingresos más importante de las comunidades rurales. Por lo que, trabajar en medidas de sanidad vegetal es fundamental para alcanzar un desarrollo sostenible (FAO, 2019).

### **2.4 Principales enfermedades del cultivo de tomate**

El tomate, durante su cultivo, se ve afectado por numerosas enfermedades (Tabla 1) causadas por hongos del género *Fusarium*, *Pythium*, *Botryotinia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria* y *Phytoptora* (CESAVEG, 2020), por virus como el virus café rugoso del tomate (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2023) y bacterias de los géneros *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* (CESAVEG, 2020) y *Agrobacterium* (Panno *et al.*, 2021). Estos microorganismos fitopatógenos producen graves daños en las plantas como alteraciones en las raíces, marchitamiento, pudrición, manchado en hojas o frutos, daño en el tallo o la muerte de la planta (CESAVEG, 2020; Arcos-Chiriboga, 2018).

Aunque la enfermedad de las “raíces pilosas” ocasionada por *Agrobacterium* spp. ha sido escasamente documentada en México, su presencia ha mostrado una expansión progresiva a lo largo del tiempo en diversos países de Europa, Asia, América del Sur y Norteamérica a lo largo del tiempo (Bosmans *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Principales enfermedades del cultivo de tomate.

Enfermedad	Fitopatógeno	Sintomatología
Raíces pilosas	<i>Agrobacterium</i> spp.	Producción excesiva de raíces y reducción en la producción de fruto.
Damping off	<i>Phytophthora</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Phytophthora</i> spp., <i>Fusarium</i> spp.	Manchones, marchitamiento y pudrición de raíz.
Pudrición radicular	<i>Fusarium oxysporum</i>	Clorosis, achaparramiento, defoliación y necrosis marginal de las hojas.
Marchitez por <i>Verticillium</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Marchitez y formación de esclerocios.
Moho gris	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Tinzones en hojas, tallos y flores.
Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i>	Manchas irregulares en hojas y tallos basales necrosados.
Tizón temprano	<i>Alternaria tomatophila</i>	Lesiones café oscuro en hojas y puntos negros abultados.
Moho blanco	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Esclerocios grandes y negros en el interior del tallo.
Cáncer bacteriano del tomate	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Puntos hundidos de color café en frutos, clorosis, presencia de cáncros en tallos y marchitez.
Peca y mancha bacteriana	<i>Pseudomonas syringae</i> y <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Manchas negras en hojas, pecíolos, tallos y frutos. Manchas rugosas en el caso de <i>Xanthomonas</i> .

Virus café rugoso del tomate (ToBRFV)	Género <i>Tobamovirus</i>	Manchas amarillas, apariencia áspera de la piel en la fruta, patrones de mosaico y marchitamiento de las hojas.
---------------------------------------	---------------------------	---

(Sánchez-Sánchez *et al.*, 2023; Panno *et al.*, 2021; CESAVEG, 2020).

### 2.4.1 Enfermedad de las “raíces pilosas”

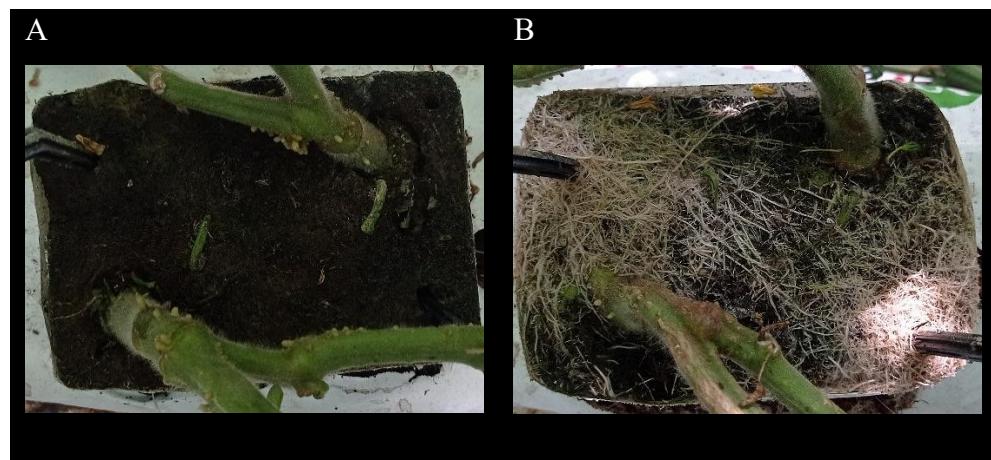
#### 2.4.1.1 Mecanismo de infección

La enfermedad de las “raíces pilosas” o también llamada “hairy root”, causada por bacterias del género *Agrobacterium*, ocasiona principalmente la producción excesiva de biomasa radical (Figura 1) (Bosmans *et al.*, 2017). Los síntomas de la enfermedad aparecen como resultado de la infección por *Agrobacterium* (Figura 2), que lleva a cabo una transformación genética de las células de la raíz del hospedero, a través de la transferencia de un segmento del ADN-T (ADN de transferencia) del plásmido pRi, el cual porta un conjunto de genes oncogénicos de raíz (genes *rolA-rolD*), cuya expresión en las células vegetales induce un desarrollo anormal de las raíces (Altamura *et al.*, 2004). La expresión del gen *rolA* se relaciona con la disminución de algunos niveles hormonales como etileno, auxinas, ácido abscísico, citoquininas o giberelinas. La expresión del gen *rolB* es responsable de la formación de raíces y de su rápido crecimiento. También, se ha reportado la expresión del gen *rolB* en meristemos del sistema vascular (periciclo, xilema y floema) lo cual tiene un efecto en la diferenciación de las células. El gen *rolC* es responsable de que aparezcan cambios en el metabolismo secundario y el gen *rolD* es responsable de la entrada temprana de la planta a la fase de crecimiento generativo (Warabieda *et al.*, 2021; Dehio *et al.*, 1993; Shen *et al.*, 1988).

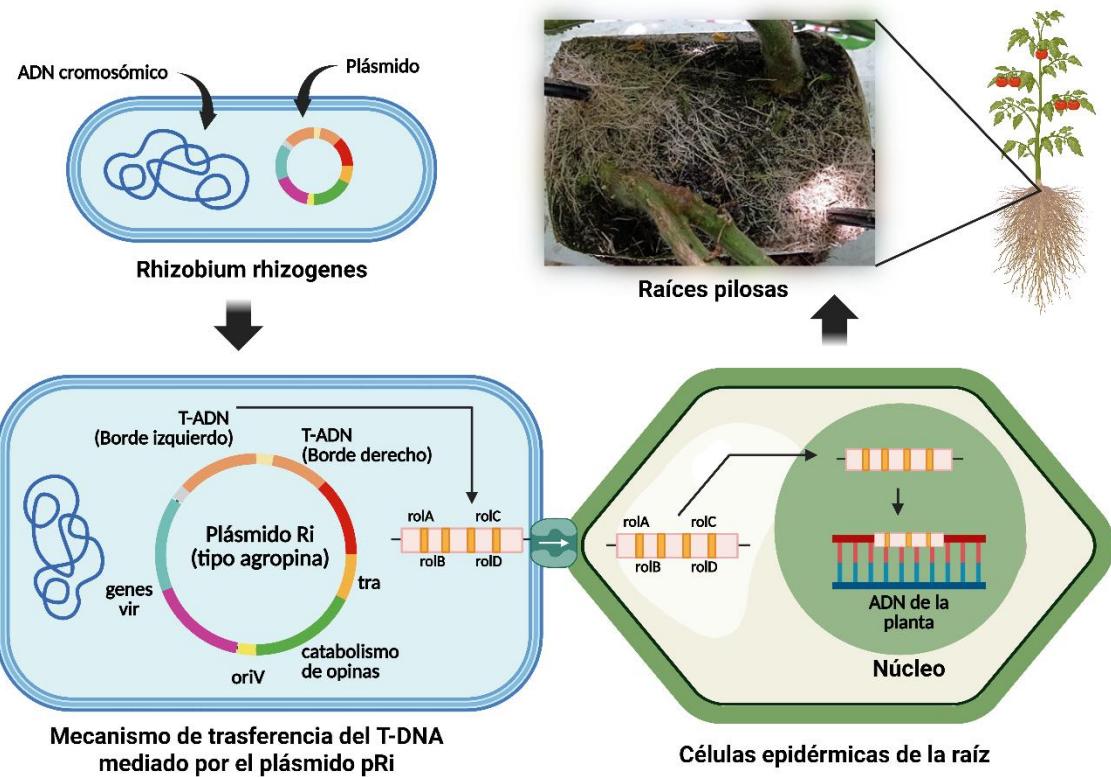
La estructura del plásmido pRi no es consistente en la mayoría de las cepas patogénicas. solo lo son la región del metabolismo de opinas, el origen de replicación (ori), y la región de virulencia (genes *vir*), los cuales son esenciales para el proceso de transferencia de ADN al interior de las células vegetales (Bosmans *et al.*, 2017). Es posible que estos plásmidos se transfieran a bacterias no patógenas del género *Agrobacterium* o rizobios, generando

nuevas cepas patogénicas (Weller *et al.*, 2004).

La expresión de los genes previamente descritos puede inducir diversas alteraciones fisiológicas en la planta hospedera. Además de la proliferación anormal de raíces, se ha observado una reducción en el crecimiento, una disminución en la vitalidad y un incremento en la susceptibilidad a infecciones secundarias (Nilsson y Olsson, 1997). Otros síntomas también incluyen la floración temprana, presencia de hojas arrugadas, cambios en la dominancia apical y una reducción de la longitud del entrenudo (Tepfer, 1984). Como consecuencia, esta enfermedad puede llegar a ocasionar pérdidas económicas significativas debido a la reducción del 15 al 50 % en el rendimiento de la producción (Ignatov *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Plantas de tomate de un invernadero con incidencia de “raíces pilosas”. Fotografías tomadas en el sitio de estudio de plantas de tomate tipo uva cv. Swetelle de 48 semanas de edad creciendo en fibra de coco: (A) planta sana; (B) planta con el fenotipo de la enfermedad “raíces pilosas”.



**Figura 2.** Mecanismo de infección de *Rhizobium rhizogenes*. (Creado con: <https://BioRender.com>) (modificado de Biswas *et al.*, 2023).

#### 2.4.1.2 Métodos para su caracterización e identificación

La incidencia de la enfermedad “raíces pilosas” fue reportada por primera vez en América del Norte en cultivos de manzano (Riker *et al.*, 1930), donde se obtuvieron aislados identificados como *Bacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*) y *Phytomonas rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*), los cuales fueron probados, infectando manzana, rosa y frijol, observando la inducción de rizogenesis, distintas plantas como tabaco y tomate presentaron la enfermedad en menor grado. Otros modelos biológicos que han sido empleados en la caracterización para inducción de rizogenesis incluyen eucalipto (Plasencia *et al.*, 2016), col china (Wang *et al.*, 2024), haba de soya (Pereira *et al.*, 2023), tabaco y entre otras más de 100 especies (Ozyigit *et al.*, 2013). Después, al presentarse la enfermedad en cultivo de tomate, se emplearon métodos para identificar *Agrobacterium*

spp. infectando raíces de zanahoria, nabo, remolacha, chirivía y alcachofa (Ark y Thompson, 1961). A finales de siglo XX, la enfermedad fue reportada en Europa en el cultivo de pepino (O'Neill y Yarham 1993; Weller *et al.*, 2000), donde se aislaron e identificaron especies de *Agrobacterium* a partir de muestras de raíces, utilizando medios semiselectivos como Schroth's medium, Brisbane & Kerr's, Medium 2E y Roy & Sasser Medium 3, así como, el análisis del perfil de ácidos grasos y la PCR para la detección del plásmido Ri. Años posteriores, la incidencia de la enfermedad también fue reportada en cultivos de melón (Bosmans *et al.*, 2017), berenjena y pimiento (Vargas *et al.*, 2020) en varios países de Europa (Bosmans *et al.*, 2017; Ignatov *et al.*, 2016), Asia (Sawada y Azegami, 2014), Oceanía y América del Norte (Vargas *et al.*, 2020; Vanlommel *et al.*, 2020).

Las técnicas moleculares como la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) se perfila como una herramienta poderosa para el análisis completo del genoma de aislados potencialmente causantes de las “raíces pilosas”, debido a las limitaciones que presenta la técnica de PCR usualmente empleada para identificar los genes de patogenicidad, los cuales presentan una alta variabilidad en su secuencia (Bosmans *et al.*, 2016). Además, el estudio del genoma permite encontrar en las cepas otros genes relacionados con la resistencia a factores bióticos y abióticos que permiten su persistencia (de Freitas, 2021).

## **2.5 *Agrobacterium* spp.**

### **2.5.1 Características morfológicas y fisiológicas**

Las bacterias del género *Agrobacterium* son Gram negativas de forma bacilar alargada, con extremos redondeados y, miden aproximadamente 0.6-1.0 µm de ancho por 1.5-3.0 µm de largo. Estas bacterias carecen de esporas y presentan movilidad, ya sea mediante un flagelo ubicado en posición polar o subpolar, o mediante 2-6 flagelos peritíricos, la longitud de los flagelos es de cuatro a cinco veces mayor que la de la célula bacteriana. Las colonias suelen presentar una forma convexa, bordes redondeados, textura mucosa y una coloración blanco-beige o sin pigmentación. Alcanzan un diámetro de 2-4 mm tras 4-6 días de incubación. Cuando crecen en medios que contienen carbohidratos, suelen producir una cantidad

abundante de polisacáridos extracelulares en forma de mucus. Estas bacterias son organismos aerobios, ya que su metabolismo respiratorio utiliza oxígeno como acceptor final de electrones. Son quimiorganotrofos y pueden metabolizar una amplia variedad de carbohidratos, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbono (Tabla 2). Tienen la capacidad para alcalinizar el medio por la hidrolisis de la urea debido a la presencia de la enzima ureasa, también se ha reportado la presencia de las enzimas catalasa y penicilinasa. En contraste, las bacterias de este género suelen ser negativas para la presencia de enzimas como lecitinasa, arginina dihidrolasa y tween 20 lipasa. Adicionalmente, se ha reportado que algunas especies de *Agrobacterium* no son fermentadoras de lactosa, son capaces de crecer en el medio MacConkey compuesto por sales biliares N°3, pueden reducir también el K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub> a ciertas concentraciones (Nguyen, 2017) y producir 3-cetolactosa (Schaad, 1980). También, se ha encontrado que cepas rizogénicas de *Agrobacterium* biovar 1 presentan diferencias en su comportamiento fenotípico. Por ejemplo, aunque la mayoría crece adecuadamente en un rango de temperatura entre 22 y 37 °C, algunas cepas son capaces de crecer incluso a 4 °C o hasta 44 °C. De manera similar, la mayoría tolera un pH entre 5 y 9, pero existen cepas que logran crecer en condiciones más extremas, como pH 3 o pH 11 (Hofer, 1941). Esto evidencia que las bacterias rizogénicas son capaces de adaptarse a una gran variedad de entornos (Bosmans *et al.*, 2015).

**Tabla 2.** Características fisiológicas de *Agrobacterium*.

	Actividad enzimática		
Positiva			Negativa
Catalasa			Lecitinasa
Ureasa			Arginina dihidrolasa
Penicilinasa			Tween 80 lipasa
	Uso de carbohidratos como únicas fuentes de carbono		
Glucosa	Ramnosa	Almidón	Formato
Galactosa	Xilosa	Pectato	Glioxilato
Arabinosa	Fucosa	Inulina	Oxalato
Fructosa	Salicina	Celulosa	Benzoato
Manitol	Inositol	Agar	Dextrina
Adonitol	Esculina	Eritritol	Glucuronato
Melibiosa	Arbutina		

Manosa	Glicerina		
Maltosa	$\beta$ -hidroxibenzoato		
Trehalosa			
Uso de aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno			
Asparagina	Histidina	Fenilalanina	Glicina
Aspartato	Serina	Triptófano	Leucina
Arginina	Lisina	Valina	Cisteína

(Mary *et al.*, 2017; Shams *et al.*, 2012; Lippincott *et al.*, 1981)

## 2.5.2 Taxonomía

La clase *Alphaproteobacteria* alberga la familia *Rhizobiaceae*, donde se encuentra el género *Agrobacterium*, el cual contiene especies patógenas como no patógenos de plantas. Inicialmente, la taxonomía del género *Agrobacterium* estuvo basada en los síntomas que producían las cepas que inducían tumores o agallas por lo que se les denominó *Bacterium tumefaciens*, mientras que las cepas capaces de inducir “raíces pilosas” en las plantas se les denominó *Phytomonas rhizogenes* y *Bacillus radiobacter*. A partir de las similitudes morfológicas y fisiológicas observadas entre estas bacterias, se propuso la creación del género *Agrobacterium*, el cual incluye a las especies *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium radiobacter* (Riker *et al.*, 1930; Smith y Townsend, 1907). Posteriormente, se incorporaron al género *Agrobacterium* especies adicionales como *Agrobacterium larrymoorei* (patógeno de *Ficus* spp.), *Agrobacterium rubi* (asociado a *Rubus* spp.) y *Agrobacterium vitis* (que afecta a *Vitis* spp.). Sin embargo, debido a que las características de patogenicidad están determinadas por el tipo de plásmido presente en la bacteria, se reconoció que dichos rasgos no son adecuados para definir taxonómicamente a las especies. Por lo que, en 1970 se clasificaron tres grupos dentro del género *Agrobacterium* que corresponden a los biovar 1, 2 y 3 (Tabla 3). La clasificación en biovar se basa en genes cromosómicos, en lugar de elementos plasmídicos, permitiendo reflejar de manera más precisa las relaciones filogenéticas entre las cepas. Debido a esto, es posible encontrar cepas tumorígenas, rizogénicas y no patógenas dentro de un mismo biovar. En la taxonomía bacteriana actual, la delimitación de taxones se basa en datos genómicos. El criterio principal para definir una especie

auténtica es la homogeneidad dentro de las genomoespecie, es por esto que *A. larrymoorei*, *A. rubi* y *A. vitis* (biovar 3) han sido reconocidas como especies auténticas. El biovar 1 de *Agrobacterium* es genéticamente heterogéneo y comprende al menos diez genoespecies distintas, aún sin una clasificación formal como especies con nombre binomial. Adicionalmente, se descubrió que las cepas *A. radiobacter* y *A. tumefaciens* pertenecen a la misma genoespecie (G4), por lo que ambos nombres son sinónimos, debiendo conservarse como *A. radiobacter*. Para evitar confusiones, se propuso llamar “complejo de especies de *A. tumefaciens*” al conjunto de taxones del biovar 1, como solución temporal hasta nombrar formalmente las genomoespecies. A partir de análisis filogenéticos del gen 16S ARNr, se propuso integrar *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium*, pero no hubo un consenso, por lo que solo *A. rhizogenes* fue transferida como *Rhizobium rhizogenes*, convirtiéndose en el nombre válido para el biovar 2 (Bosmans *et al.*, 2017).

**Tabla 3.** Clasificación de cepas del género *Agrobacterium*.

Primer Clasificación (Año 1907-1970)	Clasificación por biovar (Año 1970-2010)	Nueva clasificación (Año 2010 en adelante)
<i>A. tumefaciens</i>	Biovar 1: cepas tumorigénicas ( <i>A. tumefaciens</i> ), rizogénicas ( <i>A. rhizogenes</i> ) y avirulentas ( <i>A. radiobacter</i> ), incluye cepas de <i>A. tumefaciens</i> y <i>A. radiobacter</i> .	Especies de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. radiobacter</i>		
<i>A. rhizogenes</i>	Biovar 2: cepas tumorigénicas ( <i>A. tumefaciens</i> ), rizogénicas ( <i>A. rhizogenes</i> ) y avirulentas ( <i>A. radiobacter</i> ), incluye cepas de <i>A. rhizogenes</i> .	<i>Rhizobium rhizogenes</i>
<i>A. rubi</i>		<i>Agrobacterium rubi</i>
<i>A. vitis</i>	Biovar 3: cepas tumorigénicas en <i>vitis</i> ( <i>A. tumefaciens</i> y <i>A. vitis</i> ).	<i>Agrobacterium vitis</i>

<i>A. larrymoorei</i>	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>
-----------------------	----------------------------------

(Bosmans *et al.*, 2017)

## 2.6 Control biológico de fitopatógenos en tomate

El control biológico de enfermedades ha resultado ser una opción sostenible y ecológica para la agricultura actual. La interacción entre plantas y microorganismos ha demostrado potenciar el crecimiento de plantas, su nutrición, tolerancia al estrés y protección ante fitopatógenos. El principio básico del control biológico es el manejo de plagas y enfermedades agrícolas mediante el uso de enemigos naturales. Estos pueden ser otros microorganismos como insectos, parásitoides, hongos, virus y bacterias. Este método constituye una de las opciones viables para atender la demanda alimenticia de manera sostenible a corto y largo plazo. Los microorganismos utilizados atacan solamente a plagas objetivo, son eficaces y no dejan residuos tóxicos en el ambiente, lo cual también favorece a la salud humana (Boldini *et al.*, 2019). Algunos de los microorganismos que han sido investigados o utilizados para el control biológico de enfermedades en el cultivo de tomate se mencionan continuación (Tabla 4), en donde se observa que las bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido ampliamente utilizadas.

**Tabla 4.** Microorganismos utilizados en el biocontrol de fitopatógenos del tomate.

Fitopatógeno	Microorganismo antagonista	Referencia
<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Trichoderma</i> spp.	Romero-Arenas <i>et al.</i> , 2017
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Bacillus</i> spp. y <i>Trichoderma</i> spp.	Hernandez y Bustamante, 2001; Kariuki <i>et al.</i> , 2020
<i>Fusarium solani</i>	<i>Paenibacillus lentimorbus</i> y <i>Trichoderma</i> spp.	Tenorio <i>et al.</i> , 2004
<i>Alternaria solani</i> y <i>Phytophthora infestans</i>	<i>Trichoderma</i> spp.	Michel-Aceves <i>et al.</i> , 2008

<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Escobar <i>et al.</i> , 2004
<i>Phytophthora</i> spp., <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Izzeddin y Medina, 2011
<i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Prabha <i>et al.</i> , 2014
<i>R. rhizogenes</i>	<i>Paenibacillus</i> spp.	Vanlommel <i>et al.</i> , 2020; Vargas <i>et al.</i> , 2021
<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2019
<i>Botrytis cinerea</i> y <i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusarium osyssporum</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kravchenko <i>et al.</i> , 2003
<i>R. Rhizogenes</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	de Freitas, 2021

## 2.6.1 Métodos de control para la enfermedad de las “raíces pilosas”

### 2.6.1.1 Prácticas culturales

Existen diversos factores que incrementan la incidencia de la enfermedad, entre ellos la falta de rotación de cultivos, el uso de agua contaminada para el riego, condiciones climáticas extremas, la generación de heridas en la planta mediante herramientas de uso agrícola y la nula o inadecuada desinfección de dichas. La presencia de estos factores ha dificultado el control de la enfermedad, la cual, hasta el momento se considera irreversible. En su lugar, se han adoptado diversas estrategias orientadas a reducir los síntomas. Se pueden tomar acciones que beneficien el crecimiento reproductivo para corregir el crecimiento vegetativo excesivo (raíces) como una forma de reducir las pérdidas de rendimiento causadas por la enfermedad “raíces pilosas”. Una de ellas es la poda de raíces y la variación del pH en la solución nutritiva o la poda de hojas, la cual estimula el

crecimiento reproductivo ya que la planta dispone de más energía para la producción de flores, frutos y su desarrollo (Kim *et al.*, 2014). Sin embargo, estas opciones solo han sido descritas, pero ninguna ha sido puesta a prueba para el control de la enfermedad (Bosmans *et al.*, 2017).

Otras posibles formas de controlar los síntomas de la enfermedad a través de prácticas culturales, es la elección del portainjerto, la variedad de cultivo y el sustrato de crecimiento. La variedad de cultivo (Berg, 2009) así como los diferentes portainjertos influyen en el crecimiento vegetativo, reproductivo, el rendimiento y la calidad de fruto de la planta (Abdelmageed y Gruda, 2009; Spornberger y Pieber 2007). También se ha reportado que el tipo de sustrato influye en el crecimiento vegetativo o generativo de las plantas (Aghdak *et al.*, 2016), así como en el desarrollo de enfermedades (Bosmans *et al.*, 2017).

#### **2.6.1.2 Métodos químicos**

Generalmente la solución nutritiva en sistemas hidropónicos es recirculada y reutilizada y el agua de riego suele provenir de pozos, estanques, lagos o ríos, por lo cual puede albergar patógenos (Stewart-Wade, 2011). Si no se tienen los cuidados necesarios al recircular la solución nutritiva, es posible que se convierta en una fuente de infección para las demás plantas en el sistema de riego. Las técnicas utilizadas para la desinfección de la solución nutritiva o las tuberías de riego son el uso de biocidas y la desinfección de la solución nutritiva a través de luz ultravioleta (UV) (Pozos *et al.*, 2004). Los tensoactivos catiónicos como el cloruro de benzalconio (BC), el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), Physan 20 compuesto de amonio cuaternario (una mezcla de cloruro de alquildimetilbencilamonio y cloruro de alquildimetyltilbencilamonio) han logrado eliminar totalmente las bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* en soluciones de 7,5 y 2 ppm, respectivamente. También se ha tenido el mismo éxito utilizando hipoclorito de sodio a 0.5 ppm (Yakabe *et al.*, 2012). El uso de desinfectantes a base de cloro no son la mejor opción, ya que estos pueden degradarse a productos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos lo que ocasionaría problemas con los residuos (Bosmans *et al.*, 2017).

Por otra parte, la mayoría de los agricultores han optado por la desinfección con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para el control de la enfermedad, ya que es la opción menos contaminante para el ambiente. Sin embargo, algunas especies de *Agrobacterium* (biovar 1) son positivas para presencia de la enzima catalasa y por lo tanto son capaces de tolerar el  $H_2O_2$ . Para las cepas catalasa positiva, se recomienda el tratamiento con 100 ppm de  $H_2O_2$  y para las cepas catalasa negativa 50 ppm de  $H_2O_2$ , estas concentraciones de  $H_2O_2$  han demostrado una disminución de la población en biopelícula y en agua (Bosmans *et al.*, 2016). Cabe destacar, que a lo largo del sistema de riego la concentración de  $H_2O_2$  disminuye debido su reacción con la materia orgánica, ocasionando que haya mayor incidencia de la enfermedad en las plantas que estén al final de los circuitos de riego. Para esto se recomienda monitorear la concentración de  $H_2O_2$  a lo largo del sistema de riego o aplicar  $H_2O_2$  en diferentes puntos (Bosmans *et al.*, 2017).

#### **2.6.1.3 Métodos de control biológico**

Actualmente no existen productos comerciales para el control biológico de la enfermedad “raíces pilosas”. En cuanto a estudios sobre microorganismos con capacidad de biocontrol, Bosmans *et al.* (2017) reportaron el uso de diferentes cepas del género *Paenibacillus* como pretratamiento en plantas de tomate infectadas por *R. rhizogenes* en condiciones de invernadero. Diecisiete semanas después de la infección artificial, la incidencia de la enfermedad se vio reducida un 30 % a diferencia del tratamiento control, sin embargo, no se obtuvieron los mismos resultados cuando Vanlommel *et al* (2020) trabajo con una de las cepas más activas de *Paenibacillus* reportada con capacidad antagónica y obtuvieron una reducción de la incidencia de la enfermedad casi nula. Aun así, es necesario realizar estudios como la caracterización de las cepas de *Paenibacillus*, conocer su modo de acción para su uso como organismo de control biológico y determinar si estas cepas tienen la capacidad de afectar o controlar la formación de biopelículas de *Agrobacterium*.

Por otra parte, de Freitas en 2021 evaluó 49 cepas diferentes de *Pseudomonas* en condiciones *in vitro* e *in vivo*, en donde solo las cepas de *P. protegens* 1B1 y *P. brassicacearum* 93G8 mostraron una reducción de la incidencia de la enfermedad “raíces

pilosas” en tomate del 80 %. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados se obtuvieron en condiciones climáticas, edáficas y agrícolas propias de Estados Unidos, por lo que su aplicación directa en México no es necesariamente viable. Las cepas utilizadas en biocontrol suelen estar adaptadas a su entorno local, incluyendo factores como la temperatura, el pH del suelo, la microbiota nativa y las prácticas agrícolas (Schmidt *et al.*, 2004). Por tanto, el éxito de un agente de biocontrol en un país no garantiza que funcionará igual en otro, ya que el desempeño de estas bacterias puede variar considerablemente según el contexto ambiental. Esto resalta la necesidad de realizar evaluaciones locales para seleccionar cepas realmente eficaces bajo las condiciones específicas de cultivo en México.

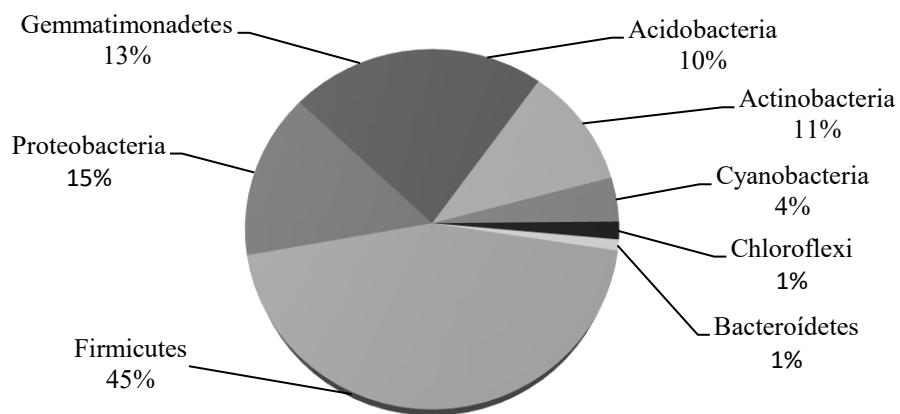
## **2.7 Microbioma de la raíz de tomate**

Algunas bacterias presentes en la rizosfera son consideradas organismos de control biológico ideales para combatir fitopatógenos transmitidos por el suelo, esto debido a su efectiva colonización, su capacidad para proteger las plantas en diferentes condiciones y la producción de compuestos antimicrobianos (Sharma *et al.*, 2009).

En la zona de la rizosfera de las plantas se lleva a cabo la absorción de agua y nutrientes, así como la interacción entre diferentes microorganismos que conforman una comunidad, lo cual es conocido como microbioma (Hashem *et al.*, 2019). Este microbioma tiene un efecto importante en la sanidad vegetal. Sirve como banco de “semillas” microbianas donde los microorganismos transforman sustancias orgánicas e inorgánicas en nutrientes accesibles para las plantas, además de regular diversas funciones dentro de la planta que influyen en el sistema natural de defensa frente a patógenos (Dlamini *et al.*, 2022). El sistema de defensa de la planta pasa por alto la colonización por microorganismos beneficiosos, y estos evaden o suprimen la inmunidad del huésped, lo que contribuye a las interacciones entre hospedadores y comensales (Bai *et al.*, 2022).

Entre las bacterias beneficiosas comúnmente presentes en la rizósfera de la planta de tomate se encuentran especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* (Hashem *et al.*, 2019; Luna-Martinez *et al.*, 2013). Estos géneros colonizadores exitosos de la rizósfera han sido reportados como promotores de crecimiento (Dlamini *et al.*, 2022) y cuentan con capacidad

de biocontrol de enfermedades mediante mecanismos de acción como la antibiosis, la competencia por nutrientes y la inducción del sistema de defensa de la planta. Estas especies contienen genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs), los cuales son importantes para el biocontrol de patógenos. La eficiencia de estas especies se asocia con el número de genes que albergan para la síntesis de los AMPs (García-Martínez *et al.*, 2022). Además, los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se encuentran dentro del phylum Firmicutes y Proteobacteria, los cuales son los más abundantes en la rizosfera de tomate (Figura 3) (Cordero-Ramírez *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Abundancia de phyla procariotas en la rizosfera de tomate. (Cordero-Ramírez *et al.*, 2012).

### 2.7.1 *Bacillus* spp.

En el género *Bacillus* se encuentran bacterias Gram positivas, las cuales se caracterizan por ser predominantes en cuanto a promotores de crecimiento de las plantas, puesto que tienen efectos positivos directos e indirectos sobre el crecimiento de las plantas además de que reducen el estrés biótico y abiótico. Producen lipopeptidos (AMPs) como fengicina, surfactina e iturina (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2019), que pueden ser usados como sustituto de los agroquímicos o como un complemento para bioplaguicidas y biofertilizantes para el control de enfermedades de plantas (Tabla 5) (Hashem *et al.*, 2019). *Bacillus* spp. tienen la capacidad de formar biopelículas en superficies inertes, enzimas hidrolíticas y pueden

modificar su entorno de manera benéfica para sí mismo. Además, tienen la capacidad de producir endosporas, que ayudan a las bacterias a sobrevivir por un largo periodo de tiempo y bajo condiciones adversas, esto facilita el proceso de formulación para su uso como agente de biocontrol (Hashem *et al.*, 2019).

### **2.7.2 *Pseudomonas* spp.**

Entre las bacterias reconocidas por su actividad antimicrobiana destaca el género *Pseudomonas*, el cual tiene gran relevancia en la agricultura, ya que varias de sus especies han demostrado ser beneficiosas para las plantas. Para el año 2020, se habían descrito más de 200 especies dentro de este género, y muchas de ellas fueron clasificadas dentro del grupo *P. fluorescens* (Chlebek *et al.*, 2020). Dentro de este grupo se encuentran bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales favorecen el desarrollo de las plantas mediante diversos mecanismos, como la producción de sideróforos, la síntesis de antibióticos, la generación de fitohormonas, la mejora en la absorción de minerales y la producción de enzimas (Kabdwal *et al.*, 2019). También, alberga genes involucrados en la biosíntesis de lipopéptidos antimicrobianos (AMPs) como el 2,4-diacetilfloroglucinol (phID) y pirrolnitrina (prnD), los cuales son esenciales para el biocontrol de diversos fitopatógenos (Tabla 6) (García-Martínez *et al.*, 2022). Una de sus principales ventajas es su capacidad para crecer rápidamente en condiciones in vitro, lo que permite su producción a gran escala. Además, utiliza de forma eficiente los exudados de raíces y semillas, lo que le facilita colonizar la rizósfera y el interior de la planta, incrementando su población y adaptándose a las condiciones ambientales (Sivasakthi *et al.*, 2014).

**Tabla 5.** Capacidad antagónica de cepas de *Bacillus subtilis* frente a fitopatógenos.

Fitopatógeno	Hallazgos	Referencia
<i>Fusarium solani</i>	Efecto preventivo y curativo en hojas de maracuyá.	Chen <i>et al.</i> , 2021
<i>Cephalosporium maydis</i>	En plantas de maíz en invernadero y en campo redujo los síntomas de la enfermedad.	Ghazy y El-Nahrawy, 2021
<i>Rhizoctonia solani</i>	Capacidad antagónica frente a <i>R. solani</i> , además de promover el desarrollo vegetal y estimular el sistema de defensa de la planta.	Jamali <i>et al.</i> , 2020
<i>Fusarium</i> sp. y <i>Phytophthora</i> sp.	Presenta capacidad de inhibición para fitopatógenos en papa postcosecha.	Lastochkina <i>et al.</i> , 2020
<i>Phytophthora sojae</i>	Impide el crecimiento del micelio del fitopatógeno además de estimular el sistema de defensa en las plantas de soja	Liu <i>et al.</i> , 2019
<i>Cladosporium fulvum</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	En plantas de tomate disminuyeron los daños ocasionados por el fitopatógeno.	Wang <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Hubo un efecto antifúngico en granos de pistacho en condiciones <i>in vitro</i>	Siahmoshteh <i>et al.</i> , 2017
<i>Sporisorium reilianum</i>	Disminuyó la incidencia de la enfermedad y aumento la producción de maíz en campo	Mercado-Flores <i>et al.</i> , 2014
<i>Stenocarpella macrospora</i> y <i>Stenocarpella maydis</i>	Una cepa de <i>Bacillus subtilis</i> obtenida de la rizosfera de maíz, resultó antagonista para estos fitopatógenos	Petatán-Sagahón <i>et al.</i> , 2011

(González-León *et al.*, 2023)

**Tabla 6.** Capacidad antagónica de cepas de *Pseudomonas fluorescens* frente a fitopatógenos.

Fitopatógeno	Hallazgos	Referencia
<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Helminthosporium sativum</i>	Presenta actividad antifúngica mediante la producción de metabolitos.	Gaur <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhizoctoni solani</i>	<i>P. fluorescens</i> resultó ser fuertemente antagonista frente al agente causal de “damping-off” en algodón.	Gaur <i>et al.</i> , 2004
<i>Rhizoctonia bataticola</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Presenta actividad antifúngica frente a fitopatógenos en arroz y caña de azúcar.	Kumar <i>et al.</i> , 2004
<i>Xanthomonas oryzae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Oryza sativa</i>	Fitopatógenos del arroz son inhibidos por cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. obtenidas de la rizosfera de arroz.	Reddy <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Utilizada para controlar la enfermedad del nudo del olivo causada por <i>P. savastanoi</i> .	Khavazi <i>et al.</i> , 2008
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Suprime la pudrición negra de la raíz del tabaco.	Siddiqui <i>et al.</i> , 2005
<i>Meloidogyne javanica</i>	Biocontrol frente al nematodo agallador en condiciones <i>in situ</i> .	Siddiqui <i>et al.</i> , 2005

(Sivasakthi, 2014)

### **3. HIPOTESIS**

Los aislados de la rizósfera de tomate de un invernadero con incidencia de la enfermedad de las “raíces pilosas” pertenecen al género *Agrobacterium*, y son susceptibles al biocontrol empleando cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens*.

## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Caracterizar aislados bacterianos provenientes de la rizósfera de cultivos de tomate de invernadero con incidencia de la enfermedad de las “raíces pilosas”, y ensayar *in vitro* el potencial de cepas benéficas de *Bacillus* y *Pseudomonas* como agentes de biocontrol.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar cepas con características relacionadas al género de *Agrobacterium* mediante pruebas bioquímicas.
- Evaluar la capacidad rizogénica de los aislados mediante ensayos de patogenicidad en plántulas de frijol y tomate.
- Identificar genes de virulencia en los genomas de los aislados con mayor capacidad rizogénica.
- Determinar la capacidad inhibitoria *in vitro* de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* sobre las cepas patogénicas inductoras de la rizogénesis.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Sitio de estudio**

La presente investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Química ubicado en la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), ubicada en Centro Universitario, Santiago de Querétaro, Qro, México con coordenadas 20° 35'25.9"N 100°24'39.3"W.

El sitio de estudio, fuente de los aislados bacterianos, fue un invernadero productor tomate ubicado en el estado de Querétaro, México, el cual ha presentado por al menos tres años consecutivos incidencia de la enfermedad “raíces pilosas”. El muestreo se realizó en agosto del 2023, recolectando muestras de agua del reservorio artificial, muestras agua de riego después de haber sido desinfectada con luz ultravioleta (280 nm) y muestras de la rizósfera de plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. “Sweetelle”) de 52 de semanas de trasplante con sintomatología de la enfermedad “raíces pilosas”.

### **5.2 Material biológico**

La cepa de *A. rhizogenes* K599 utilizada como control positivo para los ensayos, fue proporcionada por la Dra. Georgina Estrada Navarrete del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (Estrada-Navarrete *et al.*, 2006). Mientras que la cepa Ar534 pertenece a una colección del Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), la cual fue previamente aislada del sitio de estudio (Pacheco y Jiménez, 2022). Para los ensayos de patogenicidad en germinados y plántulas, se utilizaron semillas de frijol negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris*) (Valle Verde®, México) y semillas de tomate cv. Alfredo (Falcon seeds®, México).

Las cepas *Bacillus* sp. Q11, Q37, Q38 y Q39 y *P. fluorescens* Q35, fueron proporcionadas por la empresa mexicana Quimia®. Las cepas de *Bacillus* sp. FR4B12, PEu y AG22 (aislada de raíz de tomate), fueron obtenidas de trabajos previos de investigación

realizados en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la UAQ.

El material biológico utilizado fue inactivado al final de los ensayos mediante esterilización de acuerdo con la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

### **5.3 Muestreo y aislamiento de bacterias patógenas**

El muestreo se realizó de manera aleatoria en tres tipos de fuentes: raíces de plantas de tomate, agua del reservorio artificial (sin tratamiento de desinfección) y agua de riego desinfectada mediante luz ultravioleta. Las muestras se recolectaron en tubos Falcon estériles de 15 mL y conservadas a 4 °C hasta su procesamiento.

Para el aislamiento de bacterias, se pesó 1 g de muestra y se diluyó en 9 mL de agua destilada estéril. La mezcla se agitó durante 2 min en un vórtex Labnique® (Labnique, El Salvador). En el caso de las muestras de agua, se siguió el mismo procedimiento, utilizando 1 mL de muestra diluido en 9 mL de agua destilada estéril. A partir de estas suspensiones iniciales se realizaron diluciones seriadas decimales. De cada dilución, se tomaron alícuotas de 200 µL por duplicado y se sembraron por extensión en placas Petri con agar LB (Condalab®, España). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h en una incubadora Ecoshel® modelo 9025E (Ecoshel, México).

Las colonias con morfologías distintivas se seleccionaron y caracterizaron según criterios fenotípicos, considerando tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia. Los aislados seleccionados se estriaron en placas con agar LB e incubaron nuevamente a 30 °C durante 48 h para su purificación. Finalmente, las cepas bacterianas puras se conservaron en glicerol al 20 % (v/v) a -20 °C.

### **5.4 Caracterización de los aislados bacterianos**

Los aislados bacterianos se caracterizaron mediante pruebas generales como la tinción de Gram para la discriminación de bacterias Gram-negativas y la prueba catalasa para confirmar la presencia de la enzima (Mary *et al.*, 2017). Seguido de medios selectivos tales como MG+Te, Mac Conkey (Nguyen, 2017), medio alcalino de Hofer (Hofer, 1941),

medio 2E (Shams *et al.*, 2012) y la prueba de 3-cetolactosa (Schaad, 1980) para discriminar cepas de *Agrobacterium*. Adicionalmente, se utilizó el medio agar Kligler hierro para clasificar a los aislados como fermentadores de azúcares y productores de H<sub>2</sub>S (Kligler, 1918).

#### 5.4.1 Tinción de Gram y prueba con KOH 3%

Una vez obtenidos los aislados bacterianos, se clasificaron según características básicas, como el tipo de pared celular que poseen. Se ha reportado que *Agrobacterium* spp. son bacterias Gram negativas (Bosmans *et al.*, 2017), por lo que se priorizó la selección de aquellas que presentaran esta característica. Para ello, se utilizó la tinción de Gram, la cual permite clasificar a las bacterias en dos grupos según la estructura de su pared celular. Las bacterias Gram positivas retienen el color azul-violeta debido a su pared gruesa compuesta principalmente por peptidoglucanos, mientras que las Gram negativas se decoloran y adquieren el color de la safranina, ya que presentan una pared delgada de peptidoglucanos y una bicapa externa de lipoproteínas. Esta diferencia estructural determina su comportamiento frente a la tinción (Rodríguez y Arenas, 2018). A continuación, se describe el procedimiento realizado para la tinción de Gram:

1. Hacer un frotis
2. Fijarlo a la flama
3. Cubrir con cristal violeta durante 1 min y después lavar ligeramente con agua
4. Cubrir con yodopovidona (Lugol) durante 1 min
5. Lavar con agua corriente
6. Decolorar con alcohol-acetona (1:1)
7. Lavar con agua corriente
8. Cubrir con safranina durante 30 s
9. Lavar con agua corriente
10. Dejar secar y observar al microscopio

Como método complementario para confirmar los resultados, se utilizó la prueba con KOH al 3 %. Esta técnica consistió en tomar una colonia bacteriana con un asa estéril y colocarla sobre un portaobjetos, al que se le agregan unas gotas de KOH al 3 % v/v. La mezcla se homogenizó con el asa durante 30 s. En bacterias Gram negativas, se observó la formación

de una sustancia viscosa o hilos, resultado de la lisis de la pared celular delgada y la liberación de ADN. En contraste, las bacterias Gram positivas no genera este efecto, ya que su pared celular gruesa resiste la acción del KOH (Halebian *et al.*, 1981).

#### **5.4.2 Medio MG-Te**

La siembra en el medio MG-Te compuesto por telurito de potasio, es un método rápido y efectivo comúnmente utilizado para probar la capacidad de *Agrobacterium* spp. para reducir iones de telurito de potasio. Especies del género *Agrobacterium* han sido ampliamente reportadas con resistencia a la toxicidad de iones telurito, con un crecimiento en el medio de color negro (Nguyen, 2017; Palacio-Bielsa *et al.*, 2012; Costechareyre *et al.*, 2010; Mougel *et al.*, 2001). El medio contiene ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): D- manitol 5, ácido L- glutámico 2, fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5, cloruro de sodio NaCl 0.2, sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.2, extracto de levadura 0.5, telurito potásico 0.2 y agar 15. Para la preparación del medio, los reactivos se colocaron por separado en frascos junto con 20 mL de agua destilada, excepto el extracto de levadura y el agar, que se combinaron en un solo frasco con 20 mL de agua destilada. Posteriormente, los frascos con las soluciones fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego, las soluciones estériles se mezclaron en un solo frasco, se añadió telurito de potasio y el volumen total se completó con agua destilada estéril.

Una vez vertido el medio en placas Petri, las colonias bacterianas fueron sembradas y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Posteriormente, las colonias se analizaron visualmente para identificar aquellas con coloración negra, considerada como resultado positivo, mientras que las colonias sin crecimiento en el medio se clasificaron como resultado negativo.

#### **5.4.3 Medio Mac Conkey**

El medio agar Mac Conkey comúnmente es utilizado en la microbiología para aislar e identificar especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Sin embargo, también es utilizado por varios autores como

Nguyen (2017) para la selección de *Agrobacterium* sp. debido a que se desarrolla con facilidad en este medio de cultivo. Además, inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas debido a la presencia de sales biliares en el medio. El medio contiene ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): Peptona de carne 1.5, peptona de gelatina 17, cristal violeta 0.001, lactosa 10, mezcla de sales biliares ( $\text{N}^{\circ}$  3) 1.5, rojo neutro 0.03, cloruro de sodio 5, tripteína 1.5 y agar 13 (pH final:  $7.1 \pm 0.2$ ). Una vez preparado el medio, esterilizado en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min y vertido en placas Petri, las bacterias fueron sembradas e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Las peptonas en este medio actúan como nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano, mientras que la lactosa proporciona la fuente de carbohidratos. Los agentes selectivos, como el cristal violeta y la mezcla de sales biliares ( $\text{N}^{\circ}3$ ), inhiben el crecimiento de una amplia variedad de bacterias Gram positivas. Además, este medio permite identificar bacterias fermentadoras de lactosa, observándose la formación de colonias rosadas o rojizas. Por el contrario, las bacterias que no fermentan lactosa forman colonias incoloras o del mismo color que el medio (Nguyen, 2017). Para la interpretación de los resultados, se consideró como positivo el crecimiento incoloro de las colonias bacterianas.

#### **5.4.4 Prueba catalasa**

La enzima catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esta prueba se utiliza para detectar la presencia de catalasa, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo oxidasa. Para realizarla, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v) sobre una muestra bacteriana en un portaobjetos. El resultado de la prueba se consideró positivo cuando se observó efervescencia inmediata, mientras que la ausencia de efervescencia se interpretó como negativo (Mary *et al.*, 2017; Bosmans *et al.*, 2015).

#### **5.4.5 Medio alcalino de Hofer**

El medio alcalino de Hofer presenta un alto pH alcalino y es recomendado para el aislamiento selectivo de *Agrobacterium* spp, el cual tiene la capacidad de crecer a un pH de

11-12 (Hofer, 1941). El medio contiene ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): manitol 10, fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.2,  $\text{NaCl}$  0.10, extracto de levadura 1, azul de timol 0.016 y agar 15 (pH final:  $11 \pm 0.2$ ). El manitol es utilizado por la bacteria como fuente de carbohidratos o carbono. El extracto de levadura aporta nutrientes nitrogenados. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio. El fosfato dipotásico amortigua el medio. El azul de timol es un indicador de pH, el cual permanece azul a un pH alcalino alto y vira a amarillo cuando el pH cambia a ácido, indicando si la bacteria tiene la capacidad de acidificar el medio. Una vez sembradas las colonias bacterianas, estas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 h (Laxmi *et al.*, 2018; Nguyen., 2017). Para la interpretación del resultado, se consideró positivo el crecimiento de las cepas en el medio.

#### **5.4.6 Medio 2E**

Este medio de cultivo es utilizado para aislar bacterias del género *Agrobacterium*, las cuales son capaces de utilizar el eritritol como única fuente de carbono. El medio contiene ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): eritritol 3.05, nitrato de amonio 0.25, fosfato monopotásico 0.54, fosfato dipotásico 1.04, sulfato de magnesio 0.25, 5 mL de verde de malaquita al 1 % v/v, agar 15. Los componentes se diluirán en agua destilada y el medio de cultivo será esterilizado en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min. Se sembrarán las colonias bacterianas en placas Petri con medio 2E y se incubarán por 48 h a  $30^\circ\text{C}$  (Palacio-Bielsa *et al.*, 2012; Rebecca-Morton y Fuqua., 2012; Shams *et al.*, 2012; Mougel *et al.*, 2001). Para la interpretación del resultado, se consideró positivo el crecimiento de las cepas en el medio.

#### **5.4.7 Agar Kligler hierro**

El medio Kligler hierro es utilizado frecuentemente en la microbiología para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de carbohidratos como glucosa o lactosa y a la producción de ácido sulfídrico. El medio contiene ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): peptona de carne 13, cloruro de sodio 5, lactosa 10, tripteína 10, glucosa 1, citrato de hierro y amonio 0.5, tiosulfato de sodio 0.3, rojo de fenol 0.025 y agar 15 (pH final:  $7.3 \pm 0.2$ ). En el medio de cultivo, la peptona de carne y la tripteína suministran los nutrientes esenciales para el crecimiento de las bacterias. La lactosa y la glucosa actúan como fuentes de carbohidratos

fermentables. El tiosulfato de sodio sirve como sustrato para la producción de ácido sulfídrico, mientras que el citrato de hierro y amonio proporciona iones  $\text{Fe}^{3+}$ , los cuales reaccionan con el ácido sulfídrico para formar sulfuro de hierro, caracterizado por su color negro. El rojo de fenol funciona como indicador de pH, y el cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico. Durante la fermentación de los azúcares, se generan ácidos que provocan un cambio en el indicador de pH, haciendo que el rojo de fenol vire a amarillo en un ambiente ácido. Por lo tanto, en bacterias que no fermentan lactosa, no ocurre este cambio de coloración y el medio conserva su color rojo. Además, el tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con una sal de hierro, dando lugar al característico sulfuro de hierro negro. Para la interpretación de resultados en este medio de cultivo, se tomaron en cuenta únicamente dos patrones de coloración: tubo completamente rojo (pico y fondo) y pico amarillo con fondo rojo, los cuales indican que las bacterias no fermentan lactosa (Alhusayni y AL-Khikani, 2025).

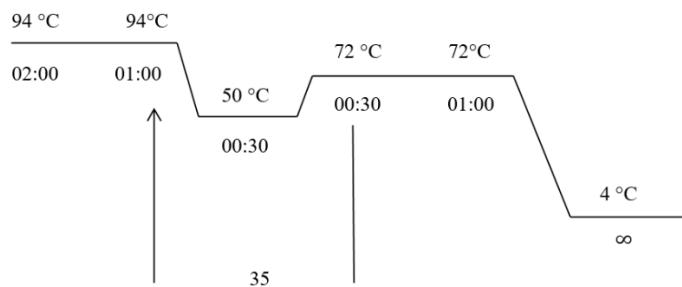
#### **5.4.8 Prueba 3-cetolactosa**

Esta prueba, utilizada por Moore *et al.* (1988), permite distinguir bacterias del género *Agrobacterium*, ya que este es capaz de oxidar la lactosa y producir 3-cetolactosa. Este compuesto reacciona con el reactivo de Benedict que es de color azul, dando lugar a un precipitado característico de  $\text{Cu}_2\text{O}$  de color amarillo. En el caso de bacterias del género *Rhizobium*, no se observa ningún cambio de color (Rebecca-Morton y Fuqua., 2012). Para la realización de la prueba 3-cetolactosa, los aislados fueron sembrados e incubados por 24 h a 30 °C en el Medio 1 compuesto por ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ): extracto de levadura 10, glucosa 20, Carbonato de calcio 20 y agar 15. Después, se sembraron e incubaron por 24 h a 30 °C en el Medio 2 compuesto por: extracto de levadura 1, lactosa 10 y agar 20 (Moore *et al.*, 1988). Posteriormente, se añadieron 2 mL de reactivo de Benedict sobre la colonia bacteriana y después de 10 min se observó el cambio de coloración (Laxmi *et al.*, 2018; Costechareyre *et al.*, 2010).

### **5.5 Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S**

Las bacterias con características bioquímicas similares a las reportadas para el género

*Agrobacterium* fueron sembradas en medio Agar Soya Trypticaseina (TSA) a 30 °C por 24 h y, de una colonia fue extraído el ADN genómico utilizando el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN bacteriano fue diluido incorporando 1 µl de ADN en 90 µl de agua ultrapura Milli-Q en tubos Eppendorf estériles. Posteriormente, se realizó la preparación de la muestra en tubos para PCR utilizando 1 µl de la solución preparada anteriormente, 1 µl de cebador 27F, 1 µl de cebador 1492R, 10 µl de solución 2x Phusion Flash PCR Master Mix marca Thermo Scientific® (Thermo Scientific, USA) 10 µl de agua ultrapura y 10 µl de aceite mineral estéril. Las muestras fueron introducidas a un termociclador marca Thermo Scientific® modelo ARKTIK (Thermo Scientific, USA) con las siguientes condiciones de desnaturización: desnaturización inicial por 2 min a 94 °C, desnaturización por 1 min a 94 °C, alineamiento por 30 s a 50 °C y extensión por 30 s a 72 °C con 35 ciclos, además de una extensión final por 1 min a 72 °C (Figura 4) (Serna-Pérez y Pérez-Molphe, 2002). Se comprobó la integridad del ADN mediante un gel de agarosa al 1 % v/v y este fue observado con ayuda de un fotodocumentador MacroVue UVis-20 (Hoefer Inc., USA). (Weisburg *et al.* 1991). Los amplicones resultantes fueron enviados para su secuenciación a Macrogen Inc. (Seúl, República de Corea). Las secuencias resultantes fueron comparadas con las reportadas en la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), fueron depositadas en el NCBI para obtener los números de accesos y finalmente fueron analizadas con el software MEGA X para la construcción de un árbol filogenético.



**Figura 4.** Condiciones de amplificación del gen ARNr 16S en el termociclador.

## **5.6 Prueba de sensibilidad a los antibióticos**

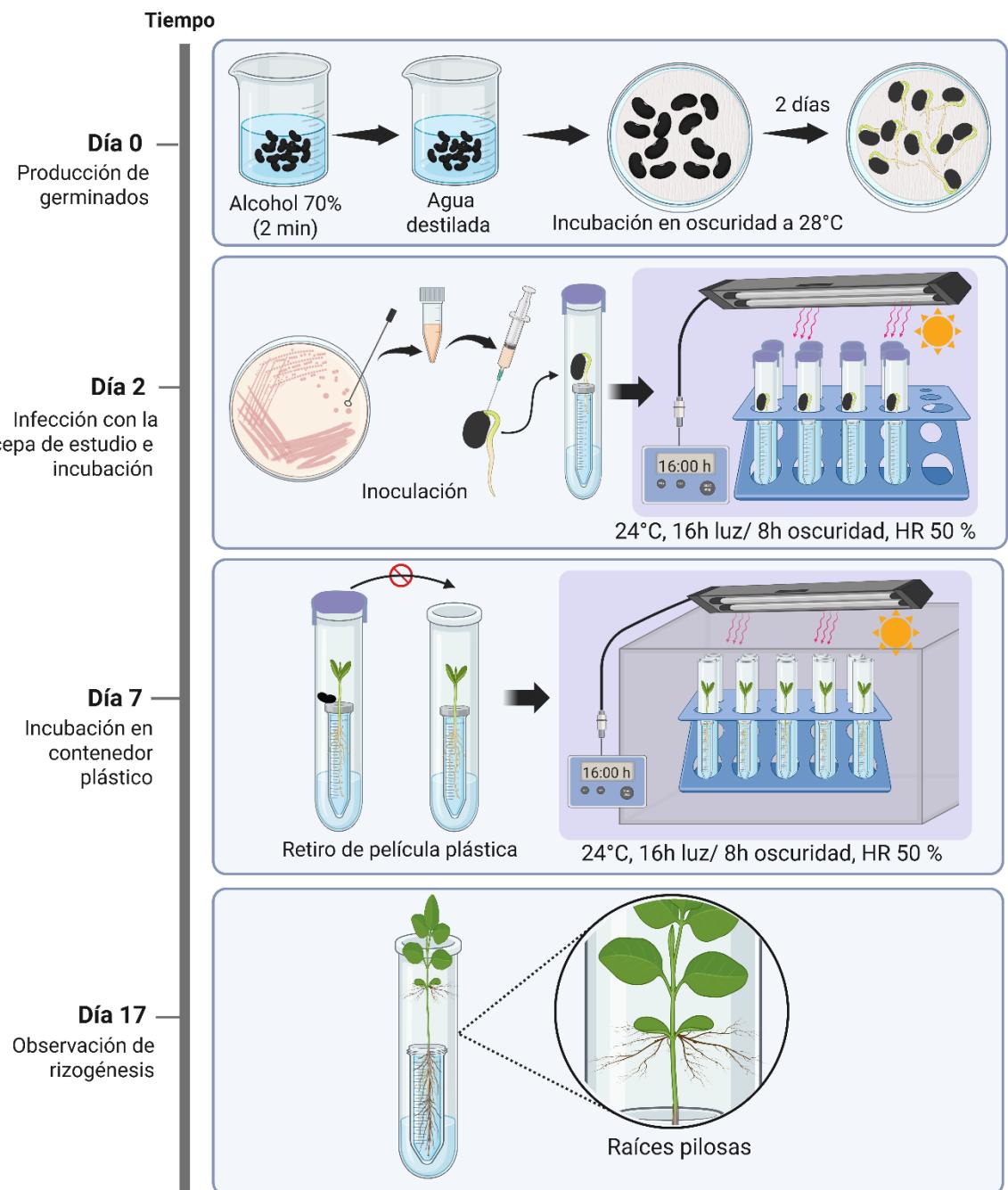
De manera complementaria, se realizó en los aislados una prueba de sensibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión en disco, utilizando multidiscos Multibac® (Quinsa, México) que contienen amikacina (30 µg), ampicilina (10 µg), carbenicilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacino (10 µg) y sulfametoxazol(trimetoprima (25 µg). Las placas de agar LB fueron incubadas a 30 °C por 24-48 h, registrando al termino el diámetro del halo de inhibición, clasificando las cepas como Susceptibles (S) para un halo de inhibición  $\geq 21$  mm, Intermedias (I) para un halo de inhibición de 17-20 mm y Resistentes (R) para un halo de inhibición de  $\leq 16$  mm, de acuerdo con el criterio de interpretación del Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Cavalieri *et al.*, 2005). Con la información se generó un mapa de calor utilizando el programa Visual Paradigm Online.

## **5.7 Ensayos de patogenicidad**

### **5.7.1 Ensayos de patogenicidad en frijol cv. Negro Jamapa**

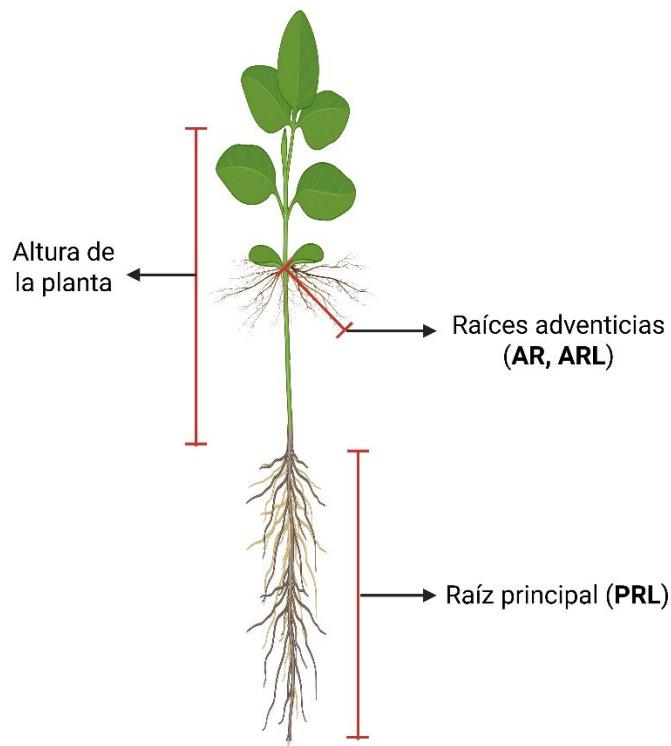
Los ensayos para determinar la patogenicidad de los aislados bacterianos se realizaron sobre germinados de frijol y plántulas de tomate como plantas modelo. Para el ensayo de frijol (Figura 5), semillas del cv. Negro “Jamapa” fueron desinfectadas sumergiéndolas en alcohol al 70 % por 2 min y enjuagadas posteriormente con agua destilada estéril. Después, fueron puestas sobre papel filtro húmedo estéril en cajas Petri para inducir la germinación. Y al segundo día, después de haber emergido la radícula, diez germinados de frijol fueron inoculados por inyección con cada uno de los patógenos en la base del hipocótilo, empleando 50 uL de una suspensión bacteriana que contenía  $1 \times 10^{12}$  UFC/ml. Diez germinados que sirvieron como control negativo fueron inoculados con agua destilada estéril. Después, todos los germinados fueron colocados en un sistema hidropónico con solución B&D (Broughton y Dilworth, 1971) e incubados a  $28 \pm 5$  °C con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. 15 días después de la infección, se registraron las raíces

formadas en el área de la punción, registrando el número de raíces adventicias (AR), largo de raíces adventicias (LAR), largo de raíces principales (PRL) y altura de la planta (Figura 6), las cuales fueron medidas con un Vernier (T&O®, China) (Nanjareddy *et al.*, 2017).



**Figura 5.** Metodología para evaluar la patogenicidad en germinados de frijol (Creado con:

<https://BioRender.com>)



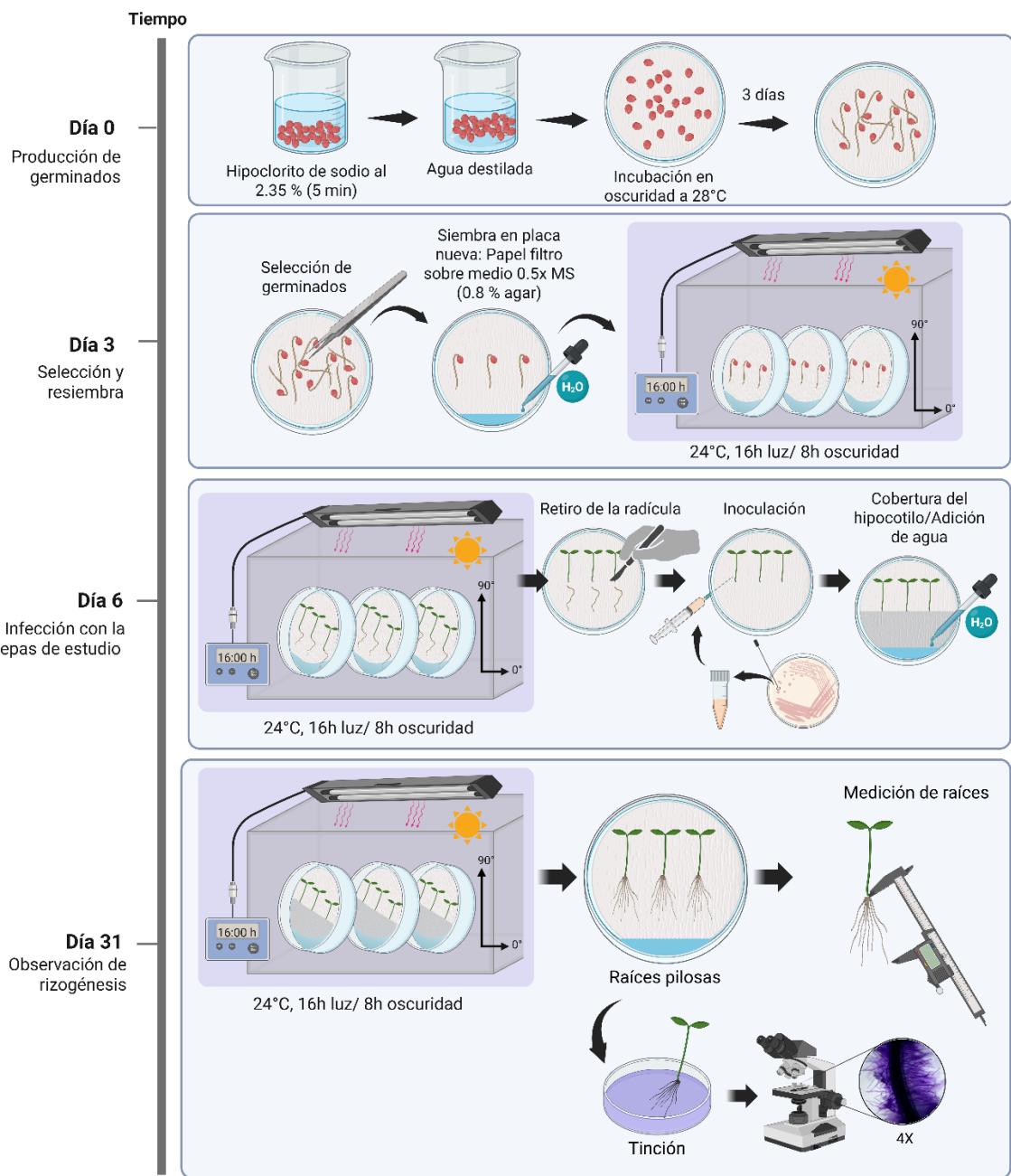
**Figura 6.** Parámetros medidos en plántulas de frijol 15 días después de la infección. (Creado con: <https://BioRender.com>).

### 5.7.2 Ensayos de patogenicidad en tomate cv. Alfredo

El segundo ensayo de patogenicidad en plántulas de tomate se realizó de acuerdo con el protocolo propuesto por Ho-Plágaro et al (2018) con modificaciones (Figura 7). Semillas del tomate cv. Alfredo fueron lavadas con (Extran<sup>®</sup>, Germany) al 10% por 30 min y enjuagadas con agua estéril. Después, fueron puestas sobre papel filtro húmedo en placas Petri y al tercer día, los germinados que tenían una longitud radical de 3 cm, fueron trasladadas a nuevas cajas Petri con papel filtro sobre medio MS 0.5X (agar 0.8 %), ajustando la humedad con agua estéril. Las placas inclinadas a 90° fueron incubadas en una cámara de crecimiento durante 3 días a 28±5 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Para la infección, a cinco plántulas por cada tratamiento, se les eliminó la radícula desde la parte media del hipocótilo, y el tallo del esqueje resultante, fue inyectado con suspensión bacteriana de los microorganismos patógenos a una densidad de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Diez días después, las plántulas fueron transferidas a un sistema hidropónico en tubos con una solución de B&D (Broughton y Dilworth, 1971), incubándolos por 15 días a  $28 \pm 5$  °C con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Transcurrido este periodo, se registró el número de raíces formadas en el área de la punción y el largo de las raíces con un Vernier (T&O®, China). Posteriormente, las raíces fueron teñidas con una solución de azul de toluidina al 0.05 %/Tween 20 al 0.1 % por 20 s, seguido de un lavado con agua. Las raíces fueron observadas y fotografiadas en un microscópico (ZEISS®, Alemania) con el objetivo 4X, el tamaño de la imagen fue calculada utilizando el programa ZEN 2.5 blue edition, que sirvió para después calcular el área de la raíz empleando el software imageJ (versión 1.54g), generando la siguiente Ecuación 1.

$$\% \text{ Área} = \frac{\text{Área pelos radicales } (\mu\text{m}^2)}{961590.533 \mu\text{m}^2} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$



**Figura 7.** Metodología para evaluar la patogenicidad en plántulas de tomate. (Creado con: <https://BioRender.com>).

## **5.8 Análisis genómico de los aislados con mayor actividad rizogénica**

El ADN genómico se extrajo con el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se perfiló mediante secuenciación genómica tipo Shotgun. Las bibliotecas de secuenciación se prepararon con el kit Illumina® DNA Library Prep (Illumina, USA) y la biblioteca final se secuenció en la plataforma NovaSeq® (Illumina, USA) en Zymo Research, Irvine, CA, USA. En el análisis bioinformático, las lecturas de secuencias sin procesar se recortaron para eliminar fracciones de baja calidad y adaptadores con Trimmomatic-0.33 (Bolger *et al.*, 2014): recorte de calidad mediante ventana deslizante con un tamaño de ventana de 6 pb y un corte de calidad de 20; se eliminaron las lecturas con un tamaño inferior a 70 pb. Posteriormente, las lecturas derivadas del hospedador se eliminaron utilizando Kraken2 contra algunos genomas hospedadores comunes de Eukaryote. Las lecturas de baja diversidad se detectaron y eliminaron utilizando sdust (<https://github.com/lh3/sdust>). Las lecturas supervivientes se sometieron a análisis taxonómicos y funcionales adicionales como se indica a continuación. La identificación de genes de resistencia a antimicrobianos y factores de virulencia se realizó con el alineador de secuencias DIAMOND (Buchfink *et al.*, 2015) contra bases de datos de referencia seleccionadas internamente de los repositorios del NCBI. La base de datos representativa de especies GTDB (RS207) se utilizó para la identificación de bacterias y arqueas. El perfil funcional se realizó utilizando Humann3 (Beghini, *et al.*, 2021), incluida la identificación de la familia de genes UniRef y las vías metabólicas MetaCyc. Adicionalmente, la secuencia del genoma completo fue analizada utilizando la plataforma BV-BRC, y los datos genómicos fueron depositados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) bajo el número de acceso BioProject ID: PRJNA1274987. El mapa genómico y el ensamblaje del plásmido se realizaron mediante la plataforma Proksee, utilizando las bases de datos de Prokka y BV-BRC.

## **5.9 Ensayos *in vitro* de biocontrol**

Las cepas que presentaron genes de virulencia asociados a los plásmidos pRi fueron sometidas a ensayos *in vitro* de biocontrol mediante el método de estrías cruzadas, con el

propósito de evaluar la inhibición y los cambios morfológicos en el crecimiento bacteriano.

Para cada tratamiento, se inoculó una colonia de la bacteria patógena en una línea vertical sobre una placa Petri con agar LB, mientras que la bacteria benéfica se sembró, a partir de una colonia, en una línea horizontal que intersectaba la primera. Las cepas benéficas utilizadas fueron *Bacillus* sp. Q37, Q38, Q39, Q11, PEu, FR4B12, AG2.2 y *Pseudomonas fluorescens* Q35 (Pipite *et al.*, 2022).

Los ensayos se incubaron a tres temperaturas diferentes (25, 30 y 35 °C) para evaluar el efecto de la temperatura sobre la interacción entre cepas. Las mediciones del diámetro del halo de inhibición, así como las observaciones de cambios en la morfología o crecimiento bacteriano, se registraron a los 2, 7 y 14 días de incubación.

### **5.10 Ensayos de inhibición con agroquímicos**

Las cepas patógenas seleccionadas en los ensayos de biocontrol *in vitro* fueron evaluadas frente a los agroquímicos Busan® y Fito TSP®, con el objetivo de comparar su eficacia respecto a los métodos comúnmente empleados para el manejo de la enfermedad.

Para ello, se utilizó el método de dispersión en placa. Se inocularon 150 µL de la suspensión bacteriana patógena a una concentración de  $1\times10^6$  UFC/mL sobre placas Petri con agar LB, distribuyéndose de manera uniforme. Posteriormente, se colocaron cuatro discos de papel filtro (7 mm de diámetro) sobre la superficie del agar.

En los tratamientos con Busan®, se aplicaron 10 µL del producto a concentraciones de 0.01, 1, 1.5 y 2 % en cada disco. En los tratamientos con Fito TSP®, se añadieron 10 µL del producto a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 1.5 %. Cada concentración fue evaluada por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Las placas se incubaron a 32 °C durante 72 h, y posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición con un vernier digital (T&O®, China).

### **5.11 Diseño experimental y análisis estadístico**

Para los ensayos de patogenicidad en germinados de frijol y plántulas de tomate, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar, con el fin de reducir la variación en los datos provocada por factores ambientales como la temperatura, humedad e intensidad de luz, los cuales no pudieron ser controlados de manera estricta. Este diseño permitió una evaluación más precisa del efecto de las cepas bacterianas sobre las plantas, al distribuir aleatoriamente los tratamientos dentro de cada bloque y minimizar el sesgo experimental.

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza de los datos obtenidos de las pruebas de patogenicidad y ensayos *in vivo* de biocontrol, se comprobaron mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y se sometieron a una prueba de medias con Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ) utilizando el software INFOSTAT 2013 (Libre versión 30131).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Muestreo y aislamiento de bacterias

Las bacterias aisladas de las muestras del sitio de estudio arrojaron un total de 174 aislados, 88 provinieron de la rizósfera de la planta de tomate (Figura 8), 57 fueron aislados de muestras de agua del reservorio artificial de agua y 29 corresponden a muestras de agua para riego.



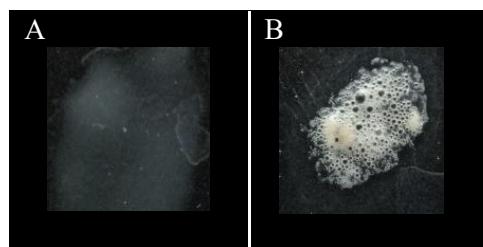
**Figura 8.** Comparación de raíces de *S. lycopersicum* en fibra de coco. (A) planta sana; (B) planta con “raíces pilosas”.

### 6.2 Caracterización de aislados bacterianos

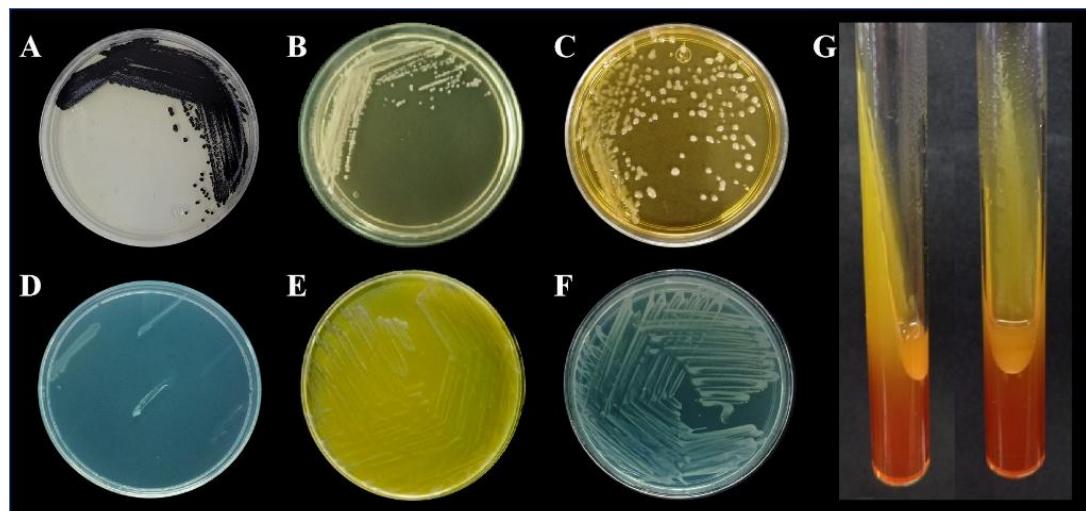
De las 174 bacterias sujetas a la tinción Gram, solo 71 bacterias resultaron Gram negativas, descartando el 60%. Después, resultado de las pruebas de crecimiento en los medios MG+Te y agar Mac Conkey que sirvieron como segundo escrutinio, se redujo a 18 el número de aislados. La reducción de telurito como prueba positiva para el medio MG+Te (Figura 10A) fue registrada por una coloración negra en las colonias (Nguyen, 2017), mientras que en el agar MacConkey, las colonias presentaron color amarillo a incoloras (Figura 10B), indicando que no son fermentativas de lactosa (Tabla 7). La prueba catalasa positiva (Figura 9B) y el crecimiento en el medio alcalino Hofer a pH 11 permitieron reducir a 16 el número de aislados (Figura 10C), similar a lo reportado por Mary *et al* (2017) y Hofer (1941). También fue empleado el crecimiento en medio 2E como una manera de caracterizar cepas de *Agrobacterium* por su capacidad de utilizar eritritol como fuente de carbono (Figura 10D) como lo reportó Shams *et al* (2012).

Adicionalmente, la prueba en medio agar Kligler utilizada para identificar la producción de

gas, ácido sulfúrico ( $H_2S$ ) y/o fermentadores de glucosa y lactosa, redujó el número de aislados a 10; asumiendo que las bacterias de *Agrobacterium* no son fermentadoras de lactosa (Vishnubhotla., *et al* 2025). Finalmente, la producción de 3-cetolactosa, característica del género *Agrobacterium*, permitió seleccionar la cepa M8R5, en cuyas colonias se formó alrededor, un halo amarillo de  $CuO_2$  en presencia del reactivo de Benedict (Figura 10E), similar al control positivo K599 (Schaad, 1980). Las cepas restantes fueron negativas a esta prueba (Figura 10F), lo cual indica que pudieran pertenecer a otros géneros.



**Figura 9.** Prueba de catalasa. (A) positiva para *Agrobacterium rhizogenes* K599; (B) negativa para el aislado M15R3.



**Figura 10.** Resultados de las pruebas bioquímicas en el escrutinio de cepas de *Agrobacterium*. (A) MG+Te agar; (B) MacConkey; (C) Hofer; (D) medio 2E; (E) producción de 3-cetolactosa; (F) sin producción de 3-cetolactosa; (G) Kligler hierro agar.

**Tabla 7.** Pruebas bioquímicas de los aislados para el escrutinio de *Agrobacterium*.

Cepa	MG+Te	Mac Conkey	Hofer	2E	3-cetolactosa	Prueba catalasa	Kligler hierro
K599	+	+	+	+	+	+	NLF
Ar534	+	+	+	+	-	+	NLF
M3A9	+	+	-	+	-	+	NLF, H <sub>2</sub> S
M6A10	+	+	+	+	-	+	NLF, H <sub>2</sub> S
M6A13	+	+	+	+	-	+	NLF
1M7A3	+	+	+	+	-	+	NLF
M8R5	+	+	+	+	+	+	NLF
M12R3	+	+	+	+	-	+	NLF, H <sub>2</sub> S
M12R12	+	+	+	+	-	+	NLF
M13R4	+	+	+	+	-	+	NLF, H <sub>2</sub> S
M13R6	+	+	+	+	-	+	NLF, H <sub>2</sub> S
M15R5	+	+	+	+	-	+	NLF

Crecimiento o positivo (+); No crecimiento o negativo (-); No fermenta la lactosa (NLF); Producción de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>S).

### 6.3 Análisis de la secuencia del gen ARNr 16S

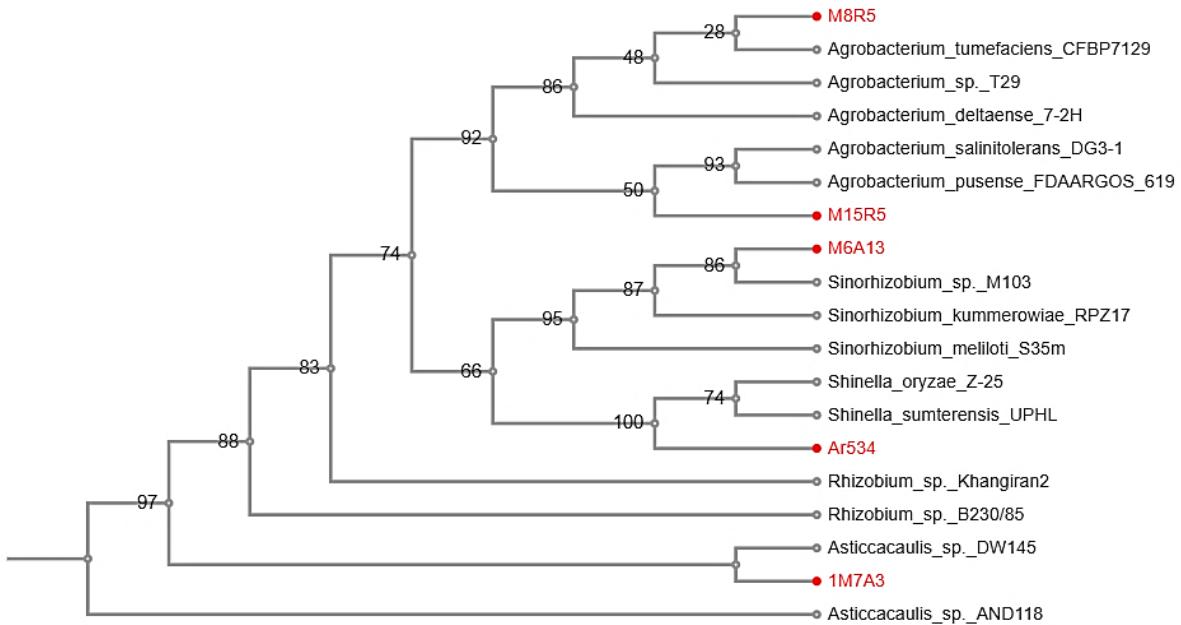
La secuenciación parcial del gen 16S ARNr identificaron once aislados bacterianos provenientes de diferentes zonas ambientales (Tabla 8).

En el tejido radicular de tomate (TR), se identificaron miembros de la clase alphaproteobacteria, Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria, correspondientes a los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Delftia*. Las cepas Ar534, M8R5 y M15R5 se asociaron a los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, mientras que las cepas M12R12, M12R3, M13R4 y M13R6 se identificaron como *Pseudomonas* y *Delftia*.

En las muestras de agua se identificaron únicamente miembros de las clases Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria. En el reservorio artificial de agua (AWR), se detectaron las cepas 1M7A3 y M3A9, pertenecientes a los géneros *Asticcacaulis* y *Pseudomonas*, respectivamente. Por otro lado, en la muestra de agua de riego desinfectada con luz UV (IWD), se identificaron las cepas M6A13 y M6A10, correspondientes a los géneros *Sinorhizobium* y *Pseudomonas*. Las secuencias fueron depositadas en la base de datos del NCBI con el código de acceso mostrado en la Tabla 8.

Una vez identificados los aislados, se seleccionaron solo aquellos pertenecientes a la clase

Alphaproteobacteria (Figura 11), ya que de acuerdo con lo reportado con Weller *et al.* (2006), algunas de las especies pertenecientes a esta clase, podrían ser causantes de la enfermedad “raíces pilosas” debido a una transferencia horizontal del plásmido pRi a otras especies no patógenas. Por ello, solo estos aislados fueron considerados para las pruebas de patogenicidad.



**Figura 11.** Análisis filogenético de las cepas Ar534, M15R5, M8R5, M6A13 y 1M7A3.

**Tabla 8.** Aislados identificados en las muestras ambientales.

Cepa	ID Acceso	% Cobertura	Clase	Género	Zona de muestreo
Ar534	PV775690	100 %		<i>Rhizobium</i>	TR
M8R5	PV775700	100 %		<i>Agrobacterium</i>	TR
M15R5	PV775757	100 %	Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	TR
1M7A3	PV776154	100 %		<i>Asticcacaulis</i>	AWR
M6A13	PV774751	100 %		<i>Sinorhizobium</i>	IWD
M3A9	PV803543	100 %		<i>Pseudomonas</i>	AWR
M6A10	PV803544	100 %	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	IWD
M12R12	PV803545	100 %		<i>Pseudomonas</i>	TR
M12R3	PV803546	100 %		<i>Delftia</i>	TR
M13R4	PV803547	100 %	Betaproteobacteria	<i>Delftia</i>	TR

---

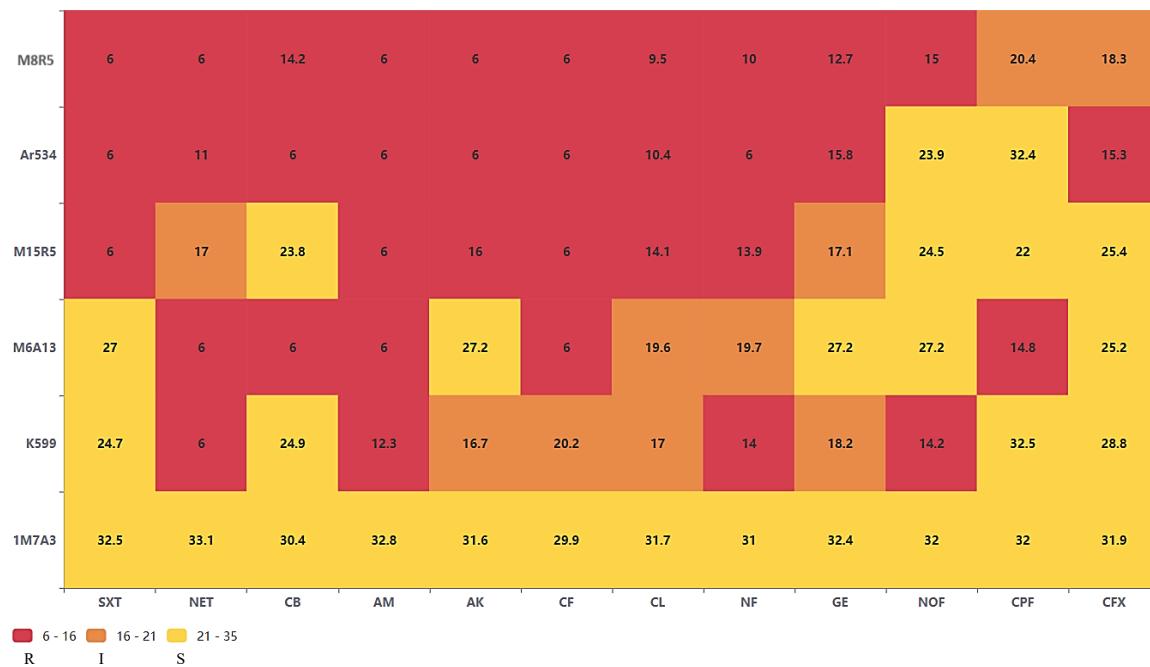
Tejido radicular de tomate (TR); Reservorio artificial de agua (AWR); Agua de riego desinfectada con luz UV (IWD).

#### 6.4 Prueba de sensibilidad a los antibióticos

Esta prueba permitió identificar la sensibilidad de las cepas a antibióticos. La resistencia observada podría estar vinculada con la presencia de genes asociados a la patogenicidad. En los resultados, la cepa M8R5 presentó resistencia a 10 de los 12 antibióticos evaluados (Figura 12), compartiendo con Ar534 del género *Shinella* una similitud en cuanto a su resistencia a antibióticos como el sulfametoxazol(trimetroprima, netilmicina, carbenicilina, ampicilina, amikacina, cefalotina, cloranfenicol, nitrofurantoína y gentamicina. La diferencia entre estas dos cepas radica en que M8R5 mostro resistencia al norfloxacino y Ar534 a cefotaxima. En general, M8R5 no mostro ser sensible a ninguno de los antibióticos, solo tuvo una sensibilidad intermedia a ciprofloxacino mientras Ar534 si mostro ser sensible a ciprofloxacino. Por otro lado, la cepa M15R5 del género *Agrobacterium* mostro ser resistente únicamente a los antibióticos sulfametoxazol(trimetroprima, cefalotina, cloranfenicol y nitrofurantoína, pero sensible a la carbenicilina, norfloxacino, ciprofloxacina y cefotaxima. La cepa M6A13 del género *Sinorhizobium* también presentó resistencia únicamente a los antibióticos netilmicina, carbenicilina, ampicilina, cefalotina y ciprofloxacina, por el contrario, presentó sensibilidad al sulfametoxazol(trimetroprima, amikacina, gentamicina, norfloxacino y cefotaxima.

La cepa de *A. rhizogenes* K599 que fue utilizada como control positivo en la presente investigación, exhibió resistencia a una menor cantidad de antibióticos comparado con la mayoría de las cepas que fueron aisladas de muestras ambientales. Estos antibióticos fueron: netilmicina, ampicilina, nitrofurantoína y norfloxacino, siendo sensible a sulfametoxazol(trimetroprima, carbenicilina, ciprofloxacina y cefotaxima. Por último, la cepa 1M7A3 del género *Rhizobium* presentó una alta sensibilidad a todos los antibióticos probados a pesar de crecer en los medios selectivos usados para su aislamiento. De manera general, todas las cepas probadas a excepción de 1M7A3, mostraron ser resistentes a la Ampicilina, por otro lado, la mayoría de las cepas exhibieron sensibilidad al norfloxacino,

ciprofloxacino y cefotaxima.



SXT: Sulfametoxazol Trimetroprima; NET: Netilmicina; CB: Carbenicilina; AM: Ampicilina; AK: Amikacina; CF: Cefalotina; CL: Cloranfenicol; NF: Nitrofurantoína; GE: Gentamicina; NOF: Norfloxacino; CPF: Ciprofloxacino; CFX: Cefotaxima. R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible.

**Figura 12.** Mapa de calor de la sensibilidad a antibióticos de las cepas M8R5, M15R5, Ar534, M6A13 y 1M7A3. La cepa de *A. rhizogenes* K599 fue incluida como control positivo (Creado con <https://online.visual-paradigm.com>).

## 6.5 Ensayos de patogenicidad

### 6.5.1 Ensayos de patogenicidad en germinados de frijol negro (*P. vulgaris*)

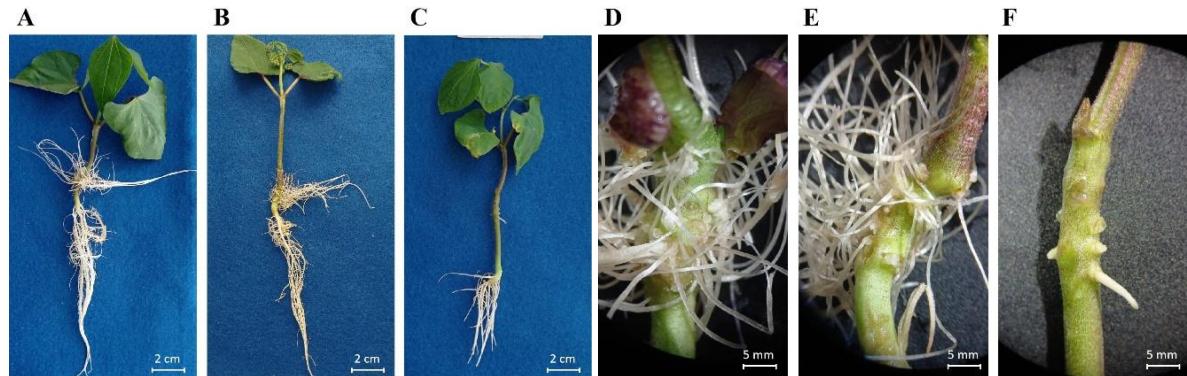
Los ensayos de patogenicidad en germinados de frijol utilizando las cepas M8R5, M15R5, 1M7A3, M6A13, Ar534 y K599 mostraron una variación significativa en la capacidad para inducir la rizogénesis (Tabla 9). La infección con M8R5, indujo el mayor número de raíces adventicias (AR), con un promedio de 37 raíces por plántula, similar a la cepa K599 empleada como control positivo (Figura 13). En contraste, las cepas Ar534, M6A13 y M15R5 presentaron menor capacidad de rizogénesis, con promedios de 10, 8 y 4 raíces por plántula, respectivamente. Mientras que 1M7A3 al igual que el control negativo generaron en promedio solo 2 raíces por plántula.

En cuanto a su longitud (ARL), las plántulas infectadas con 1M7A3, Ar534 y K599 presentaron raíces adventicias de 6.8, 5.70 y 5.69 cm, respectivamente, más largas comparadas con las inducidas por los demás aislados. En contraste, M15R5, M8R5 y M6A13 produjeron las raíces más cortas siendo de 2.71, 2.1 y 1.38 cm, respectivamente. Con respecto a la longitud de la raíz principal (PRL) y la altura de la planta, no se observaron diferencias entre las plantas infectadas.

**Tabla 9.** Efecto de aislados microbianos en la inducción de rizogénesis en plantas de frijol.

Tratamiento	AR	ARL (cm)	PRL (cm)	Altura planta (cm)
K599	37 ± 6.1 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	7.9 ± 1.3 <sup>ab</sup>
M8R5	37 ± 4.1 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.7 <sup>bcd</sup>	11.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.4 ± 1.0 <sup>b</sup>
Ar534	10 ± 3.3 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	9.4 ± 1.4 <sup>a</sup>
M6A13	8 ± 2.4 <sup>bcd</sup>	1.3 ± 0.9 <sup>bcd</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>ab</sup>	8.4 ± 2.0 <sup>ab</sup>
IM7A3	2 ± 1.3 <sup>c</sup>	6.8 ± 0.8 <sup>a</sup>	9.3 ± 1.2 <sup>ab</sup>	7.7 ± 1.2 <sup>ab</sup>
M15R5	4 ± 1.1 <sup>bcd</sup>	2.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	10.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.4 <sup>ab</sup>
CN	2 ± 1.1 <sup>c</sup>	0.7 ± 0.6 <sup>c</sup>	7.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	8.4 ± 1.1 <sup>ab</sup>

Raíces adventicias (AR), Largo de las raíces adventicias (ARL), Largo de las raíces principales (PRL). Los valores representan la media de cinco repeticiones ± desviación estándar. Medias en cada columna con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).



**Figura 13.** Plántulas de frijol 15 días después de la infección. (A) cepa M8R5; (B) cepa K599 (control positivo); (C) control negativo; (D) raíces adventicias en cotiledones infectados con M8R5; (E) raíces adventicias en cotiledones infectados con K599; (F) raíces adventicias en cotiledones del control negativo.

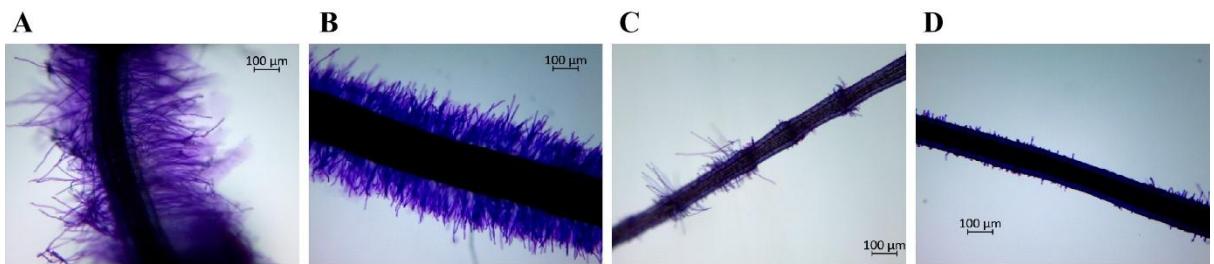
### 6.5.2 Ensayos de patogenicidad en plántulas de tomate (*S. lycopersicum*)

En los ensayos de infección en plántulas de tomate todas las cepas incrementaron al menos uno de los parámetros del desarrollo radicular (Tabla 10). En el número de raíces, Ar534 y M6A13 mostraron la mayor capacidad rizogénica, con un promedio de 10 raíces por plántula, superior a K599, que sólo generó en promedio 2 raíces por plántula. Respecto a la longitud, el control negativo (CN) generó raíces más largas, seguido por Ar534 y M6A13. En contraste, la infección con K599 produjo las raíces más cortas en comparación con los demás tratamientos. La formación de pelos radicales fue registrada por medio de microscopía, calculando la densidad de las raíces mediante áreas de cobertura, encontrando que M8R5 promovió el mayor desarrollo con un área del 57.27 %, superando significativamente a Ar534 y M6A13 (Figura 14), quienes indujeron áreas de raíz amplias, con promedios de 37.95 % y 24.95 %, respectivamente. En contraste, la infección con K599 y CN mostró la menor producción de pelos radicales, indicando que la cepa empleada K599 posee baja capacidad de rizogénesis en tomate, en contraste con lo observado con frijol.

**Tabla 10.** Inducción de rizogénesis en el hipocótilo de plántulas de tomate por aislados microbianos.

Tratamiento	Número de raíces	Largo de raíces (cm)	Área (%)
K599	2 ± 1.3 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.3 <sup>c</sup>	15.7 ± 3.3 <sup>d</sup>
M8R5	5 ± 1.0 <sup>bc</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	57.2 ± 5.1 <sup>a</sup>
Ar534	10 ± 2.9 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b</sup>	37.9 ± 2.5 <sup>b</sup>
M6A13	10 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	24.9 ± 4.9 <sup>c</sup>
1M7A3	6 ± 2.2 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>bc</sup>	18.8 ± 1.9 <sup>cd</sup>
M15R5	7 ± 1.0 <sup>ab</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	22.4 ± 3.9 <sup>cd</sup>
CN	2 ± 0.8 <sup>c</sup>	3.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	16.5 ± 2.1 <sup>d</sup>

Los valores representan la media de cinco repeticiones ± desviación estándar. Medias en cada columna con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, p < 0.05).



**Figura 14.** Evaluación de la inducción de rizogénesis en raíces de tomate 25 días postinfección. Raíces teñidas con toluidina y observadas con el objetivo 40X del microscopio: (A) cepa M8R5; (B) cepa Ar534; (C) cepa K599 (control positivo); (D) control negativo.

## 6.6 Secuenciación de Nueva Generación (SNG)

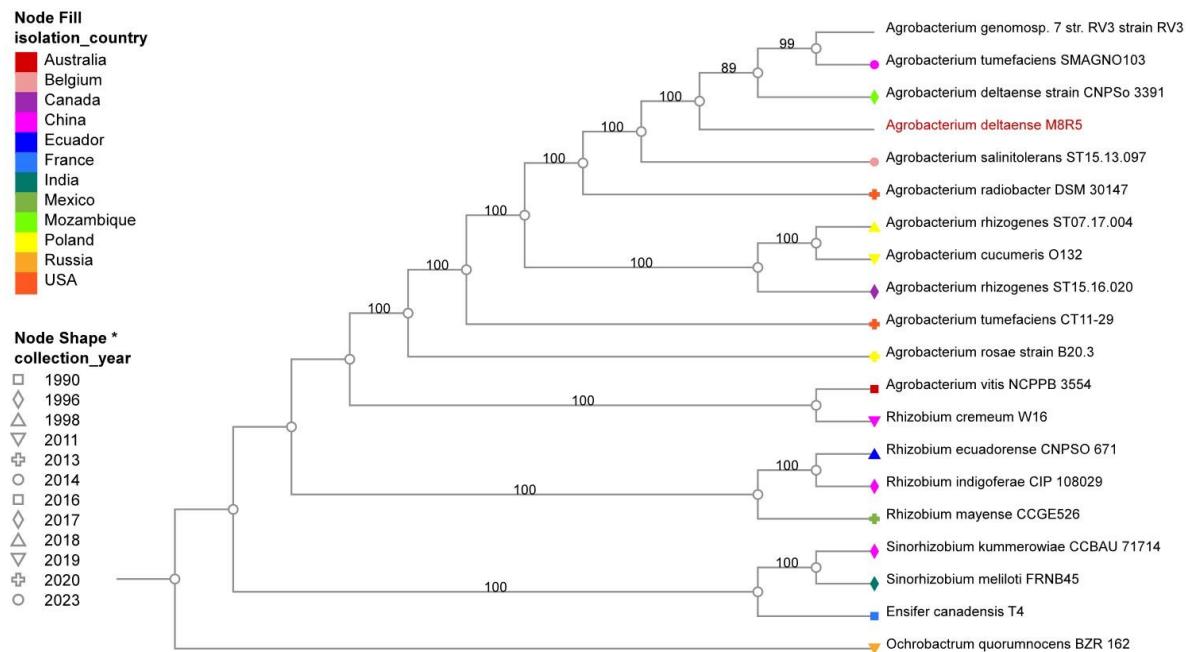
Los ensayos bioquímicos, el análisis de la secuenciación parcial del gen 16S RNAr y las pruebas de patogenicidad mostraron que las cepas M8R5 y Ar534 poseían alta capacidad para inducir rizogénesis, por lo que se recurrió a la secuenciación de su genoma.

### 6.6.1 Análisis del genoma de *Agrobacterium* M8R5

De acuerdo con el cálculo de identidad promedio de nucleótidos (ANIB) realizado mediante BLAST en la plataforma JSpeciesWS, el genoma de la cepa M8R5 presentó un 97.25 % de identidad y un 83.95 % de nucleótidos alineados con la cepa *Agrobacterium deltaense* RV3 (BioSample: SAMEA3722815). Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante el análisis de la base de datos de taxonomía del genoma (GTDB) y en el árbol filogenético generado con la base de datos de BV-BRC (Figura 15).

La Tabla 11 resume las características genómicas de *A. deltaense* M8R5 obtenidas mediante la plataforma BV-BRC. El análisis indica una longitud genómica de 5,605,302 pb, ensamblado en 63 contigs, con un contenido promedio de G + C del 59.55 % y un valor de N50 de 353,631 pb. En el genoma se identificaron 5,563 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 49 genes de ARN de transferencia (tRNA) y 2 genes ribosomales (rRNA). La anotación genómica reveló otras características importantes, entre ellas 1,471 proteínas hipotéticas y 4,089 proteínas con funciones previamente asignadas. Se encontraron también, factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, genes transportadores y genes blancos de fármacos. En análisis también arroja una organización estructurada de los

subsistemas, reflejando su participación en los distintos procesos biológicos y metabólicos esenciales para el patógeno (Figura 16).



**Figura 15.** Árbol filogenético de *Agrobacterium deltaense* M8R5. Generado con ‘Codon Tree’ de BV-BRC, mostrando las relaciones evolutivas con otras cepas de la familia Rhizobiaceae.

En cuanto a los factores de virulencia y patogenicidad, en la Tabla 12 se muestran algunos genes implicados de manera directa o indirecta con diversas funciones, que abarcan desde procesos básicos de mantenimiento celular hasta rutas metabólicas especializadas. Los genes *dnak*, *groEL*, *lon*, *caiB* y *BMEI0066* están implicados en la respuesta a condiciones de estrés, incluyendo el plegamiento y la degradación de proteínas mal conformadas. Estos genes son esenciales para mantener la homeostasis proteica en condiciones desfavorables (Hu y Cronan, 2020; Susin *et al.*, 2006; Genevaux *et al.*, 2004). *ilvC*, *leuA*, *aspC*, *glnA*, *glyA* e *hisF* participan en rutas para la biosíntesis de aminoácidos esenciales como la valina, leucina, isoleucina, aspartato, glutamina, glicina e histidina. Estas vías son fundamentales para la producción de proteínas y el crecimiento celular en condiciones limitantes (Chen *et al.*, 2024; Martínez-Gutián *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2018). Los genes *purM*, *purF*, *pyrB* e *hisF* están involucrados en la síntesis de purinas y pirimidinas, las cuales son necesarias para la replicación y transcripción del ADN. *rpoA* y *rplS* codifican componentes esenciales

de la ARN polimerasa y del ribosoma, respectivamente, indicando actividad transcripcional y traduccional. Por su parte, *hfq* actúa como regulador pos-transcripcional, participando en la estabilidad y traducción de ARNm, además está asociado con mecanismos de virulencia en bacterias (Solopova *et al.*, 2016; Yee *et al.*, 2015; Sobrero y Valverde, 2012). Los genes *galcD*, *glpK*, *gltD*, *ugpA*, *ugpB* y *feuP* están relacionados con el metabolismo de azúcares, glicerol y el transporte de fosfato y hierro, lo cual sugiere una adaptación a la disponibilidad de nutrientes en el entorno. *acpXL* y *kdsA* codifican enzimas involucradas en la síntesis de componentes del lipopolisacárido (LPS) y ácidos grasos de la membrana externa, lo cual es importante para la integridad estructural y la resistencia de la célula bacteriana frente a antimicrobianos y las defensas de las plantas. *divK* codifica una proteína reguladora implicada en la división celular y procesos de señalización intracelular, asociados a motilidad, adhesión y diferenciación bacteriana (Sperling *et al.*, 2019; Safí *et al.*, 2019; Bourassa *et al.*, 2017)

**Tabla 11.** Caracterización genómica de *A. deltaense* M8R5 mediante BV-BRC.

Características	Total	Fuente
Tamaño del genoma	5,605,302 pb	PATRIC
Número de contigs	63	PATRIC
Número de proteínas caracterizadas	5,563	PATRIC
Número de proteínas hipotéticas	1,474	PATRIC
Número de genes ARNr	2	PATRIC
Número de genes ARNt	49	PATRIC
Número de proteínas con anotación de vía	892	KEGG
G + C %	59.55 %	PATRIC
N50 tamaño de contig (pb)	353,631 pb	PATRIC
Factores de virulencia	28	Victors
Factores de virulencia	3	VFDB
Factores de virulencia	2	PATRIC_VF
Genes de resistencia a antibióticos	42	PATRIC
Genes de resistencia a antibióticos	1	CARD
Genes de resistencia a antibióticos	1	NDARO
Genes transportadores	47	TCDB
Genes diana de fármacos	4	DrugBank

El análisis del genoma de *Agrobacterium deltaense* M8R5 identificó la existencia de tres plásmidos, evidenciados por la presencia de tres grupos distintos de genes *repA*-*repC*

localizados en diferentes contigs, con tamaños que oscilan entre los ~200 kb y ~500 kb. El plásmido designado como pRiM8R5 localizado en el contig 10 según el análisis de replicones, posee un tamaño de 226,275 pb (Figura 17) con un contenido promedio de G+C del 57 %. Este tamaño se encuentra dentro del rango de los plásmidos grandes reportados en las especies del género *Agrobacterium* (Hooykaas, 2023; Hooykaas y Hooykaas, 2021). Además, su porcentaje de G+C fue similar al reportado por Moriguchi *et al.* para plásmidos Ti y Ri (Moriguchi *et al.*, 2001).

El plásmido pRiM8R5 contiene un total de 214 secuencias codificantes de ADN (CDS), de las cuales se identificó la función de 118, clasificándolas en 8 grupos (Tabla 13). En el primer grupo se encuentran los genes *repA*-*repC*, que codifican para las proteínas involucradas en la iniciación y regulación de la replicación del plásmido. En un segundo grupo se identificaron los genes *trbB*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *J*, *L* y *traB*, *C*, *D*, *F*, *H*, *M*, *R*, relacionados con el sistema de transferencia de plásmidos por conjugación, *trb* y *tra*, se localizaron adyacentes a los genes de replicación *rep*. Un arreglo que ha sido reportado previamente en plásmidos Ri de *Agrobacterium* y plásmidos Sym de *Rhizobium*. En contraste, en los plásmidos Ti, la región *trb* suele estar separada de las regiones *tra* y *rep* (Moriguchi *et al.*, 2001).

En el tercer grupo fueron identificados los genes *virA*, *virB1-B6*, *virB8-B11*, *virC1*, *virC2*, *virD1*, *virD2*, *virD4*, *virD5*, *virG* y *virF* del sistema de virulencia que son responsables de la transferencia del T-DNA a la célula vegetal y que han sido reportados en plásmidos Ti y Ri (Hooykaas, 2023; Hooykaas & Hooykaas, 2021; Moriguchi *et al.*, 2001). Cabe mencionar que también se encontró el gen *tzs*, responsable de la síntesis de citocininas, cuya producción microbiana en las plantas huésped induce el desarrollo anormal celular, facilitando la infección y la transferencia del T-ADN (Ye *et al.*, 2016). En un cuarto grupo se identificaron los genes *rolA*, *rolB* y *rolC*, que forman parte del ADN-T de los plásmidos Ri, que una vez integrados a la planta, aumentan la sensibilidad a las auxinas lo cual conduce a una proliferación anormal de raíces del fenotipo “crazy root” (Mauro y Bettini, 2021).

En el quinto grupo se identificaron los genes *oocR*, *occQ*, *occM*, *occP*, *occT*, *ocd*, *arcA* y *noc* relacionados con el transporte y catabolismo de octopina y nopalina, dos tipos de opinas que son producidas por las células vegetales una vez transformadas con el T-ADN las cuales sirven como fuente de C y N para las cepas *Agrobacterium*. Estos genes frecuentemente se han encontrado en los plásmidos Ti, sin embargo, algunos de estos genes quiméricos se han identificado en los plásmidos Ri (Moriguchi *et al.*, 2001, Vladimirov *et al.*, 2015).

En un sexto grupo se encuentran las enzimas transposasas IS66, IS6110, IS3 y IS5, las cuales participan en la reorganización del material genético dentro del plásmido generando variabilidad. En el séptimo grupo, se encuentran genes como *purR*, *yraA*, *nagR*, *edd*, *bioF*, *rdpA*, *ghrB*, *odh*, *addA*, *recB*, *mmuM* y *dnaK*, de los cuales no existen reportes de su presencia en plásmidos Ri o Ti. Sin embargo, estos genes relacionados con el metabolismo y el mantenimiento celular suelen localizarse en el cromosoma, por lo que su presencia en un plásmido de gran tamaño sugiere que este podría actuar de forma parcialmente autónoma, confiriéndole una mayor capacidad de adaptación a condiciones adversas y permitiéndole regular aspectos clave de su propio metabolismo (Li *et al.*, 2025; Valizadeh *et al.*, 2017; Badrinarayanan *et al.*, 2017).

En un último grupo se encontraron 96 proteínas hipotéticas sin homología con las bases de datos, las cuales corresponden al 45 % de las proteínas del plásmido. Al comparar el plásmido pRiM8R5 con otros plásmidos disponibles en la base de datos del NCBI, se observó la mayor similitud (92.45 %) y cobertura (38 %) con el plásmido pRiO132 (BioSample: SAMN20398584) de *Agrobacterium cucumeris*, la cual fue aislada de plantas de pepino con síntomas de la enfermedad “raíces pilosas” en Polonia en 2023 (Warabieda *et al.*, 2023). En otro análisis, el plásmido pRiM8R5 mostró una menor similitud (81.5 %) y cobertura (24 %) con el plásmido pRiNCPPB1855 (BioSample: SAMN12779969) de *Rhizobium rhizogenes*. Este plásmido fue reportado por Hooykaas y Hooykaas como un nuevo plásmido Ri de tipo agropina (Hooykaas y Hooykaas, 2021).

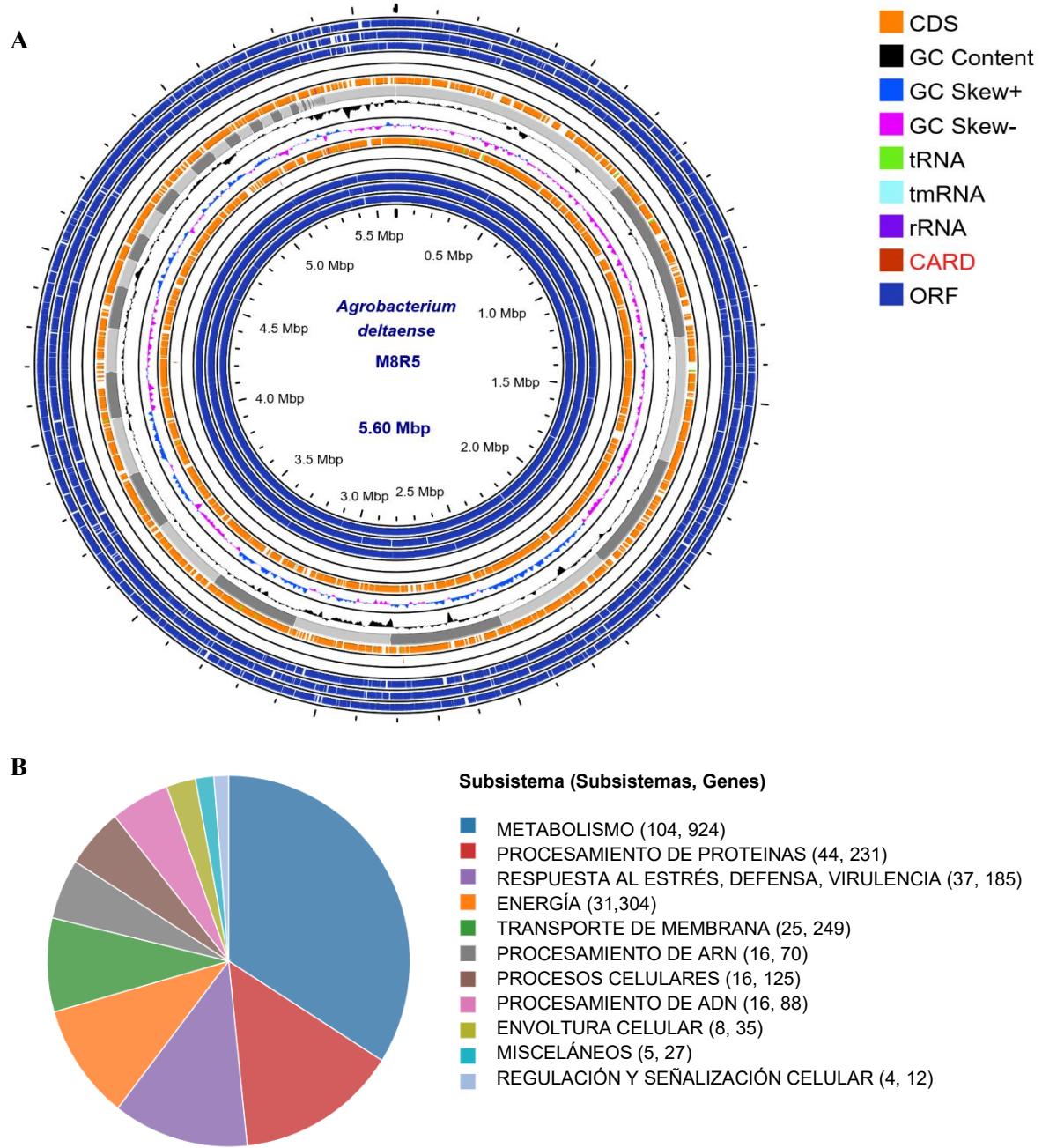
Estos resultados indican que aproximadamente el 38 % del plásmido presenta alta similitud

con un plásmido Ri previamente caracterizado. Sin embargo, el 45 % de sus genes codifican funciones aún no caracterizadas, mientras que el 17 % restante muestra homología con genes presentes en otros tipos de plásmidos o en regiones cromosómicas.

**Tabla 12.** Posibles genes de virulencia en *A. deltaense* M8R5 identificados con BV-BRC.

Gen	Producto	Mecanismo de acción
<i>dnak</i>	Proteína chaperona dnak.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>ilvC</i>	Reductoisomerasa cetolácida.	Biosíntesis de aminoácidos
<i>rpoA</i>	Subunidad alfa de la ARN polimerasa dirigida por ADN.	Transcripción
<i>groEL</i>	Chaperona groEL de la familia de proteínas de choque térmico de 60 kDa.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>gltD</i>	Cadena pequeña del glutamato sintasa [NADPH].	Mecanismo y síntesis de aminoácidos
<i>lon</i>	Proteasa dependiente de ATP.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>glyA</i>	Serina hidroximetiltransferasa.	Biosíntesis de nucleótidos
<i>purM</i>	Cicloligasa de fosforribosilformilglicinamidina.	Biosíntesis de nucleótidos
<i>cajB</i>	GTP 3',8-ciclasa.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>purF</i>	Amidofosforribosiltransferasa.	Biosíntesis de nucleótidos
<i>rplS</i>	Proteína ribosomal L19p.	Traducción
<b><i>BMEI0066</i></b>	Regulador de respuesta transcripcional de dos componentes, familia luxR.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>Hfq</i>	Proteína de unión al ARN hfq.	Factor de virulencia
<i>ugpB</i>	Transportador ABC de glicerol-3-fosfato, proteína de unión al sustrato ugpB.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>divK</i>	Regulador de respuesta de diferenciación polar divK.	Motilidad, adhesión
<i>acpXL</i>	Proteína transportadora de acilo.	Adaptación en condiciones de estrés
<i>galcD</i>	Altronato deshidratasa.	Catabolismo de fuentes alternativas de carbono

<i>hisF</i>	Subunidad ciclase de la sintasa de fosfato de glicerol de imidazol.	Biosíntesis de nucleótidos
<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintasa.	Biosíntesis de leucina (aminoácidos)
<i>aspC</i>	Aspartato aminotransferasa.	Biosíntesis de aspartato y derivados
<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa tipo 1.	Asimilación de amonio
<i>kdsA</i>	2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosonato-8-fosfato sintasa.	Formación de la membrana celular
<i>glpK</i>	Aspartato carbamoiltransferasa.	Metabolismo del glicerol
<i>pyrB</i>	Aspartato carbamoiltransferasa.	Síntesis de pirimidinas
<i>acpXL</i>	Proteína transportadora de acilo.	Resistencia de la membrana celular
<i>ugpA</i>	Transportador ABC de glicerol-3-fosfato, proteína permeasa <i>ugpA</i> .	Transporte de glicerol-3-fosfato
<i>feuP</i>	Proteína reguladora de la transcripción <i>phoP</i> .	Transporte de Fe <sup>3+</sup> a sideróforos

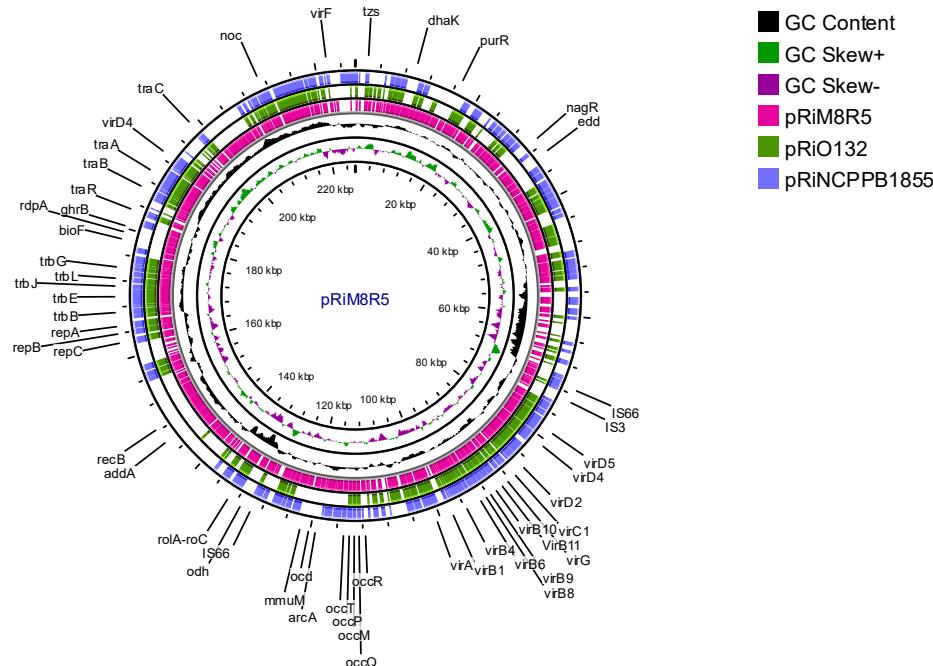


**Figura 16.** Genoma circular de *A. deltaense* M8R5 con la distribución de subsistemas funcionales. (A) Representación circular del genoma de *A. deltaense* M8R5. Esta incluye, de anillos externos a internos, los CDS en la cadena directa, los CDS en la cadena inversa, los genes de ARN, el CDS con similitud con genes conocidos de resistencia a antibióticos, el CDS con similitud con factores de virulencia, los contigs ensamblados, el contenido de GC y la desviación de GC; (B) distribución de los subsistemas funcionales de *A. deltaense*

M8R5.

**Tabla 13.** Clasificación de genes presentes en el plásmido pRiM8R5.

Clasificación	No. de genes	Nombre del gen
Replicación plasmídica	3	<i>repA, B, C</i>
Conjugación	16	( <i>trbB, C, D, E, F, G, H, J, L</i> ), ( <i>traB, C, D, F, H, M, R</i> )
Virulencia	20	<i>tzs, virA, virB1–B6, virB8–B11, virC1, virC2, virD1, virD2, virD4(2), virD5, virG</i>
Genes del ADN-T	3	<i>rolA, rolB, rolC</i>
Transporte y metabolismo de opinas	8	<i>oocR, occQ, occM, occP, occT, ocd, arcA, noc</i>
Modificación de plásmidos	6	Transposasas: IS66, IS6110, IS3, IS5
Genes sin homología con plásmidos Ri o Ti	13	<i>purR, yraA, nagR, edd, bioF, rdpA, ghrB, odh, addA, recB, mmuM, dnaK</i>
Proteínas hipotéticas sin homología en ninguna base de datos	96	
Total	214	



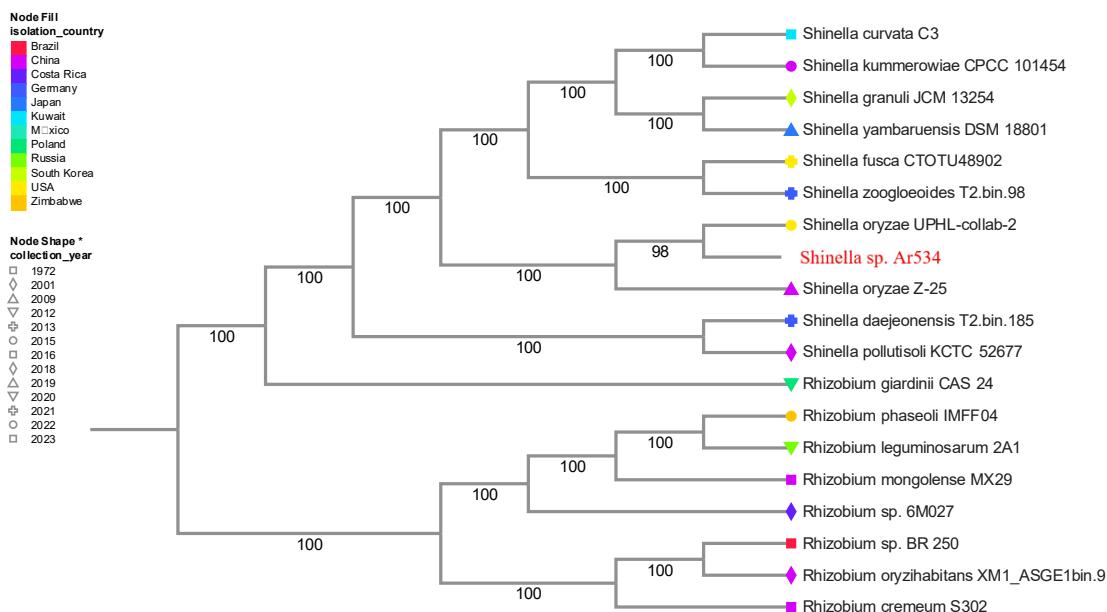
**Figura 17.** Comparación genómica del plásmido pRiM8R5 con pRiO132 y pRiNCPPB1855. Genes del plásmido pRiM8R5 de *A. deltaense* M8R5 mostrados en color

rosa, comparados con pRiO132 (Biosample: SAMN20398584) de color verde y pRiNCPPB1855 (Biosample: SAMN12779969) de color azul. El ensamblaje se realizó utilizando la plataforma Proksee, empleando la base de datos de Prokka y herramientas complementarias de la plataforma BV-BRC.

### 6.6.2 Análisis del genoma de *Shinella* sp. Ar534

De acuerdo con el cálculo de identidad promedio de nucleótidos (ANIb) realizado mediante BLAST en la plataforma JSpeciesWS, el genoma de la cepa Ar534 presentó un 96.48 % de identidad y un 85.60 % de nucleótidos alineados con la cepa *Shinella oryzae* Z-25 (BioSample: SAMN20929830). Estos resultados son consistentes con los obtenidos mediante el análisis de la base de datos de taxonomía del genoma (GTDB) y en el árbol filogenético generado con la base de datos de BV-BRC (Figura 18).

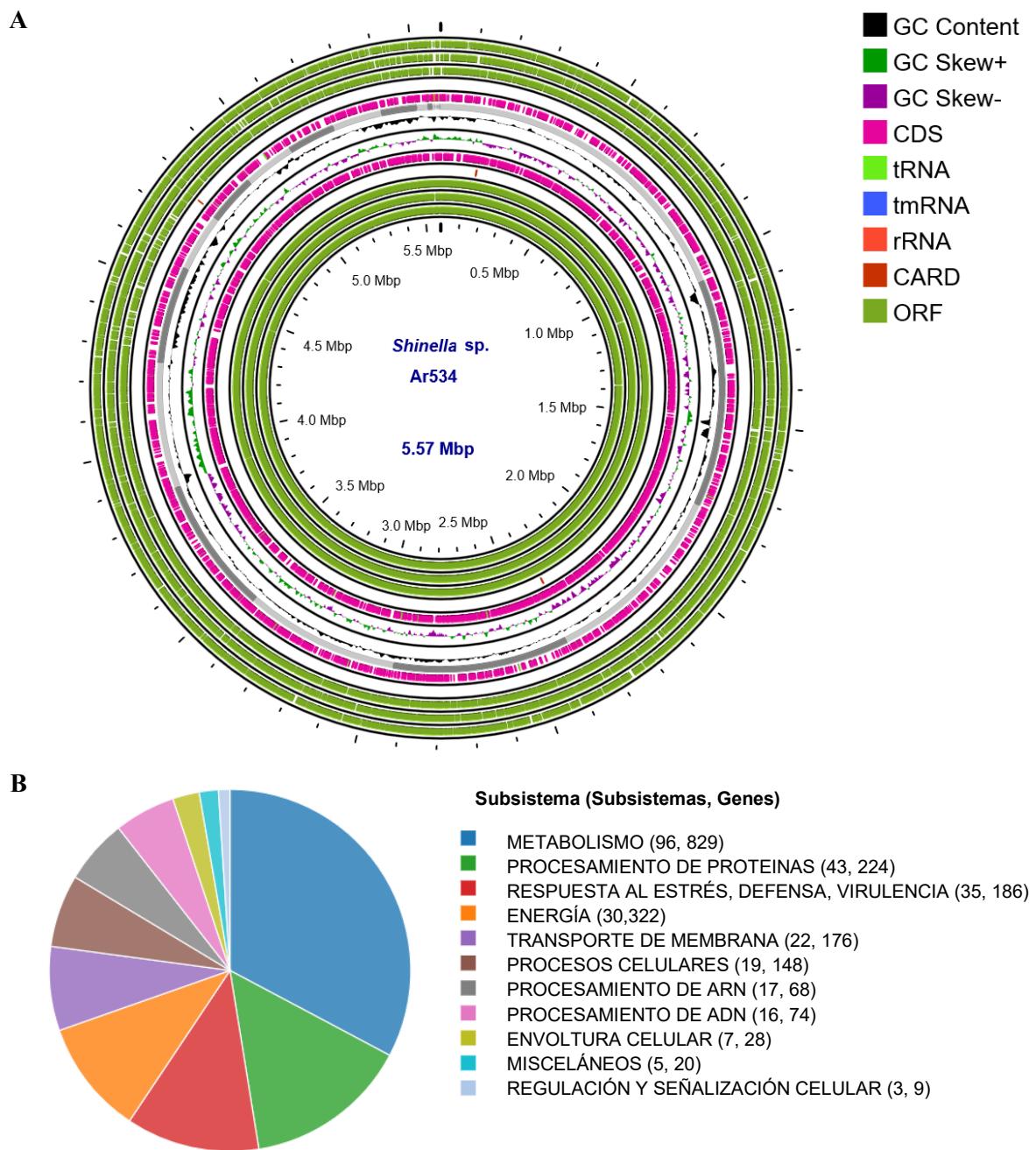
La Tabla 14 resume las características genómicas de *Sinella* sp. Ar534 obtenidas mediante la plataforma BV-BRC. El análisis indica una longitud de 5,578,927 pb, ensamblado en 35 contigs, con un contenido promedio de G + C del 63.25 % y un valor de N50 de 564,843 pb. En el genoma se identificaron 5,435 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 47 genes de ARN de transferencia (tRNA) y 3 genes ribosomales (rRNA). La anotación genómica reveló otras características importantes, entre ellas 1,514 proteínas hipotéticas y 3,921 proteínas con funciones previamente asignadas. Se encontraron también, factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, genes transportadores y genes blancos de fármacos. El análisis también arroja una organización estructurada de los subsistemas, reflejando su participación en los distintos procesos biológicos y metabólicos esenciales para el patógeno (Figura 19).



**Figura 18.** Árbol filogenético de *Shinella* sp. Ar534. Generado con ‘Codon Tree’ de BV-BRC, mostrando las relaciones evolutivas con otras cepas de la familia Rhizobiaceae.

En cuanto a los factores de virulencia y patogenicidad, en la Tabla 15 se muestran algunos genes implicados de manera directa o indirecta con diversas funciones, que abarcan desde procesos básicos de mantenimiento celular hasta rutas metabólicas especializadas. Se identificaron 34 genes potencialmente asociados con la virulencia de *Shinella* sp. Ar534. De estos, los genes *kdsA*, *pyrB*, *glyA*, *aroC*, *aspC*, *leuA*, *leuC*, *hisF*, *divK*, *ilvC*, *dnaK*, *rpoA*, *purM*, *purF*, *acpXL*, *BMEI0066*, *ugpA*, *feuP*, *groEL*, *caiB*, *glnA* y *hfq* también se encontraron en *A. deltaense* M8R5, mientras que los 12 genes restantes fueron exclusivos de Ar534. La clasificación de estos genes de acuerdo con su mecanismo de acción se presenta en la Tabla 6. Una parte de ellos se relaciona con el metabolismo de nucleótidos, como es el caso de *purL*, *purN* y *purE*, involucrados en la de biosíntesis de purinas, y de *nrdH*, que participa como proteína reductora en la activación de las ribonucleótido reductasas, necesarias para la síntesis de desoxirribonucleótidos. Este grupo de genes resulta esencial para sostener la replicación y el crecimiento bacteriano en ambientes limitados en nutrientes. Otro conjunto vinculado al metabolismo de aminoácidos, está representado por *ilvD*, que participa en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada, y

*metH*, responsable de la síntesis de metionina a partir de homocisteína mediante una reacción dependiente de cobalamina. Estas funciones permiten a la bacteria sintetizar estos aminoácidos de manera endógena, lo que favorece su supervivencia y proliferación dentro de un ambiente hostil. Asimismo, existen genes que cumplen un papel en la regulación y señalización, como *exsA*, que actúa como regulador transcripcional de sistemas de secreción tipo III, *glnL* codifica un sensor histidina-quinasa, componente de un sistema de señalización cuya función es percibir la disponibilidad de nitrógeno en el entorno y modular la expresión de genes asociados al metabolismo nitrogenado. El gen *BMEII0923*, está implicado en el transporte de solutos y la adaptación a ambientes intracelulares. De manera particular, *tufA* codifica el factor de elongación Tu, esencial para la traducción proteica, pero también con una función adicional como proteína de superficie con capacidad de adhesión a componentes del hospedero, lo que lo convierte en un ejemplo de proteína multifuncional. Por otro lado, *eryB* y *eryC* están asociados con la síntesis de desoxiazúcares, los cuales en otras bacterias forman parte de metabolitos secundarios como la eritromicina. En conjunto, la agrupación de estos genes muestra cómo procesos metabólicos esenciales, reguladores de secreción, proteínas multifuncionales y enzimas de biosíntesis secundaria pueden ser aprovechados como determinantes de virulencia indirecta, favoreciendo la supervivencia y persistencia bacteriana en condiciones adversas.



**Figura 19.** Genoma circular de *Shinella* sp. Ar534 con la distribución de subsistemas funcionales. (A) Representación circular del genoma de *Shinella* sp. Ar534. Esta incluye, de anillos externos a internos, los CDS en la cadena directa, los CDS en la cadena inversa, los genes de ARN, el CDS con similitud con genes conocidos de resistencia a antibióticos, el CDS con similitud con factores de virulencia, los contigs ensamblados, el contenido de GC y la desviación de GC; (B) distribución de los subsistemas funcionales de *Shinella* sp.

Ar534.

**Tabla 14.** Caracterización genómica de *Shinella* sp. Ar534 mediante BV-BRC.

Características	Total	Fuente
Tamaño del genoma	5,578,927 pb	PATRIC
Número de contigs	35	PATRIC
Número de proteínas caracterizadas	5435	PATRIC
Número de proteínas hipotéticas	1514	PATRIC
Número de genes ARNr	3	PATRIC
Número de genes ARNt	47	PATRIC
Número de proteínas con anotación de vía	900	KEGG
G + C %	63.25 %	PATRIC
N50 tamaño de contig (pb)	564,843 pb	PATRIC
Factores de virulencia	33	Victors
Factores de virulencia	3	VFDB
Factores de virulencia	1	PATRIC_VF
Genes de resistencia a antibióticos	41	PATRIC
Genes de resistencia a antibióticos	1	CARD
Genes de resistencia a antibióticos	2	NDARO
Genes transportadores	33	TCDB
Genes diana de fármacos	5	DrugBank

El análisis genómico de *Shinella* sp. Ar534 reveló la presencia de un plásmido, evidenciado por la detección del conjunto de genes de replicación *repA–repC*. Este plásmido, designado como pAr534 y localizado en el contig 14 según el análisis de replicones, presenta un tamaño de 117,427 pb y un contenido promedio de G+C del 59 %. Dichas características lo ubican dentro del rango de los plásmidos grandes y de baja copia, típicamente conjugativos (Hall *et al.*, 2022).

La comparación de pAr534 con la base de datos del NCBI mostró un 98.88 % de identidad y 99 % de cobertura con un plásmido de *Shinella oryzae* UPHL-collab-2, así como un 98.85 % de identidad y 69 % de cobertura con el plásmido pZ25 de *Shinella oryzae* Z25 (Figura 20). Estos resultados sugieren que el plásmido identificado en *Shinella* sp. Ar534 probablemente corresponde a un replicón característico del género, dado que los plásmidos con mayor similitud tampoco presentan genes *rol*, típicos de los plásmidos inductores de raíces (pRi) de *Agrobacterium*.

El plásmido pAr534 contiene 118 secuencias codificantes (CDS), de las cuales fue posible asignar función a 59, mismas que se agruparon en nueve categorías funcionales (Tabla 16). Dentro del grupo denominado “replicación y mantenimiento plasmídico” se localizaron los genes *repA*, *repB*, *repC* y *dinG*; los tres primeros codifican proteínas esenciales para la iniciación y el control de la replicación plasmídica (Pinto *et al.*, 2012), mientras que *dinG* participa en procesos de reparación del ADN (Voloshin *et al.*, 2003).

En el grupo de “reguladores transcripcionales” se identificaron diversos genes asociados a la regulación de rutas metabólicas y de respuesta celular. Por ejemplo, *rhaS* participa en la activación de operones relacionados con el catabolismo y transporte de L-ramnosa (Bhende y Egan, 2000), mientras que *nanR* y *hcaR* funcionan como represores de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos siálicos (Horne *et al.*, 2021) y de la ruta catabólica de ácidos fenilpropanoicos (Parke y Ornston, 2023), respectivamente. Otros reguladores destacados fueron *gcvA*, considerado el elemento central en la degradación de glicina (Urbanowski *et al.*, 2000), y *kstR2*, que controla la expresión de genes implicados en la catabolización de esteroides como el colesterol (Casabon *et al.*, 2013). Asimismo, *pgrR* regula la captación y degradación del peptidoglucano (Choi *et al.*, 2016), en tanto que *rpaR* actúa como activador transcripcional dependiente de la señal de “*quorum sensing*” pC-HSL (Hirakawa *et al.*, 2011). También se detectó la presencia de *isrB*, un sRNA regulatorio probablemente implicado en la modulación de genes de virulencia o estrés (Padalon *et al.*, 2008), además de *dmlR*, un regulador tipo LysR que activa la expresión de *dmlA*, y *nimR*, cuya función se asocia a la respuesta al níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (Kidd *et al.*, 2011; Lukas *et al.*, 2010).

Dentro del grupo de “resistencia y bombas de eflujo” se identificaron los genes *emrA*, *emrB* y *abaF*. Los dos primeros conforman un sistema de eflujo de multidroga responsable de la expulsión de diversos compuestos tóxicos fuera de la célula (Lomovskaya y Lewis, 1992). Asimismo, se identificó el gen *abaF*, el cual codifica una bomba de eflujo de la familia MFS recientemente caracterizada en *Acinetobacter baumannii*. Este gen se ha asociado con la resistencia a fosfomicina, así como con la formación de biopelículas y la virulencia (Sharma *et al.*, 2016).

Dentro del grupo de genes relacionados con la motilidad, se identificó el gen *fliY*, el cual codifica una proteína de comutación del motor flagelar. En *Leptospira interrogans*, este gen participa en la formación del anillo C del motor flagelar, estructura encargada de controlar la dirección de rotación de los flagelos (Liao *et al.*, 2009).

Por otro lado, en el grupo de “señalización e interacción planta-microorganismo” se localizó el gen *IaaA*, el cual desempeña un papel esencial en la ruta anaerobia de degradación del ácido indol-3-acético. Esta vía metabólica permite a la bacteria aprovechar dicho compuesto como fuente de energía y carbono en condiciones de ausencia de oxígeno (Laird *et al.*, 2020).

En el grupo denominado “transporte y captación de nutrientes” se identificaron los genes *rbsA*, *rbsC*, *btuD*, *gsiA*, *ddpA*, *ddpC*, *zinT* y *ald*. El gen *rbsC* codifica un componente hidrofóbico integral de membrana del sistema de transporte de ribosa, el cual forma parte del complejo de transporte junto con *rbsA* y la proteína periplásmica *rbsB* (Borroga *et al.*, 1996). El gen *btuD* corresponde a la subunidad dependiente de ATP del transportador de vitamina B<sub>12</sub> localizado en la membrana interna (de Veaux *et al.*, 1986). En cuanto al gen *gsiA*, se ha descrito como inducible bajo condiciones de estrés nutricional, particularmente en la limitación de glucosa, aunque también responde a deficiencias de fosfato o nitrógeno (Mueller *et al.*, 1992).

Los genes *ddpA* y *ddpC* forman parte de un sistema de transporte de dipéptidos; cabe destacar que *ddpA* fue identificado en *Dickeya solani* como esencial para la supervivencia y colonización en raíces de *Solanum tuberosum* (papa) (Robic *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2022). Por su parte, el gen *zinT* codifica una proteína periplásmica unidora de zinc que actúa como un factor auxiliar en la adquisición de este metal bajo condiciones de deficiencia severa (Bhubhanil *et al.*, 2014). De manera adicional, el gen *ald* participa tanto en el catabolismo como en el anabolismo de L-alanina, además de desempeñar un papel en la adaptación a la hipoxia y en la conversión de glioxilato en glicina (Jeong *et al.*, 2013).

En el último grupo, denominado “metabolismo y enzimas catabólicas”, se identificaron los genes *gdh*, *fabG*, *acs*, *alsC*, *fucA*, *phaA*, *phaJ* y *gst*. El gen *gdh* codifica la enzima glucosa

deshidrogenasa, la cual cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico, contribuyendo a la solubilización de fosfatos en el suelo y, en consecuencia, mejorando la disponibilidad de fósforo para las plantas y favoreciendo su crecimiento (Naveed *et al.*, 2014). El gen *fabG* corresponde a la 3-cetoacil-ACP reductasa, enzima que participa en la biosíntesis de ácidos grasos al catalizar el primer paso de reducción en cada ciclo de elongación de la cadena (Podkowyrov y Larson., 1996).

Por su parte, el gen *acs* codifica la enzima acetil-CoA sintetasa (ACS), responsable de activar el acetato a acetil-CoA en una reacción irreversible dependiente de ATP, lo que permite a la bacteria asimilar acetato en bajas concentraciones como fuente de carbono y energía (Gimenez *et al.*, 2003). El gen *alsC* codifica el componente transmembrana del transportador de D-allosa, necesario para la internalización de este azúcar en la célula (Kim *et al.*, 1997). Asimismo, el gen *fucA* codifica la enzima L-fuculosa-1-fosfato aldolasa, que cataliza la escisión de la L-fuculosa-1-fosfato en dos metabolitos fundamentales para su incorporación al metabolismo central (Zhang *et al.*, 2024).

En cuanto a los genes *phaA* y *phaJ*, ambos son determinantes para la versatilidad metabólica bacteriana, ya que permiten la producción de polihidroxialcanoatos (PHA), polímeros con propiedades de bioplásticos, a partir de diversas fuentes de carbono. El gen *phaA* participa en el inicio de la síntesis (Kalia *et al.*, 2007), mientras que *phaJ* redirige los intermediarios derivados de la degradación de ácidos grasos hacia la producción del biopolímero (Fiedler *et al.*, 2002). Finalmente, el gen *gst* codifica la enzima glutatión S-transferasa, la cual resulta esencial para la supervivencia en ambientes hostiles al facilitar la detoxificación de una amplia gama de compuestos dañinos y conferir resistencia frente a antibióticos (Allocati *et al.*, 2009).

Adicionalmente, en el genoma de *Shinella* sp. Ar534 se identificaron diversos genes de interés como los genes *vir*, *nod*, transposasas y otros implicados en el metabolismo de opinas, sin embargo, ninguno de estos genes se hallaba en el mismo contig que los genes de replicación plasmídica *repA*, *repB* y *repC*. Cabe destacar que, en plásmidos del género *Agrobacterium*, los genes *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*) son característicos de los plásmidos

inductores de raíces (pRi) y juegan un papel central en la inducción del fenotipo “raíces pilosas” al modular la fisiología hormonal de la planta huésped. En el caso de *Shinella* sp. Ar534, no se detectaron genes *rol* en el conjunto de secuencias analizadas, lo que sugiere que, aun cuando existan genes *nod* o *vir*, este organismo no posee el aparato genético completo típico de los plásmidos pRi (Biswas *et al.*, 2023).

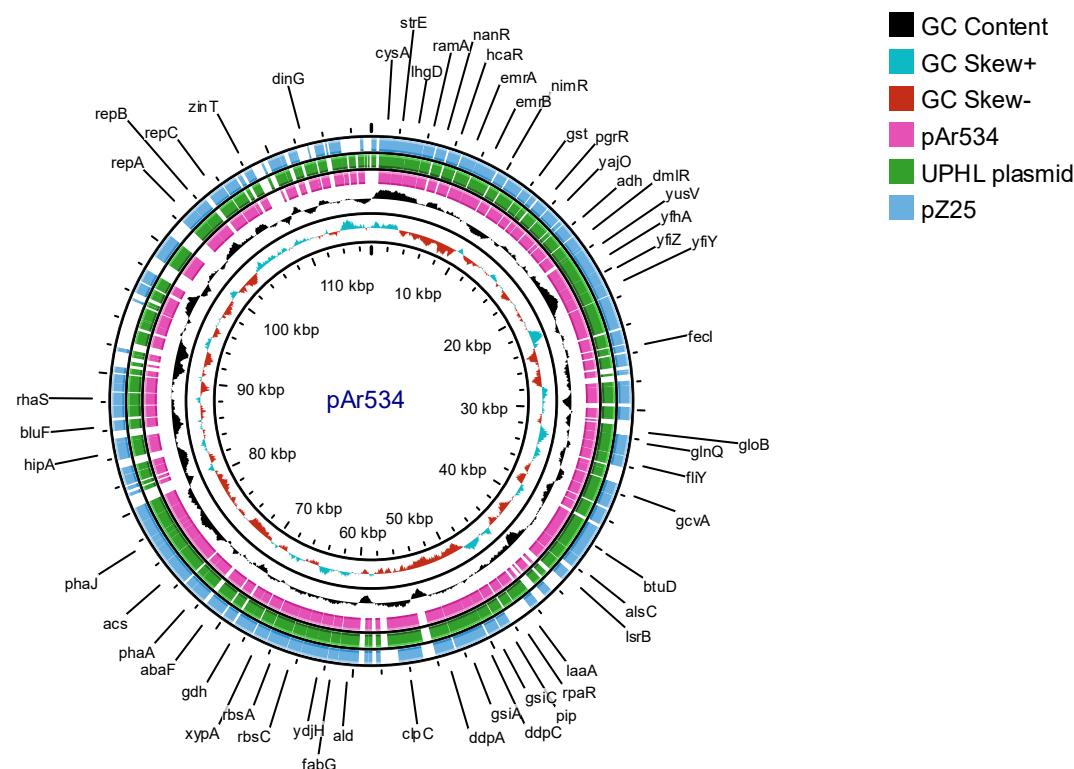
Por otra parte, la presencia de genes de nodulación (*nod*) podría respaldar la hipótesis de que *Shinella* sp. Ar534 actúe como promotora del crecimiento vegetal, al facilitar la formación de nódulos o simbiosis con leguminosas, similar a otros microorganismos benéficos (Alves *et al.*, 2014).

**Tabla 15.** Posibles genes de virulencia en *Shinella* sp. Ar534 identificados con BV-BRC.

Gen	Producto	Mecanismo de acción
<i>BMEII0923</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de importación de espermidina/putrescina <i>potD</i>	Regulación de sistemas de transporte
<i>ExsA</i>	Transportador ABC de eflujo, permeasa/proteína de unión a ATP <i>mlr7818</i>	Regulación de sistemas de secreción
<i>Purl</i>	Subunidad sintetasa de la fosforribosilformilglicinamidina sintasa	Síntesis de nucleótidos
<i>PurN</i>	Fosforribosilglicinamida formiltransferasa	Síntesis de nucleótidos
<i>PurE</i>	N5-carboxiaminoimidazol ribonucleótido mutasa	Síntesis de nucleótidos
<i>EryB</i>	D-eritritol 1-fosfato deshidrogenasa	Biosíntesis de antibióticos
<i>EryC</i>	D-eritrulosa 1-fosfato 3-epimerasa	Biosíntesis de antibióticos
<i>IlvD</i>	Dihidroxiácido deshidratasa	Síntesis de aminoácidos
<i>Tufa</i>	Factor de elongación de translación Tu	Traducción y adhesión
<i>nrdH</i>	Proteína similar a glutaredoxina <i>nrdH</i> , necesaria para la reducción de la ribonucleótido reductasa de clase Ib	Síntesis de nucleótidos
<i>GlnL</i>	Proteína reguladora de nitrógeno similar a PTS IIA, <i>ptsN</i>	Regulación de sistemas de señalización
<i>MetH</i>	5-metiltetrahidrofolato--homocisteína metiltransferasa	Síntesis de aminoácidos

**Tabla 16.** Clasificación de genes presentes en pAr534.

Clasificación	No. de genes	Nombre del gen
Replicación y mantenimiento plasmídico	4	( <i>repA, B, C</i> ), <i>dinG</i>
Reguladores transcripcionales	10	<i>rhaS, nanR, hcaR, gcvA, kstR2, pgrR, rpaR, isrB, dmlR, nimR</i>
Resistencia y bombas de eflujo	3	<i>emrA, emrB, abaF</i>
Motilidad	1	<i>fliY</i>
Señalización e interacción planta-microbio	1	<i>IaaA</i>
Transporte y captación de nutrientes	8	<i>rbsA, rbsC, btuD, gsiA, ddpA, ddpC, zinT, ald</i>
Metabolismo y enzimas catabólicas	8	<i>gdh, fabG, acs, alsC, fucA, phaA, phaJ, gst</i>
Proteínas hipotéticas sin homología en ninguna base de datos	59	
Total	118	



**Figura 20.** Comparación genómica del plásmido pAr534 con UPHL-collab-2 plasmid y pZ25. Genes del plásmido pAr534 de *Shinella* sp. Ar534 mostrados en color rosa, comparados con “UPHL-collab-2 plasmid” (Biosample: SAMN36790893) de color verde y pZ25 (Biosample: SAMN20929830) de color azul. El ensamblaje se realizó utilizando la plataforma Proksee, empleando la base de datos de Prokka y herramientas complementarias de la plataforma BV-BRC.

## 6.7 Ensayos de biocontrol *in vitro*

*Shinella* sp. Ar534, tiene la capacidad para inducir rizogénesis pero carece de los genes de virulencia (genes *rol*), a diferencia de *Agrobacterium deltaense* M8R5, donde si fueron localizados en el plásmido pRiM8R5. Por lo que la cepa M8R5 fue seleccionada para los ensayos de antagonismo *in vitro*, empleando cepas *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* Q35 como agentes de biocontrol.

Primero, se evaluó el efecto de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* Q35 sobre el crecimiento de *Agrobacterium deltaense* M8R5 a los 2, 7 y 14 días de incubación a 25, 30 y 35 °C. Un incremento en el crecimiento de las bacterias de biocontrol se observó entre los 2 y 7 días; pero no entre los 7 y 14 días. En la Figura 21, se presenta el efecto de dichas cepas a los 7 días de incubación bajo las tres condiciones de temperatura evaluadas. En los ensayos, *P. fluorescens* Q35, *Bacillus* sp. Q37, Q38, Q39, *Bacillus methylotrophicus* FR4B12 y *Bacillus* sp. AG2.2, no inhibieron al patógeno, ni mostraron crecimiento por efecto de la temperatura. Solo *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu mostraron un incremento en el crecimiento, siendo más notable en *Bacillus* sp. PEu.

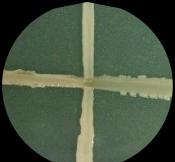
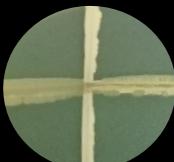
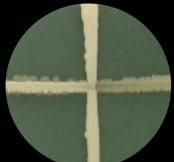
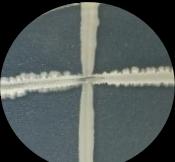
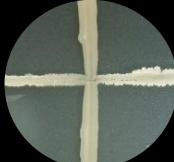
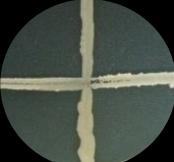
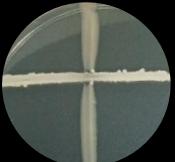
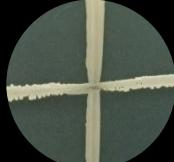
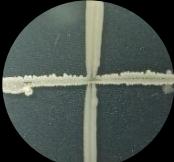
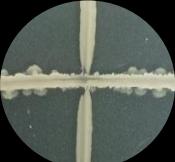
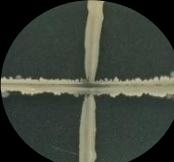
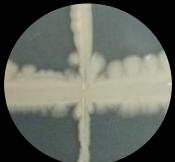
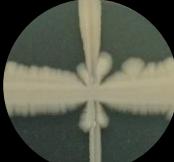
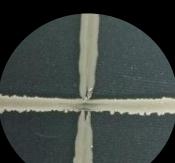
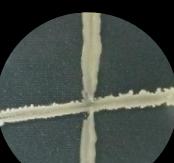
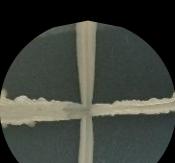
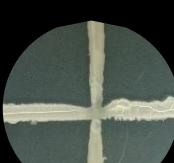
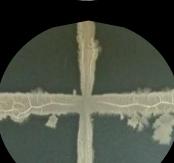
La interacción de *Bacillus subtilis* Q11 vs *Agrobacterium deltaense* M8R5 mostró en el punto de intersección de la estría, una movilización orientada hacia su competidor *A. deltaense* M8R5. A medida que avanzó en dirección a la estría de *A. deltaense*, no se evidenció inhibición, sino una aparente migración hacia ella. Cabe destacar que, entre las tres temperaturas evaluadas, la movilización fue más evidente a 30 y 35 °C.

Los patrones de migración observados sugieren que *B. subtilis* Q11 responde a la presencia de sustancias difusibles producidas por *A. deltaense* M8R5, de forma similar a lo reportado

por Liu et al. (2018), quienes demostraron que metabolitos liberados por *Streptomyces venezuelae*, incluyendo cloranfenicol en concentraciones subinhibitorias, inducen motilidad deslizante (“sliding”) en *B. subtilis*. Sin embargo, en este estudio, la expansión de *Bacillus* hacia la colonia de *A. deltaense* podría reflejar un comportamiento de atracción o una respuesta de movilidad inducida por metabolitos difusibles, más que una simple evitación derivada de la competencia antibiótica.

En contraste, *Bacillus sp.* PEu mostró una respuesta distinta. Su movilización hacia *A. deltaense* M8R5 fue menos pronunciada que la observada en *B. subtilis* Q11, detectándose únicamente un leve desplazamiento a los 7 días de incubación a 25 °C. Sin embargo, *Bacillus sp.* PEu presentó otro tipo de movimiento que no se dirigió hacia la estría de *A. deltaense*, sino hacia las zonas libres de crecimiento bacteriano. Este patrón sugiere un comportamiento asociado con dispersión colectiva o competencia por espacio, donde las células cooperan para expandirse y colonizar rápidamente la superficie disponible con el fin de monopolizar los recursos (Jautzus *et al.*, 2022).

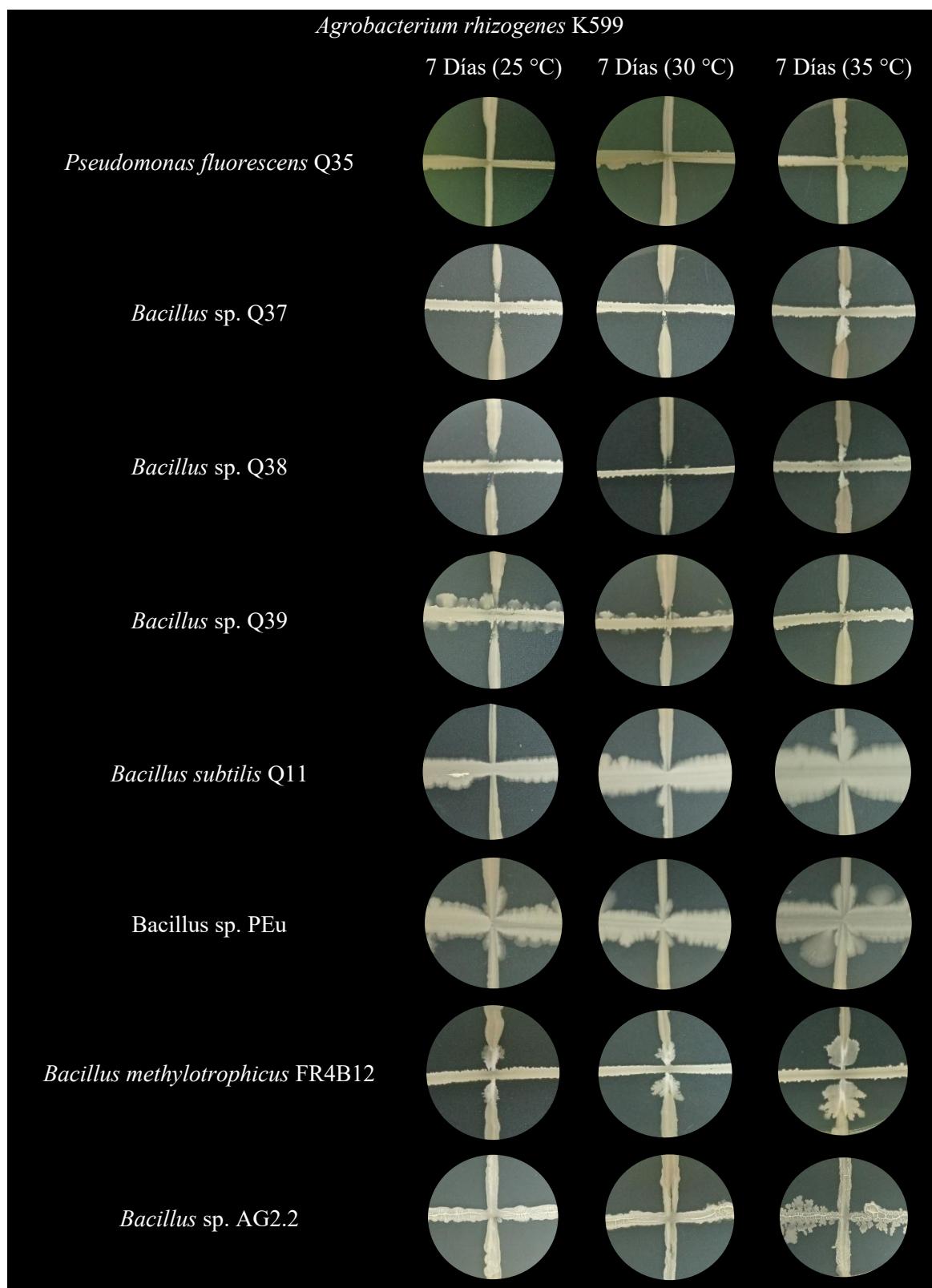
*Agrobacterium deltaense* M8R5

	7 Días (25 °C)	7 Días (30 °C)	7 Días (35 °C)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Q35			
<i>Bacillus</i> sp. Q37			
<i>Bacillus</i> sp. Q38			
<i>Bacillus</i> sp. Q39			
<i>Bacillus subtilis</i> Q11			
<i>Bacillus</i> sp. PEu			
<i>Bacillus methylotrophicus</i> FR4B12			
<i>Bacillus</i> sp. AG2.2			

**Figura 21.** Ensayos de antagonismo por estrías cruzadas contra *Agrobacterium deltaense* M8R5 tras 7 días a 25, 30 y 35 °C. Las cepas de biocontrol se estriaron horizontalmente, mientras que M8R5 se estrió verticalmente.

En el ensayo de antagonismo contra *Agrobacterium rhizogenes* K599 (Figura 22), *P. fluorescens* Q35 y *Bacillus* sp. AG2.2 no presentaron ningún tipo de inhibición, mientras que *Bacillus* sp. Q37 y *Bacillus* sp. Q38 formaron halos inhibitorios en promedio de 10 y 8 mm a los 25 y 30 °C. En el caso de *Bacillus* sp. Q39, presentó inhibición minina en el punto de cruce de las estrías y un incremento en el crecimiento a temperaturas 25 °C. *Bacillus subtilis* Q11 también presentó movilidad dirigida hacia *A. rhizogenes* K599 a 30 y 35 °C; no obstante, esta respuesta fue más pronunciada en *Bacillus* sp. PEu, ya que mostró movilidad en las tres temperaturas evaluadas, siendo más evidente a 35 °C. Por su parte, *Bacillus methylotrophicus* FR4B12 exhibió movilidad dirigida hacia su competidor *A. deltaense* en todas las condiciones térmicas, con un efecto más notable a 35 °C.

En conjunto, los resultados evidencian que *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu mostraron una mayor respuesta frente a *Agrobacterium deltaense* M8R5, principalmente mediante movilidad dirigida y competencia por espacio, con un efecto más notable a 30–35 °C. No obstante, *A. deltaense* M8R5 no fue fácilmente inhibida, lo que evidencia una mayor resistencia en comparación con el control positivo *A. rhizogenes* K599.



**Figura 22.** Confrontación bacteriana por estrías cruzadas de *Agrobacterium rhizogenes*

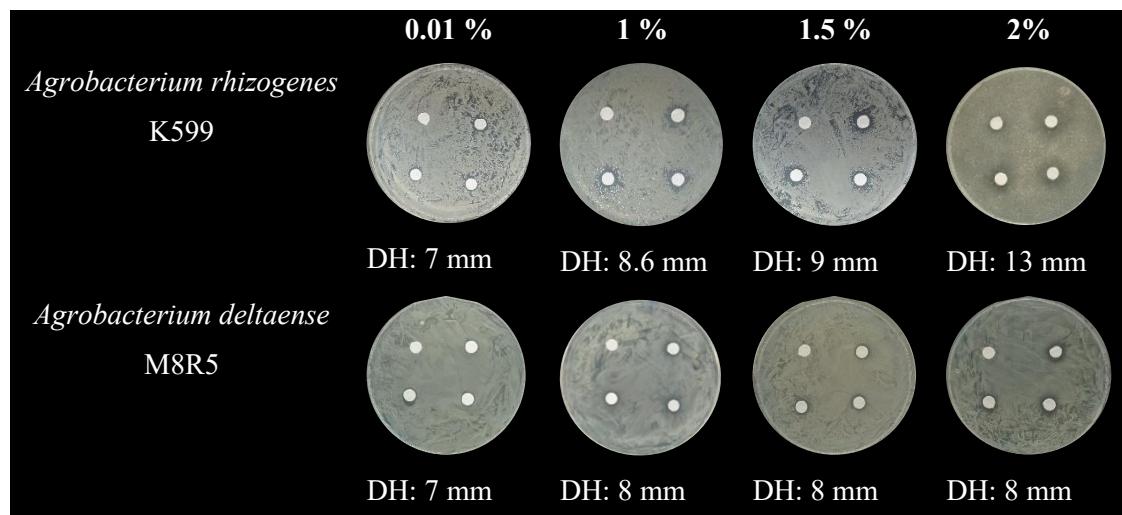
K599 tras 7 días a 25, 30 y 35 °C. Las cepas de biocontrol se estriaron horizontalmente, mientras que K599 se estrió verticalmente.

## 6.8 Ensayos de inhibición con agroquímicos

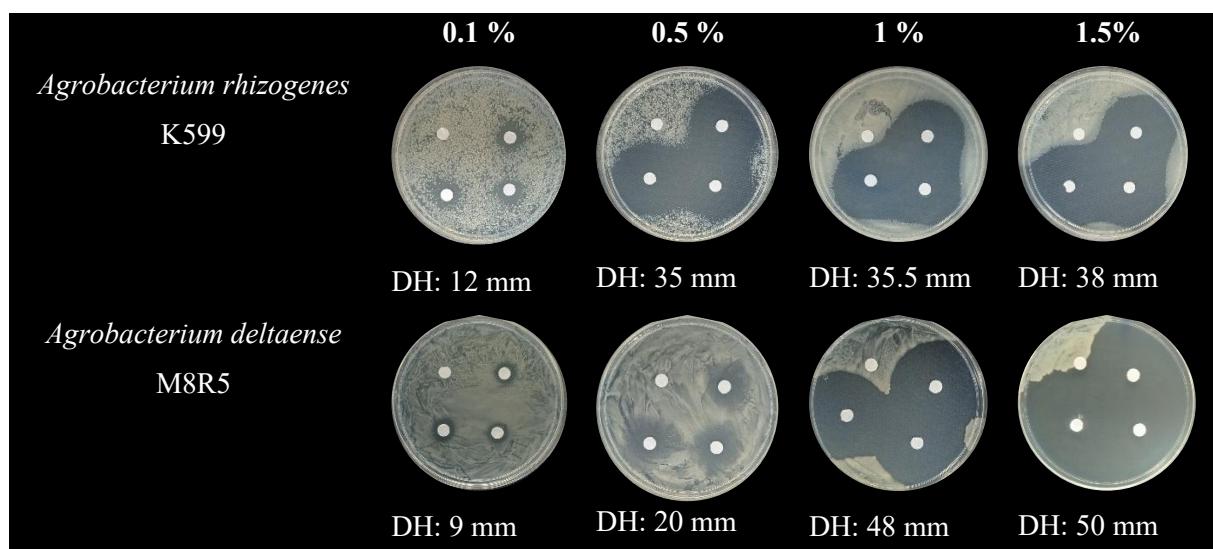
En la Figura 23, se muestra el efecto de Busan® 1129 sobre el crecimiento de *A. rhizogenes* K599 y *A. deltaense* M8R5. Ambas cepas presentaron halos de inhibición a partir de la concentración más baja (0.01 %), con diámetros que aumentaron ligeramente conforme se incrementó la concentración del producto. Para *A. rhizogenes* K599, los diámetros de halo (DH) variaron de 7.5 mm a 9.5 mm entre 0.01 % y 2 %, mientras que *A. deltaense* M8R5 mostró valores de 7 mm a 8 mm bajo las mismas condiciones. Los resultados sugieren que ambas cepas muestran una resistencia similar frente a las concentraciones evaluadas de Busan® 1129.

En la Figura 24, empleando el producto FITO TSP®, se observó una inhibición notable en ambas cepas. En *A. rhizogenes* K599, los DH aumentaron progresivamente desde 12 mm (0.1 %) hasta 38 mm (1.5 %), mientras que en *A. deltaense* M8R5 se registraron halos de 9 mm a 50 mm en el mismo rango de concentraciones. En este caso, la cepa *A. deltaense* M8R5 mostró mayor sensibilidad al producto, evidenciada por un incremento del halo de inhibición.

En conjunto, los resultados sugieren que FITO TSP® presenta una actividad antimicrobiana superior a Busan® 1129 frente a las cepas evaluadas, y que *A. deltaense* M8R5 podría ser más susceptible a la acción de este tipo de compuestos. Sin embargo, esta diferencia no parece estar relacionada con la concentración del ingrediente activo, ya que ambos productos contienen la misma proporción de 2-(tiocianometiltio)benzotiazol (TCMTB, 10%) y metiltiocianato (MTC, 10%), según las fichas técnicas públicas de los fabricantes. Por lo tanto, la mayor eficacia observada en FITO TSP® podría atribuirse a diferencias en la formulación, como la presencia de excipientes, agentes dispersantes o estabilizantes, así como a variaciones en la tecnología de formulación, factores que pueden influir en la liberación y estabilidad del compuesto activo durante la interacción con las bacterias.



**Figura 23.** Sensibilidad de *A. rhizogenes* K599 y *A. deltaense* M8R5 a Busan® 1129. Se evaluó usando distintas concentraciones del producto (10 µL) incubadas a 32 °C por 72 h. DH: diámetro del halo de inhibición; diámetro del papel filtro = 7 mm.



**Figura 24.** Sensibilidad de *A. rhizogenes* K599 y *A. deltaense* M8R5 a FITO TSP®. Se evaluó usando distintas concentraciones del producto (10 µL) incubadas a 32 °C por 72 h. DH: diámetro del halo de inhibición; diámetro del papel filtro = 7 mm.

## 7. DISCUSIÓN

La identificación clásica de microorganismos fitopatógenos, basada en los postulados de Koch, establece que el agente causal de la enfermedad debe encontrarse consistentemente en plantas enfermas, debe aislararse de la planta afectada, e inducir la misma sintomatología al inocularse en una planta sana y recuperarse el agente patógeno nuevamente a partir de esta última. Este enfoque fue el punto de partida para evaluar cepas pertenecientes al género *Agrobacterium* como lo realizado por Riker *et al.* en 1930, quienes las probaron no solo en las mismas especies de plantas de manzano donde fueron aisladas, sino también en *Rosa setigera* y *Lonicera morrowii* donde también se observó rizogénesis. En las últimas décadas, *Agrobacterium* ha sido ampliamente utilizado como un vector biológico natural para la transferencia de genes, pues tiene la capacidad de infectar una amplia variedad de cultivos, incluyendo hortalizas, cereales, leguminosas, frutales e incluso algunas especies forestales y ornamentales (Zahid, 2020; Milošević *et al.*, 2015). Si bien su uso ha permitido la generación de plantas genéticamente modificadas con múltiples fines desde la producción de metabolitos secundarios hasta la generación de plantas resistentes al estrés biótico y abiótico (Bagal *et al.*, 2023), no debe desestimarse que sigue siendo un agente patógeno, que aunque no se encuentra causando enfermedades de manera extensiva en regiones, si es capaz de provocar pérdidas económicas considerables en los invernaderos donde se ha encontrado, por lo que requiere de atención para su manejo como patógeno re-emergente (Bosmans *et al.*, 2017).

El uso de medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas siguen siendo los métodos tradicionales empleados para la identificación de cepas de *Agrobacterium*. Las cuales detectan diversas características fisiológicas, incluyendo la reducción de iones de telurito de potasio, la producción de 3-cetolactosa, la capacidad de crecimiento a pH 11 y en presencia de compuestos tóxicos, así como la utilización de fuentes de carbono alternativas, como el eritritol, entre otras (Vishnubhotla *et al.*, 2025; Laxmi *et al.*, 2018). En esta investigación, se empleó la tinción de Gram como herramienta preliminar de escrutinio y selección. A pesar de su carácter general, resultó ser una estrategia eficaz en la etapa inicial del proceso de identificación, ya que permitió descartar aproximadamente el 60 % de los aislados que

no cumplían con el criterio. Posteriormente, el empleo de los medios de cultivo MG+Te y MacConkey (Nguyen, 2017) permitió afinar la selección de aislados, descartando cerca del 74 % de los aislados remanentes. Esta fase constituyó un punto clave en la discriminación y selección de las cepas. Otros medios empleados, como el medio Hofer y el medio Kligler hierro, no contribuyeron significativamente a la reducción del número de aislados; sin embargo, proporcionaron información valiosa sobre su capacidad de adaptación a condiciones de pH alcalino, la producción de ácidos y su habilidad para fermentar lactosa u otras fuentes de carbono. Otra prueba empleada fue la producción de 3-cetolactosa, comúnmente utilizada en la identificación de cepas del género *Agrobacterium*. Esta prueba fue positiva para la cepa M8R5. No obstante, fue negativa para M15R5, las cuales posteriormente fueron identificadas genéticamente como *Agrobacterium*, lo que evidencia que este tipo de pruebas bioquímicas y medios selectivos, no siempre son concluyentes ni totalmente confiables para una identificación taxonómica precisa. Esta limitación también se debe a que otros géneros como *Asticcacaulis*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Shinella*, han adquirido la capacidad de crecer y tolerar las condiciones impuestas por estos medios, lo cual es el resultado de una adaptación a las condiciones adversas ambientales donde crecen (Kehlet-Delgado *et al.*, 2024; Munyan *et al.*, 2021).

En la secuenciación parcial del gen 16S rRNA, M8R5 y M15R5 fueron identificados aislados bacterianos que no mostraron relación con la familia *Rhizobiaceae*, como fue el caso de la cepa 1M7A3, identificada como perteneciente al género *Asticcacaulis*. Sin embargo, esta cepa comparte con M8R5, M6A13, M15R5 y Ar534 la pertenencia a la clase Alphaproteobacteria. Dentro de este grupo se han reportado bacterias de géneros como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Ochrobactrum* con capacidad para inducir rizogenesis en plántulas de pepino en ensayos *in vitro*, atribuido a la adquisición del plásmido pRi por transferencia horizontal (Weller *et al.*, 2006). Debido a ello, resultó necesaria la realización de pruebas de patogenicidad en plantas modelo, entre las cuales frijol y tomate han sido ampliamente utilizadas por diversos autores para evaluar la capacidad de inducción de rizogénesis (Ho-Plágaro *et al.*, 2018; Nanjareddy *et al.*, 2017). En frijol, la cepa *Agrobacterium* M8R5 mostró la mayor capacidad de rizogénesis, con un número de raíces

adventicias comparable a *A. rhizogenes* K599 y significativamente superior a las demás cepas, donde *Asticcacaulis* IM7A3 fue la que presentó la menor inducción. Este resultado es consistente, considerando que no se han documentado previamente bacterias del género *Asticcacaulis* con la capacidad de inducir rizogénesis. IM7A3 solo produjo raíces adventicias más largas que las otras cepas; sin embargo, su número fue comparable al control negativo, por lo que fue descartada como posible inductora de rizogénesis en frijol. En contraste, la cepa Ar534 promovió raíces adventicias de gran longitud, similares a las observadas con K599, por lo que fue considerada como una cepa con potencial rizogénico, junto con M8R5, que destacó por inducir un mayor número de raíces, aunque de menor longitud. La longitud de la raíz principal en las plantas de frijol aumentó en aquellas tratadas con cepas que además promovieron un mayor número de raíces adventicias, como M8R5 y K599. Esto sugiere un efecto sistémico de la bacteria sobre el desarrollo de la planta, ya que la inoculación fue realizada en los cotiledones. Adicionalmente, la altura de la planta se vio reducida con M8R5, presentando una menor altura de la parte aérea de la planta. Este efecto podría atribuirse a una redistribución del crecimiento celular, priorizando el desarrollo del sistema radicular sobre el crecimiento vegetativo aéreo, fenómeno que ha sido descrito previamente como parte de los síntomas característicos de la enfermedad (Bosmans *et al.*, 2017).

En los ensayos de patogenicidad de tomate, la cepa K599, reportada principalmente como patógeno de dicotiledóneas (Valdes-Franco *et al.*, 2016), indujo un bajo número de raíces (2 raíces por planta) y una escasa cobertura de pelos radicales (15.74 %), lo que concuerda con su especificidad de hospedero previamente documentada. Por otro lado, Ar534 y M6A13, indujeron el mayor número de raíces (10 raíces por planta), lo que sugiere una mayor afinidad o compatibilidad, posiblemente debido a su aislamiento de tomate. Esta respuesta también se refleja en el porcentaje de área radicular, particularmente en Ar534 (37.95 %), indicando una estimulación considerable del desarrollo de pelos radicales, lo cual sugiere que la cepa Ar534 del género *Shinella*, podría poseer genes relacionados con la inducción de raíces o mecanismos alternativos como la producción de fitohormonas que favorecen esta respuesta. Un caso particular fue la cepa M8R5, que no generó el mayor

número de raíces (5 raíces por planta), pero presentó el valor más alto de cobertura radicular (57.27 %). Esto sugiere una alta producción de pelos radiculares, una alteración en la arquitectura de la raíz que podría explicar la fuerte adhesión observada entre las raíces enfermas, en concordancia con lo reportado por Qutaiba en plántulas de *Capsicum annuum* inoculadas con *A. rhizogenes* (Qutaiba, 2020).

El análisis genómico de M8R5 reveló que, en los genes asociados al metabolismo central y al mantenimiento celular, existen varios implicados en mecanismos de resistencia y persistencia frente a estreses bióticos, abióticos y ambientales. Estos genes han sido previamente relacionados con factores de virulencia, ya que permiten a la bacteria responder eficazmente a condiciones adversas, como la limitación de nutrientes y el ambiente hostil que representa la planta hospedera (Chen *et al.*, 2024; Hu y Cronan, 2020; Martínez-Gutián *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2018).

Particularmente, en *Agrobacterium deltaense* M8R5 se identificó el plásmido pRiM8R5 que no solo contenía genes clave para el establecimiento de la infección, la transferencia de material genético y su integración en el ADN de la planta, tales como los genes *vir*, *rol*, *tra*, *trb*, *tzs* y diversas enzimas transposasas, sino que también albergaba genes típicamente cromosómicos, como *purR*, *yraA*, *nagR*, *edd*, *bioF*, *rdpA*, *ghrB*, *odh*, *addA*, *recB*, *mmuM* y *dnaK*. Estos genes están asociados con el metabolismo y el mantenimiento celular, por lo que su presencia en un plásmido sugiere una posible capacidad de replicación y funcionamiento parcialmente autónomo (Li *et al.*, 2025; Badrinarayanan *et al.*, 2017; Valizadeh *et al.*, 2017). Este plásmido mostró además variabilidad genética en comparación con los plásmidos pRiO132 y pRiNCPPB1855, los cuales han sido reportados como variantes del tipo Ri que presentan diferencias estructurales y funcionales relevantes respecto a otros plásmidos previamente caracterizados. Esta combinación de elementos génicos sugiere que se trata de un posible nuevo plásmido Ri, con un mosaico genético que podría haber surgido por eventos de recombinación o transferencia horizontal. Esta particular configuración genética merece especial atención, ya que podría contribuir a la emergencia de cepas con mayor capacidad infecciosa, representando un riesgo potencial como fitopatógenos reemergentes (Warabieda *et al.*, 2023; Hooykaas y Hooykaas, 2021)

El análisis genómico de *Shinella* sp. Ar534 reveló la presencia de un plásmido de 117,427 pb, identificado como pAr534, el cual mostró una alta similitud genética (99 % de cobertura) con el plásmido de *Shinella oryzae* UPHL-collab-2. Esto sugiere que podría tratarse de un plásmido característico del género *Shinella*, cuyas especies han sido reportadas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Alves *et al.*, 2014). Asimismo, cabe destacar que, dentro del genoma completo de *Shinella* sp. Ar534, el hallazgo de genes *vir*, *nod*, transposasas y genes asociados al metabolismo de opinas indica la presencia de elementos genéticos potencialmente involucrados en interacciones planta-microorganismo y en la adaptación a entornos variables (Lin *et al.*, 2008). Sin embargo, la ausencia de su co-localización con *repABC* y la carencia de genes *rol*, característicos de los plásmidos inductores de raíces (pRi), refuerzan la conclusión de que pAr534 no posee determinantes asociados a patogenicidad vegetal, sino que probablemente cumple funciones metabólicas, adaptativas y de competencia ecológica (Moriguchi *et al.*, 2001).

De manera consistente con estudios en *Shinella* aisladas de ambientes contaminados, el repertorio genómico de Ar534 incluye genes relacionados con la resistencia a metales y una amplia gama de rutas degradativas, lo que sugiere un notable potencial para aplicaciones de biorremediación (Liu *et al.*, 2024; Qiu *et al.*, 2016). Si bien estas características incrementan su robustez como candidato para procesos biotecnológicos, también plantean preocupaciones sobre la liberación ambiental de cepas portadoras de genes de resistencia, por lo que resulta imprescindible evaluar su capacidad de transferencia horizontal (conjugación) y establecer medidas de contención y bioseguridad antes de cualquier aplicación a campo.

En cuanto a los ensayos de biocontrol *in vitro*, *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu mostraron una mayor actividad de movilidad dirigida y competencia por espacio frente a *Agrobacterium deltaense* M8R5. Este comportamiento podría estar asociado con la exposición a concentraciones subinhibitorias de antibióticos o moléculas que interfieren con la traducción de proteínas, las cuales inducen en *B. subtilis* la activación de la motilidad deslizante. Este mecanismo constituye una estrategia adaptativa que le permite reubicarse rápidamente para evitar zonas con concentraciones inhibitorias de antibióticos y mantener

su crecimiento. Así, en lugar de detener su metabolismo ante el estrés traduccional, *B. subtilis* responde promoviendo una movilidad dependiente del crecimiento, lo que le confiere una ventaja competitiva frente a otras bacterias y podría contribuir a su eficacia como agente de biocontrol (Liu *et al.*, 2018).

El efecto de movilidad fue más evidente a 30–35 °C, rango que coincide con la temperatura óptima de crecimiento reportada para bacterias del género *Bacillus*. Estas condiciones favorecen tanto su desarrollo como su capacidad competitiva frente a otras bacterias, ya que la temperatura influye directamente en la síntesis y el perfil de metabolitos antimicrobianos y compuestos volátiles producidos por la célula, los cuales son determinantes en su actividad antagonista (Ohno *et al.*, 1995).

*Agrobacterium deltaense* M8R5 no fue inhibida en los ensayos de biocontrol *in vitro*, lo que sugiere que presenta una mayor resistencia en comparación con el control positivo *A. rhizogenes* K599. Este comportamiento coincide con los resultados obtenidos en los ensayos con antibióticos, donde M8R5 también mostró una menor sensibilidad. Dichas diferencias podrían estar asociadas con variaciones genéticas, mecanismos de tolerancia al estrés o una regulación diferencial de bombas de eflujo que limitan la acción de compuestos antimicrobianos. Estos factores podrían conferirle una ventaja adaptativa frente a compuestos antimicrobianos producidos por otras bacterias del entorno. En conjunto, la respuesta observada dependió tanto de la especie como de la temperatura, resaltando el potencial de *B. subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu como agentes de biocontrol bajo condiciones térmicas favorables, particularmente a temperaturas elevadas que promueven su crecimiento y producción de metabolitos antagonistas.

En los ensayos de control químico, FITO TSP® presentó mayor actividad antimicrobiana que Busan® 1129, siendo *A. deltaense* M8R5 más susceptible a la acción de FITO TSP®, diferencia que podría estar relacionada con variaciones en la tecnología de formulación, ya que se tratan de productos con el mismo principio activo. Los productores agrícolas señalan que la eficacia de Busan® 1129 ha disminuido con el tiempo, lo que los llevó a recurrir a FITO TSP®. Este sugiere la posible aparición de resistencia bacteriana, respaldada por el

análisis genético de la cepa M8R5, que evidenció la presencia de múltiples genes relacionados con adaptación ambiental y factores de virulencia, indicando un elevado potencial de supervivencia y tolerancia frente a agentes antimicrobianos.

Por otra parte, aunque FITO TSP® representa una solución rápida y eficaz para el manejo de *A. deltaense* M8R5 en la actualidad, no se debe perder de vista el impacto ambiental y sanitario que el uso de este tipo de productos puede generar, tanto sobre los ecosistemas como sobre la salud de los trabajadores en los cultivos agrícolas (Braun *et al.*, 2006; Nawrocki *et al.*, 2005). Esto resalta la importancia de evaluar alternativas de manejo integrado que combinen eficacia y seguridad ambiental, evitando la dependencia exclusiva de compuestos químicos que podrían favorecer la aparición de cepas resistentes.

## 8. CONCLUSIONES

1. El uso combinado de diversos medios de cultivo semiselectivos, pruebas bioquímicas y modelos de patogenicidad en plantas, constituyó una estrategia valiosa para el escrutinio inicial de aislados de *Agrobacterium*.
2. La secuenciación del gen ARNr 16S, junto con el análisis genómico, permitió identificar a *Agrobacterium deltaense* M8R5 como el probable agente causal, conteniendo un plásmido (pRiM8R5) con genes de patogenicidad y virulencia característicos de los plásmidos Ri de *Rhizobium rhizogenes*.
3. El plásmido pRiM8R5, también alberga genes relacionados con el metabolismo, la respuesta al estrés y el mantenimiento celular, lo que sugiere un nuevo plásmido Ri cuya carga genética podría favorecer no solo su capacidad patogénica si no también la adaptación bacteriana a diferentes entornos, contribuyendo así a la re-emergencia de nuevas cepas patógenas.
4. El análisis genómico de *Shinella* sp. Ar534, reveló que no posee genes de virulencia, por lo que su capacidad para inducir rizogénesis pudo deberse a la producción de hormonas, característico de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Su genoma, contiene además genes de resistencia a metales, antibióticos y rutas de degradación, evidenciando su tolerancia al estrés y el potencial biotecnológico para su uso en la biorremediación.
5. Los ensayos de biocontrol *in vitro* de *Bacillus subtilis* Q11 y *Bacillus* sp. PEu contra *A. deltaense* M8R5, mostraron actividad antagónica por competencia, con mayor eficacia a 30 y 35 °C.
6. El control químico de *Agrobacterium* con FITO TSP® mostró mayor eficacia que Busan® 1129, probablemente por diferencias en su formulación. Sin embargo, el uso continuo de estos productos podría favorecer la aparición de resistencia bacteriana.

## **9. PERSPECTIVAS**

Los resultados obtenidos en esta investigación abren la posibilidad de profundizar en el conocimiento de la enfermedad “raíces pilosas” desde una perspectiva genómica, ecológica y biotecnológica. La identificación de *Agrobacterium deltaense* M8R5 como un agente asociado a la enfermedad “raíces pilosas” en tomate, constituye una evidencia relevante que amplía el espectro de especies del género *Agrobacterium* implicadas en esta patología. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios que permitan profundizar sobre los genes presentes tanto en el cromosoma como en los plásmidos de la cepa M8R5, ya que podrían encontrarse otros genes involucrados en la patogenicidad, transferencia horizontal y resistencia a factores ambientales. Este análisis permitiría entender con mayor precisión su mecanismo de acción, adaptación al ambiente e interacción con otros microorganismos de la rizósfera.

El aislamiento de *Shinella* sp. Ar534, portadora de un plásmido con características no patogénicas, plantea una oportunidad para explorar su posible papel simbiótico o su potencial como promotor del crecimiento vegetal. Además, podría representar una alternativa ecológica debido a su posible función biotecnológica en el tratamiento de aguas residuales, la remediación de suelos contaminados con metales pesados o residuos de agroquímicos, considerando los genes asociados al metabolismo de diversos compuestos y a la tolerancia a condiciones de estrés abiótico detectados en su genoma.

En cuanto al biocontrol, se recomienda continuar con ensayos *in vitro* e *in vivo* con cepas de *Bacillus* Q11 y PEu para validar su eficacia. Además, el estudio de sus metabolitos secundarios, péptidos antimicrobianos y compuestos volátiles frente a *A. deltaense* M8R5 podría revelar rutas metabólicas clave y contribuir al desarrollo de bioformulados con acción antagonista más específica.

Por otra parte, el análisis metagenómico del microbioma rizosférico en plantas sanas y enfermas permitiría establecer correlaciones entre la composición microbiana y la incidencia de la enfermedad, aportando información valiosa para el desarrollo de

consorcios microbianos con efecto antagónico y la implementación de estrategias sostenibles de manejo sanitario en sistemas agrícolas bajo invernadero.

## 10. REFERENCIAS

- Abdelmageed**, H., y Gruda, N. (2009). Influence of grafting on growth, development and some physiological parameters of tomatoes under controlled heat stress conditions. *European Journal of Horticultural Science*, 74, 16–20. ISSN: 1611-4426
- Aghdak**, P., Mobli, M., y Khoshgoftarmanesh, A. H. (2016). Effects of different growing media on vegetative and reproductive growth of bell pepper. *Journal of Plant Nutrients*, 39(7), 967–973. doi:10.1080/01904167.2016.1143494
- Allocati**, N., Federici, L., Masulli, M. y Di-Ilio, C. (2009). Glutathione transferases in bacteria. *FEBS J.* 276(1):58-75. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x>
- Alhusayni**, A. A., y AL-Khikani, F. H. O. (2025). Sugar-fermenting flora mask *Vibrio cholerae* in Kligler iron agar. *One Health Bulletin*, 10-4103.
- Altamura**, M. M. (2004). *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77(1):89-101. doi: 10.1023/B:TICU.0000016609.22655.33
- Alves**, L. C., De-Souza, J. A. M., de-Mello-Varani, A., y de-Macedo-Lemos, E. G. (2014). The family rhizobiaceae. *The Prokaryotes* (pp. 419–437). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Arcos-Chiriboga**, O. E. (2018). Determinación de las enfermedades causadas por bacterias en el cultivo de tomate y sus alternativas de control en el sector de Chorlaví, cantón Ibarra, provincia de Imbabura. [Tesis de licenciatura]. *Universidad Técnica de Babahoyo*. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Babahoyo. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/4333>
- Ark**, P. A. y Thompson, J. P. (1961). Detection of hairy root pathogen, *Agrobacterium rhizogenes*, by the use of fleshy roots. *Phytopathology*. 51(1):69-71
- Badrinarayanan**, A., Le, T. B., Spille, J. H., Cisse, I. I., y Laub, M. T. (2017). Global

analysis of double-strand break processing reveals in vivo properties of the helicase-nuclease complex AddAB. *PLoS Genetics*, 13(5), e1006783. doi:10.1371/journal.pgen.1006783

**Bagal**, D., Chowdhary, A. A., Mehrotra, S., Mishra, S., Rathore, S., y Srivastava, V. (2023). Metabolic engineering in hairy roots: An outlook on production of plant secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107847. doi:10.1016/j.plaphy.2023.107847

**Bai**, B., Liu, W., Qiu, X., Zhang, J., Zhang, J., y Bai, Y. (2022). The root microbiome: Community assembly and its contributions to plant fitness. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(2), 230–243. doi:10.1111/jipb.13226

**Barroga**, C. F., Zhang, H., Wajih, N., Bouyer, J. H. y Hermodson, M. A. (1996). The proteins encoded by the rbs operon of *Escherichia coli*: I. Overproduction, purification, characterization, and functional analysis of RbsA. *Protein Sci.* 5(6):1093-1099.

**Beghini**, F., McIver, L. J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A. M., Valles-Colomer, M., Weingart, G., Zhang, Y., Zolfo, M., Huttenhower, C., Franzosa, E. A., y Segata, N. (2021). Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *eLife*, 10, e65088. <https://doi.org/10.7554/eLife.65088>

**Berg**, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 11–18. doi:10.1007/s00253-009-2092-7

**Bhende**, P. M. y Egan, S. M. (2000). Genetic evidence that transcription activation by *RhaS* involves specific amino acid contacts with sigma 70. *J Bacteriol.* 182(17):4959-4969. doi: <https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4959-4969.2000>

**Bhubhanil**, S., Sittipo, P., Chaoprasid, P., Nookabkaew, S., Sukchawalit, R. y Mongkolsuk, S. (2014). Control of zinc homeostasis in *Agrobacterium tumefaciens* via *zur*

and the zinc uptake genes *znuABC* and *zinT*. *Microbiology (Reading)*. 160(11):2452-2463.  
doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.082446-0>

**Biswas**, D., Chakraborty, A., Mukherjee, S., y Ghosh, B. (2023). Hairy root culture: A potent method for improved secondary metabolite production of Solanaceous plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1197555. doi:10.3389/fpls.2023.1197555

**Boldini**, J. M., Millán, Y. P., Osorio, J. C. P., Gómez, S. P. M., Lara, M. R. F., Mena, R. A. M., y Pulido, S. Y. P. (2019). Capítulo 11: Control biológico. Libros Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 201–211. Repositorio Institucional UNAD. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/39827>

**Bolger**, A. M., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15):2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

**Bosmans**, L., Alvarez-Perez, S., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Kerckhove, S. V., Paeleman, A., De Mot, R., Rediers, H., y Lievens, B. (2015). Assessment of the genetic and phenotypic diversity among rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 strains infecting solanaceous and cucurbit crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(8), 3–4. doi:10.1093/femsec/fiv081

**Bosmans**, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Moerkens, R., Wittemans, S., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Lievens, B., y Rieders, H. (2016). Efficacy of hydrogen peroxide treatment for control of hairy roots disease caused by rhizogenic agrobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 121, 519–527. doi:10.1111/jam.13187

**Bosmans**, L., Moerkens, R., Wittemans, L., De Mot, R., Rediers, H., y Lievens, B. (2017). Rhizogenic agrobacteria in hydroponic crops: Epidemics, diagnostics and control. *Plant Pathology*, 66(7), 1043–1053. doi:10.1111/ppa.12687

**Bourassa**, D. V., Kannenberg, E. L., Sherrier, D. J., Buhr, R. J. y Carlson, R. W. (2017). The lipopolysaccharide lipid A long-chain fatty acid is important for *Rhizobium*

*leguminosarum* growth and stress adaptation in free-living and nodule environments. *Mol Plant Microbe Interact.* 30(2):161-175. doi: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-16-0230-R>

**Braun**, C., Birck, R., Singer, M. V., Schnuelle, P., van der Woude, F. J., y Löhr, M. (2006). Life-threatening intoxication with methylene bis (thiocyanate): Clinical picture and pitfalls. A case report. *BMC Emergency Medicine*, 6(1), 5. doi:10.1186/1471-227X-6-5

**Broughton**, W. J. y Dilworth, M. J. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal*, 125, 1075–1080. doi:10.1042/bj1251075

**Buchfink**, B., Xie, C. y Huson, D. H. (2015). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*. 12(1):59-60. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>

**Buriticá**, S. M. (2019). Capítulo 6: Metales pesados, plaguicidas y efectos de los disruptores endocrinos en la salud humana y animal. Medicina de la Conservación y enfermedades de la Fauna Silvestre. Fondo Editorial Biogénesis, 73-82. ISBN: 978-958-5526-56-3

**Cao**, D., Hou, W., Song, S., Sun, H., Wu, C., Gao, Y., y Han, T. (2009). Assessment of conditions affecting Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96, 45-52. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9458-x>

**Casabon**, I., Zhu, S. H., Otani, H., Liu, J., Mohn, W. W., y Eltis, L. D. (2013). Regulation of the *KstR* 2 regulon of *Mycobacterium tuberculosis* by a cholesterol catabolite. *Mol Microbiol.*, 89(6), 1201-1212.

**Cavalieri**, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., ... y Spiegel, C. A. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Seattle: University of Washington

**CESAVEG** (2020). Manejo fitosanitario en agricultura protegida. Obtenido de Comité

Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato: [www.cesaveg.org.mx](http://www.cesaveg.org.mx). Citado: 28/02/2024

**Chen**, S. C., Ji, J., Popp, D., Jaekel, U., Richnow, H. H., Sievert, S. M., y Musat, F. (2022). Genome and proteome analyses show the gaseous alkane degrader *Desulfosarcina* sp. strain BuS5 as an extreme metabolic specialist. *Environ. Microbiol.*, 24(4), 1964-1976.

**Chen**, X., Feng, R., Du, Q., Mauchline, T. H., Clark, I. M., Lu, Y., y Liu, L. (2024). Identification and genomic analysis of a thermophilic bacterial strain that reduces ammonia loss from composting. *Microbiol Spectr*, 12(10), e00763-24

**Chen**, Y. H., Lee, P. C., y Huang, T. P. (2021). Biological control of collar rot on passion fruits via induction of apoptosis in the collar rot pathogen by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 111, 627-638. doi: <http://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0044-R>

**Chlebek**, D., Pinski, A., Żur, J., Michalska, J., y Hupert-Kocurek, K. (2020). Genome mining and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* BRZ63, a new endophyte of oilseed rape (*Brassica napus* L.) against fungal pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8740. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21228740>

**Choi**, U., Park, Y. H., Kim, Y. R., Seok, Y. J., y Lee, C. R. (2016). Increased expression of genes involved in uptake and degradation of murein tripeptide under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 363(14), fnw136.

**Cordero-Ramírez**, J. D., López-Rivera, R., Calderón-Vázquez, C. L., Figueroa-López, A. M., Martínez-Álvarez, J. C., Leyva-Madrigal, K. Y., Cervantes-Gámez, R. G., y Maldonado-Mendoza, I. E. (2012). Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(3), 712-730. doi: <https://doi.org/10.7550/rmb.17897>

**Costechareyre**, D., Rhouma, A., Lavire, C., Portier, P., Chapulliot, D., Bertolla, F., Boubaker, A., Dessaix, Y., y Nesme, X. (2010). Rapid and efficient identification of *Agrobacterium* species by *recA* allele analysis: *Agrobacterium recA* diversity. *Microbial Ecology*, 60, 862-872. doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9685-7>

**de Freitas**, C. C. (2021). Biology and Management of *Agrobacterium rhizogenes*. Tesis doctoral. The Ohio State University. Disponible en: <https://plantpath.osu.edu/our-people/cecilia-chagas-de-freitas>

**Dehio**, C., Grossmann, K., Schell, J., y Schmülling, T. (1993). Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.*, 23(6), 1199-1210. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00042353>

**de Veaux**, L. C., Clevenson, D. S., Bradbeer, C., y Kadner, R. J. (1986). Identification of the *btuCED* polypeptides and evidence for their role in vitamin B12 transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 167(3), 920-927.

**Dlamini**, S. P., Akanmu, A. O., y Babalola, O. O. (2022). Rhizospheric microorganisms: The gateway to a sustainable plant health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6, 925802. doi: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.925802>

**Escobar**, P., Montealegre, J., y Herrera, R. (2004). Respuesta *in vitro* de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a Fe<sup>3+</sup>, salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizadas en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. *Boletín Micológico*, 19, 95-102. ISSN: 1315-2556

**Estrada-Navarrete**, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Guillén, G., Díaz-Camino, C., Campos, F., Quinto, C., Gresshoff, P. M., y Sanchez, F. (2007). Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*. *Nature Protocols*, 2(7), 1819-1824. doi: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.259>

**Estrada-Navarrete**, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., y Gresshoff, P. M. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the *Phaseolus* spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact*, 19(12), 1385-1393

**FAO** (2019). La FAO presenta 2020 como año internacional de la sanidad vegetal.

Obtenido de Organización para la Agricultura y la Alimentación:  
<https://www.fao.org/news/story/es/item/1253562/icode/>. Citado: 15/11/2023

**Feng**, L. Y., Xu, J. Z., y Zhang, W. G. (2018). Improved L-leucine production in *Corynebacterium glutamicum* by optimizing the aminotransferases. *Molecules*, 23(9), 2102

**Fiedler**, S., Steinbüchel, A., y Rehm, B. H. A. (2002). The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. *Arch. Microbiol.*, 178(2), 149–160.

**García-Martínez**, D. C., Vázquez López, A., Ayala Escobar, V., Nava Díaz, C., y Aranda Ocampo, S. (2022). *Bacillus* y *Pseudomonas* fluorescentes de la rizosfera de agaves silvestres antagonistas contra bacterias pectinolíticas. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 9(1), e3177. doi: <https://doi.org/10.19136/era.a9n1.3177>

**Gaur**, R., Shani, N., Kawaljeet, Johri, B. N., Rossi, P., y Aragno, M. (2004). Diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads do not influence AM fungi in wheat rhizosphere. *Curr. Sci.*, 86(3), 453–457.

**Genevaux**, P., Keppel, F., Schwager, F., Langendijk-Genevaux, P. S., Hartl, F. U., y Georgopoulos, C. (2004). In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor. *EMBO Rep.*, 5(2), 195-200.

**Ghazy**, N., y El-Nahrawy, S. (2021). Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of Microbiology*, 203, 1195-1209. doi: <http://doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>

**Gimenez**, R., Nuñez, M. F., Badia, J., Aguilar, J., y Baldoma, L. (2003). The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J.*

*Bacteriol.*, 185(21), 6448-6455.

**González-León**, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., y Mercado-Flores, Y. (2023). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(1), 1-14. doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>

**Halebian**, S., Harris, B., Finegold, S. M., y Rolfe, R. D. (1981). Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(3), 444-448.

**Hall**, J. P., Botelho, J., Cazares, A., y Baltrus, D. A. (2022). What makes a megaplasmid? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1842), 20200472

**Hashem**, A., Tabassum, B., y Abd-Allah, E. F. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1291-1297. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

**Hernández** Garboza, L., y Bustamante Rojas, E. (2001). Control biológico de la marchitez bacterial en tomate con el uso de enmiendas orgánicas. ISSN: 1016-0469

**Hirakawa**, H., Oda, Y., Phattarasukol, S., Armour, C. D., Castle, J. C., Raymond, C. K., Lappala, C. R., Schaefer, A. L., Harwood, C. S., y Greenberg, E. P. (2011). Activity of the *Rhodopseudomonas palustris* p-coumaroyl-homoserine lactone-responsive transcription factor RpaR. *J. Bacteriol.*, 193(10), 2598-2607.

**Hofer**, A. W. (1941). A characterization of *Bacterium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) Lohnis. *Journal of Bacteriology*, 41(2), 193-224

**Ho-Plágaro**, T., Huertas, R., Tamayo-Navarrete, M. I., Ocampo, J. A., y García-Garrido, J. M. (2018). An improved method for *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of tomato suitable for the study of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Methods*, 14, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0304-9>

**Hooykaas**, M. J., y Hooykaas, P. J. (2021). Complete genomic sequence and phylogenomics analysis of *Agrobacterium* strain AB2/73: a new *Rhizobium* species with a unique mega-Ti plasmid. *BMC Microbiol*, 21, 1-17

**Hooykaas**, P. J. (2023). The Ti plasmid, driver of *Agrobacterium* pathogenesis. *Phytopathology*. 113(4), 594-604.

**Horne**, C. R., Venugopal, H., Panjikar, S., Wood, D. M., Henrickson, A., Brookes, E., North, R. A., Murphy, J. M., Friemann, R., Griffin, M. D. W., Ramm, G., Demeler, B., y Dobson, R. C. (2021). Mechanism of NanR gene repression and allosteric induction of bacterial sialic acid metabolism. *Nat. Commun.*, 12(1), 1988.

**Hu**, Y., y Cronan, J. E. (2020).  $\alpha$ -Proteobacteria synthesize biotin precursor pimeloyl-ACP using BioZ 3-ketoacyl-ACP synthase and lysine catabolism. *Nat Commun*, 11(1), 5598

**Ignatov**, A., Khodykina, M., Vinogradova, S., Polityko, V., Pluschikov, V., y Kornev, K. (2016). First report of rhizogenic strains of *Agrobacterium radiobacter* biovar 1 causing root mat of cucumber and tomato in Russia. *Plant Disease*, 100(7), 1493-1493. doi: <https://doi.org/10.1094/pdis-11-15-1382-pdn>

**Izzeddin**, N., y Medina, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3), 8-12. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375939018004>

**Jamali**, H., Sharma, A., Roohi, y Srivastava, A. K. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 60, 268-280. doi: <http://doi.org/10.1002/jobm.201900347>

**Jautzus**, T., van Gestel, J., y Kovács, Á. T. (2022). Complex extracellular biology drives surface competition during colony expansion in *Bacillus subtilis*. *The ISME Journal*, 16(10), 2320-2328

**Jeong**, J. A., Baek, E. Y., Kim, S. W., Choi, J. S., y Oh, J. I. (2013). Regulation of the *ald* gene encoding alanine dehydrogenase by AldR in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.*, 195(16), 3610-3620.

**Kabdwal**, B. C., Sharma, R., Tewari, R., Tewari, A. K., Singh, R. P., y Dandona, J. K. (2019). Field efficacy of different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Pseudomonas fluorescens*, and arbuscular mycorrhiza fungus against the major diseases of tomato in Uttarakhand (India). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0103-7>

**Kalia**, V. C., Lal, S., y Cheema, S. (2007). Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer. *Gene*, 389(1), 19-26.

**Kariuki**, C. K., Mutitu, E. W., y Muiru, W. M. (2020). Effect of *Bacillus* and *Trichoderma* species in the management of the bacterial wilt of tomato (*Lycopersicum esculentum*) in the field. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(109), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00310-4>

**Kehlet-Delgado**, H., Montoya, A. P., Jensen, K. T., Wendlandt, C. E., Dexheimer, C., Roberts, M., Torres-Martínez, L., Friesen, M. L., Griffitts, J. S., y Porter, S. S. (2024). The evolutionary genomics of adaptation to stress in wild *Rhizobium* bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 121(13), e2311127121.

**Khavazi**, K., Asgharzadeh, A., Hosseini-Mazinani, M., y De Mot, R. (2008). Biocontrol of *Pseudomonas savastanoi*, causative agent of olive knot disease: antagonistic potential of non-pathogenic rhizosphere isolates of fluorescent *Pseudomonas*. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 73(1), 199-203.

**Kidd**, S. P., Djoko, K. Y., Ng, J., Argente, M. P., Jennings, M. P., y McEwan, A. G. (2011). A novel nickel responsive MerR-like regulator, NimR, from *Haemophilus influenzae*. *Metallomics*, 3(10), 1009-1018.

**Kim**, C., Song, S., y Park, C. (1997). The D-allose operon of *Escherichia coli* K-12. *J.*

*Bacteriol.*, 179(24), 7631-7637

**Kim, S. E., Lee, M. Y., Lee, M. H., Sim, S. Y., y Kim, Y. S.** (2014). Optimal management of tomato leaf pruning in rockwool culture. *Horticulture and Environmental Biotechnology*, 55, 445-454. doi: <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0049-y>

**Kligler, I. J.** (1918). Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. *J Exp Med*, 28, 319

**Kravchenko, L. V., Azarova, T. S., Leonova-Erko, E. I., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N. M., y Tikhonovich, I. A.** (2003). Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology*, 72(1), 37-41. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1022269821379>

**Kumar, S., Dhingra, A., y Daniell, H.** (2004). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol. Biol.*, 56(2), 203-216. doi: <https://doi.org/10.1007/s11103-004-2907-y>

**Laird, T. S., Flores, N., y Leveau, J. H.** (2020). Bacterial catabolism of indole-3-acetic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(22), 9535–9550.

**Lastochkina, O., Baymiev, A., Shayahmetova, A., Garshina, D., Koryakov, I., Shpirnaya, I., Pusenkova, L., Mardanshin, I., Kasnak, C., y Palamutoglu, R.** (2020). Effects of endophytic *Bacillus subtilis* and salicylic acid on postharvest diseases (*Phytophthora infestans, Fusarium oxysporum*) development in stored potato tubers. *Plants*, 9(1), 76. doi: <http://doi.org/10.3390/plants9010076>

**Laxmi, V. M., Latha, D., y Jayasree, A. S.** (2018). Production and characterization of curdlan from *Agrobacterium* sp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(11), 4871-4874

**Li, X., Wang, J., Su, C., Guo, C., Xu, Z., Wang, K., Pang, J., Lv, B., Wang, C., y Li, C.** (2025). The *PurR* family transcriptional regulator promotes butenyl-spinosyn production

in *Saccharopolyspora pogona*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 109, 14

**Liao**, S., Sun, A., Ojcius, D. M., Wu, S., Zhao, J., y Yan, J. (2009). Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai. *BMC Microbiol.* 9(1), 253.

**Lin**, D. X., Wang, E. T., Tang, H., Han, T. X., He, Y. R., Guan, S. H., y Chen, W. X. (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(6), 1409-1413

**Lippincott**, J. A., Lippincott, B. B., y Starr, M. P. (1981). The genus *Agrobacterium*. En: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, y H. G. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes*, 842-845. Springer Verlag, Berlin

**Liu**, D., Li, K., Hu, J., Wang, W., Liu, X., y Gao, Z. (2019). Biocontrol and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* in soybean *Phytophthora Blight*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 2908. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20122908>

**Liu**, Y., Kyle, S., y Straight, P. D. (2018). Antibiotic stimulation of a *Bacillus subtilis* migratory response. *MSphere*, 3(1), 10-1128

**Liu**, Y., Rohwerder, T., Bonatelli, M. L., von Postel, T., Kleinsteuber, S., Adrian, L., y Ding, C. (2024). A novel sulfatase for acesulfame degradation in wastewater treatment plants as evidenced from *Shinella* strains. *Environmental Science & Technology*, 58(42), 18892-18902

**Lomovskaya**, O. L., y Lewis, K. (1992). *Emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(19), 8938–8942.

**Lukas**, H., Reimann, J., Kim, O. B., Grimpø, J., y Unden, G. (2010). Regulation of aerobic and anaerobic D-malate metabolism of *Escherichia coli* by the LysR-type

regulator DmlR (YeaT). *J. Bacteriol.* 192(10), 2503–2511.

**Luna-Martínez**, L., Martínez Peniche, R. A., Hernández Iturriaga, M., Arvizu Medrano, S. M., y Pacheco Aguilar, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1), 63-69. doi: 10.35196/rfm.2013.1.63

**Martínez-Guitián**, M., Vázquez-Ucha, J. C., Álvarez-Fraga, L., Conde-Pérez, K., Lasarte-Monterrubio, C., Vallejo, J. A., Bou, G., Poza, M., y Beceiro, A. (2019). Involvement of *HisF* in the persistence of *Acinetobacter baumannii* during a pneumonia infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 9, 310

**Mary**, X. A., Varghese, A. M., Jayasurya, J., Sindhuja, S., y Devi, S. G. (2017). Isolation and pathogenecity study of *Agrobacterium* from rhizospheric soil of *Albizia saman*. *J Biotechnol Biochem.* 3(2), 23-27

**Mercado-Flores**, Y., Cárdenas-Álvarez, I. O., Rojas-Olvera, A. V., Pérez-Camarillo, J. P., Leyva-Mir, S. G., y Anducho-Reyes, M. A. (2014). Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. *Biological Control*. 76, 36-40. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.011>

**Michel-Aceves**, A. C., Otero-Sánchez, M. A., Martínez-Rojero, R. D., Ariza-Flores, R., Barrios-Ayala, A., y Rebolledo-Martínez, A. (2008). Control biológico *in vitro* de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 12(3), 55-68

**Milošević**, S., Cingel, A., y Subotić, A. (2015). Agrobacterium mediated transformation of ornamental species: A review. *Genetika*, 47(3), 1149-1164

**Moore**, L. W., Kado, C. I., y Bouzar, H. (1988). *Agrobacterium*, p. 16-36. En: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2nd ed., APS Press, St. Paul, MN

**Moriguchi**, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S., Kataoka, M., Tanaka, N., y

Yoshida, K. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.*, 307(3), 771–784.

**Mougel**, C., Cournoyer, B., y Nesme, X. (2001). Novel tellurite-amended media and specific chromosomal and Ti plasmid probes for direct analysis of soil populations of *Agrobacterium* biovars 1 and 2. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1), 65-74. doi: <https://doi.org/10.1128/aem.67.1.65-74.2001>

**Mauro**, M. L., y Bettini, P. P. (2021). *Agrobacterium rhizogenes rolB* oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiol. Biochem.* 165, 10–18.

**Mueller**, J. P., Bukusoglu, G., y Sonenshein, A. L. (1992). Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes: control of *gsiA* by the ComP-ComA signal transduction system. *J. Bacteriol.* 174(13), 4361–4373.

**Muntyan**, V. S., Afonin, A. M., Vladimirova, M. E., Saksaganskaya, A. S., Gribchenko, E. S., Baturina, O., y Roumiantseva, M. L. (2021). Complete genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* S35m, a salt-tolerant isolate from alfalfa rhizosphere in soil native to the Caucasus region. *Microbiol Resour Announc.* 10(11), e01128-20

**Nanjareddy**, K., Arthikala, M. K., Aguirre, A. L., Gómez, B. M., y Lara, M. (2017). Plant promoter analysis: Identification and characterization of root nodule specific promoter in the common bean. *J Vis Exp*, 130, 56140

**Naveed**, M., Ahmed, I., Khalid, N., y Mumtaz, A. S. (2014). Bioinformatics based structural characterization of glucose dehydrogenase (*gdh*) gene and growth promoting activity of *Leclercia* sp. QAU-66. *Braz. J. Microbiol.*, 45, 603–611.

**Nawrocki**, S. T., Drake, K. D., Watson, C. F., Foster, G. D., y Maier, K. J. (2005). Comparative aquatic toxicity evaluation of 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole and selected degradation products using *Ceriodaphnia dubia*. *Archives of Environmental*

*Contamination and Toxicology*. 48(3), 344-350

**Nguyen**, N. N. (2017). Isolation and identification of *Agrobacterium rhizogenes* inducing hairy roots of *Catharanthus roseus* *in vivo*. *Science & Technology Development Journal: Natural Sciences*, 1(T1), 48-59. doi: <https://doi.org/10.32508/stdjns.v1t1.434>

**Nilsson**, O., y Olsson, O. (1997). Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant.*, 100(3), 463–473. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03050.x>

**O'Neill**, T. M., y Yarham, D. (1993). The cucumber root mat mystery. *Grower*, 120, 8–9.

**Ohno**, A., Ano, T., y Shoda, M. (1995). Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5), 517-519

**Ozyigit**, I. I., Dogan, I., y Artam Tarhan, E. (2013). *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation and its biotechnological applications in crops. *Crop improvement: new approaches and modern techniques*, 1-48. doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_1)

**Pacheco**, A. J. R., y Jiménez, M. J. A. (2022). Partial characterization of a bacterium from tomato with hairy root disease. *J Biomed Eng Biotechnol*, 6, 10-14

**Padalon-Brauch**, G., Hershberg, R., Elgrably-Weiss, M., Baruch, K., Rosenshine, I., Margalit, H., y Altuvia, S. (2008). Small RNAs encoded within genetic islands of *Salmonella typhimurium* show host-induced expression and role in virulence. *Nucleic Acids Res.*, 36(6), 1913–1927.

**Palacio-Bielsa**, A., Pothier, J. F., Roselló Pérez, M., Duffy, B., y López, M. M. (2012). Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST 873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts. *Journal of Plant Pathology*. 94(1), 135-146. doi: 10.4454/jpp.v94i1sup.021

**Panno**, S., Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Crnogorac, A., Mandić, A., y Matić, S. (2021). A review of the most common and economically important diseases that undermine the cultivation of tomato crop in the Mediterranean basin. *Agronomy*, 11(11), 2188. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11112188>

**Parke**, D., y Ornston, L. N. (2003). Hydroxycinnamate (*hca*) catabolic genes from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are repressed by *HcaR* and are induced by hydroxycinnamoyl-coenzyme A thioesters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9), 5398–5409.

**Pereira**, B. M., Arraes, F., Martins, A. C. Q., Alves, N. S. F., Melo, B. P., Morgante, C. V., Saraiva, M. A. P., Grossi-de-Sá, M. F., Guimaraes, P. M., y Brasileiro, A. C. M. (2023). A novel soybean hairy root system for gene functional validation. *Plos One*. 18(5), e0285504. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285504>

**Petatán-Sagahón**, I., Anducho-Reyes, M. A., Silva-Rojas, H. V., Arana-Cuenca, A., Téllez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I. O., y Mercado-Flores, Y. (2011). Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12, 5522–5537. doi: <http://doi.org/10.3390/ijms12095522>

**Pinto**, U. M., Pappas, K. M., y Winans, S. C. (2012). The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10(11), 755–765.

**Pipite**, A., Lockhart, P. J., McLenachan, P. A., Christi, K., Kumar, D., Prasad, S., y Subramani, R. (2022). Isolation, antibacterial screening, and identification of bioactive cave dwelling bacteria in Fiji. *Frontiers in Microbiology*. 13, 1012867

**Plasencia**, A., Soler, M., Dupas, A., Ladouce, N., Silva-Martins, G., Martinez, Y., Lapierre, C., Franche, C., Truchet, I., y Grima-Pettenati, J. (2016). Eucalyptus hairy roots, a fast, efficient and versatile tool to explore function and expression of genes involved in wood formation. *Plant Biotechnology Journal*. 14(6), 1381-1393. doi: <https://doi.org/10.1111/pbi.12502>

**Polanco-Rodríguez**, A. G., Magaña Castro, T. V., Cetz Luit, J., y Quintal López, R. (2019). Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán, México. *Centro Agrícola*. 46(2), 72-83

**Podkowyrov**, S. M., y Larson, T. J. (1996). Identification of promoter and stringent regulation of transcription of the *fabH*, *fabD* and *fabG* genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 24(9), 1747–1742.

**Pozos**, N., Scow, K., Wuertz, S., y Darby, J. (2004). UV disinfection in a model distribution system: biofilm growth and microbial community. *Water Research*. 38, 3083-3091. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.011>

**Prabha**, S. B., Vignesh, A., y Murugesan, K. (2014). Biological control of damping off and stem rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) using an antagonistic actinomycete, *Saccharopolyspora* sp. *International Journal of Agricultural Science and Research*. 4(5), 55-65

**Qiu**, J., Yang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ma, Y., He, J., y Lu, Z. (2016). The complete genome sequence of the nicotine-degrading bacterium *Shinella* sp. HZN7. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1348

**Quijada**, A. I. Y., y Gómez, B. O. C. (2019). Salud ambiental en localidades agrícolas expuestas a plaguicidas en Sonora. *Sociedad y Ambiente*. 7(19), 55-82. doi: <https://doi.org/10.31840/sya.v0i19.1939>

**Quataiba**, A. N. (2020). Bio-interaction of *Agrobacterium rhizogenes* with *Capsicum annuum* L. (sweet variety) and establishment hairy roots cultures. *J Life Bio Sci Res*. 1(02), 30-33

**Rebecca-Morton**, E., y Fuqua, C. (2012). Isolation and cultivation of *Agrobacterium* species from natural sources. *Current Protocols in Microbiology*. 27(1), 3D-4. doi: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc03d04s27>

**Reddy**, B. P., Reddy, K. R. N., Rao, M. S., y Rao, K. S. (2008). Efficacy of antimicrobial metabolites of *Pseudomonas fluorescens* against rice fungal pathogens. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 2(1), 178–182.

**Riker**, A. J., Banfield, W. M., Wright, W. H., Keitt, G. W., y Sagen, H. E. (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J Agric Res*, 41, 507-540

**Robic**, K., Munier, E., Effantin, G., Lachat, J., Naquin, D., Gueguen, E., y Faure, D. (2023). Dissimilar gene repertoires of *Dickeya solani* involved in the colonization of lesions and roots of *Solanum tuberosum*. *Front. Plant Sci.*, 14, 1154110.

**Rodríguez-Chávez**, J. L., Juárez-Campusano, Y. S., Delgado, G., y Aguilar, J. R. P. (2019). Identification of lipopeptides from *Bacillus strain Q11* with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. *Postharvest Biology and Technology*. 155, 72-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharybio.2019.05.011>

**Rodríguez**, P. A., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. 16(2), 166-167

**Romero-Arenas**, O., Amaro, J. L., Damián, M. A., Valencia de Ita, M. A., Rivera, A., y Huerta, M. (2017). Biopreparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *Información Técnica Económica Agraria*. 113(4), 313-324. doi: <https://doi.org/10.12706/itea.2017.019>

**Safi**, H., Gopal, P., Lingaraju, S., Ma, S., Levine, C., Dartois, V., Yee, M., Li, L., Blanc, L., Liang, H. P. H., Husain, S., Hoque, M., Soteropoulos, P., Rustad, T., Sherman, D. R., Dick, T., y Alland, D. (2019). Phase variation in *Mycobacterium tuberculosis glpK* produces transiently heritable drug tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116(39), 19665–19674.

**Sánchez-Sánchez**, M., Aispuro-Hernández, E., Quintana-Obregón, E. A., y Martínez-Tellez, M. A. (2023). The tomato brown rugose fruit virus is restricted to specific areas in Sonora, Mexico—a study of 2021-2022 season. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*,

**Sawada**, H., y Azegami, K. (2014). First report of root mat (hairy root) of tomato (*Lycopersicon esculentum*) caused by *Rhizobium radiobacter* harboring cucumopine Ri plasmid in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 80, 98-114. doi: 10.3186/jjphytopath.80.98

**Schaad**, N. (1980). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA

**Schmidt**, C. S., Agostini, F., Simon, A. M., Whyte, J., Townend, J., Leifert, C., ... y Mullins, C. (2004). Influence of soil type and pH on the colonisation of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 1025-1046

**Serna-Pérez**, A., y Pérez-Molphe, E. (2002). Generación de raíces y plántulas transgénicas de toronja y lima dulce mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27, 251-259. doi: <https://doi.org/10.35196/rfm.2004.3.251>

**Shams**, M., Campillo, T., Lavire, C., Muller, D., Nesme, X., y Vial, L. (2012). Rapid and efficient methods to isolate, type strains and determine species of *Agrobacterium* spp. in pure culture and complex environments. *Biochemical Testing*, 4, 3-20. doi: 10.5772/36068

**Sharma**, A., Sharma, R., Bhattacharyya, T., Bhando, T., y Pathania, R. (2016). Fosfomycin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by efflux through a major facilitator superfamily (MFS) transporter—AbaF. *J. Antimicrob. Chemother.*, 72(1), 68–74.

**Sharma**, R. R., Singh, D., y Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50, 205-220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>

**Shen**, W. H., Petit, A., Guern, J., y Tempé, J. (1988). Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(10), 3417–3421. doi:

<https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3417>

**Siahmoshteh**, F., Siciliano, I., Banani, H., Hamidi-Esfahani, Z., Razzaghi-Abyaneh, M., Gullino, M. L., y Spadaro, D. (2017). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. *International Journal of Food Microbiology*, 254, 47-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.011>

**SIAP.** (2024). Panorama Agroalimentario 2024. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>. Consultado el 20 de diciembre de 2024

**Siddiqui**, I. A., Haas, D., y Heeb, S. (2005). Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(9), 5646–5649.

**Sivasakthi**, S., Usharani, G., y Saranraj, P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)–*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(16), 1265-1277. doi: 10.5897/AJAR2013.7914

**Smith**, E., y Townsend, C. (1907). A plant-tumor of bacterial origin. *Science*, 25, 671–673

**Solopova**, A., Formosa-Dague, C., Courtin, P., Furlan, S., Veiga, P., Péchoux, C., y Kulakauskas, S. (2016). Regulation of cell wall plasticity by nucleotide metabolism in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 291, 11323–11336.

**Sperling**, L., Mulero Alegría, M. D., Kaever, V., y Curtis, P. D. (2019). Analysis of *Brevundimonas subvibrioides* developmental signaling systems reveals inconsistencies between phenotypes and c-di-GMP levels. *J. Bacteriol.*, 201, e00201–19.

**Spornberger**, A., y Pieber, K. (2007). Influence of rootstocks on vegetative and reproductive characteristics of 'Suncrest' and 'Redcal' peach in Austria. *Acta Horticulturae*,

732, 285-290. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.732.42

**Stewart-Wade, S. M.** (2011). Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: their detection and management. *Irrigation Science*, 29, 267-297. doi: <https://doi.org/10.1007/s00271-011-0285-1>

**Sobrero, P., y Valverde, C.** (2012). The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit. Rev. Microbiol.*, 38(4), 276–299.

**Susin, M. F., Baldini, R. L., Gueiros-Filho, F., y Gomes, S. L.** (2006). *GroES/GroEL* and *DnaK/DnaJ* have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.*, 188(23), 8044–8053.

**Tenorio, R. G., Montealegre, J., y Herrera, R.** (2004). Control Biológico de *Fusarium solani* en Tomate Mediante el Empleo de los Bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria*, 31(1), 21-28. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90232-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90232-X)

**Tepfer, D.** (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, 37(3), 959–967. DOI: 10.1016/0092-8674(84)90430-6

**Urbanowski, M. L., Stauffer, L. T., y Stauffer, G. V.** (2000). The *gcvB* gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 37(4), 856–868.

**Valdes-Franco, J. A., Collier, R., Wang, Y., Huo, N., Gu, Y., Thilmony, R., y Thomson, J. G.** (2016). Draft genome sequence of *Agrobacterium rhizogenes* strain NCPPB2659. *Genome Announcements*, 4(4), 10-1128

**Valizadeh, A., Ir, P., y Khosravi, A.** (2017). Investigating the role of thermal shock protein (DnaK) HSP70 in bacteria. *J Bacteriol Mycol*, 4, 1055

**Vanlommel, W., Moerkens, R., Bosmans, L., Lievens, B., Rediers, H., Wittemans, L., y**

Van Kerckhove, S. (2020). Management of hairy root disease in protected tomato crops: a biological and chemical approach. *Acta Horticulturae*, 1269, 41-50. doi: 10.17660/ActaHortic.2020.1269.6

**Vargas**, P., Van Kerkckhove, S., Van Calenberge, B., Bosmans, L., Lievens, B., y Rediers, H. (2020). First report of hairy root disease, caused by rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1, in hydroponic bell pepper crop in South Korea. *Plant Disease*, 104(3), 968. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1719-PDN>

**Vargas**, P., Bosmans, L., Van Kerckhove, S., Van Calenberge, B., Raaijmakers, J. M., Lievens, B., y Rediers, H. (2021). Optimizing biocontrol activity of *Paenibacillus xylanexedens* for management of hairy root disease in tomato grown in hydroponic greenhouses. *Agronomy*, 11(5), 817. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050817>

**Vishnubhotla**, D., Krithi, M. R. R., Alekhya, A., Sriya, D., y Deepika, M. R. (2025). Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from crown gall and soil samples. Shanlax Publications, 166-179

**Vladimirov**, I. A., Matveeva, T. V., y Lutova, L. A. (2015). Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Russ. J. Genet.*, 51(2), 121–129.

**Voloshin**, O. N., Vanevski, F., Khil, P. P., y Camerini-Otero, R. D. (2003). Characterization of the DNA damage-inducible helicase *DinG* from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 278(30), 28284–28293.

**Wang**, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., y Wang, A. (2018). A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* cooke and promote the growth of seedlings. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1371. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19051371>

**Wang**, N., Wang, L., Zhu, K., Hou, S., Chen, L., Mi, D., Gui, Y., Qi, Y., Jiang, C., y Guo, J. H. (2019). Plant root exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated

biocontrol against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 98. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00098>

**Wang**, H., Zheng, Y., Zhou, Q., Li, Y., Liu, T., y Hou, X. (2024). Fast, simple, efficient *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation system to non-heading Chinese cabbage with transgenic roots. *Horticultural Plant Journal*, 10(2), 450-460. doi: <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2023.03.018>

**Warabieda**, M., Mikiciński, A., Oleszczak, M., y Puławska, J. (2021). Identification of the causal agents of crazy root disease on hydroponically cultivated cucumber plants in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 161(3), 543-552. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02340-6>

**Warabieda**, M., Kuzmanović, N., Trzciński, P., y Puławska, J. (2023). *Agrobacterium cucumeris* sp. nov. isolated from crazy roots on cucumber (*Cucumis sativus*). *Systematic and Applied Microbiology*, 46(2), 126402

**Weller**, S., Stead, D., O'Neill, T., Hargreaves, D., y McPherson, G. (2000). Rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 and cucumber root mat in the UK. *Plant Pathology*, 49(1), 43-50.

**Weller**, S. A., Stead, D. E., y Young, J. P. W. (2004). Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid and pathogenicity by other α-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2779-2785. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2779-2785.2004>

**Weller**, S. A., Stead, D. E., y Young, J. P. W. (2006). Recurrent outbreaks of root mat in cucumber and tomato are associated with a monomorphic, cucumopine, Ri-plasmid harboured by various Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 136-143

**Weisburg**, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(2), 697–703. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

**Yakabe**, L. E., Parker, S. R., y Kluepfel, D. A. (2012). Cationic surfactants: potential surface disinfectants to manage *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 contamination of grafting tools. *Plant Disease*, 96(3), 409-415. doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0839>

**Yee**, R., Cui, P., Shi, W., Feng, J., y Zhang, Y. (2015). Genetic screen reveals the role of purine metabolism in *Staphylococcus aureus* persistence to rifampicin. *Antibiotics*, 4(4), 627–642.

**Ye**, X., Chen, Y., Wan, Y., Hong, Y. J., Ruebelt, M. C., y Gilbertson, L. A. (2016). Constitutive expression of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens virG* mutant strains is responsible for improved transgenic plant regeneration in cotton meristem transformation. *Plant Cell Rep.*, 35, 601–611.

**Zahid**, A. (2020). Efficient transformation of cereals mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Moroccan Journal of Agricultural Sciences*, 1, 1-4

**Zhang**, Z., Huo, J., Velo, J., Zhou, H., Flaherty, A., y Saier Jr, M. H. (2024). Comprehensive characterization of *fucAO* operon activation in *Escherichia coli*. *Int. J. Mol. Sci.*, 25(7), 3946.