



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

## **CONTROL BIOLÓGICO DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIADO POR BACTERIAS NATIVAS EN LA AGALLA DE LA CORONA**

ELIZABETH SÁNCHEZ JIMÉNEZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: “Control biológico de *Agrobacterium tumefaciens* mediado por bacterias nativas en la agalla de la corona” realizada por el (la) estudiante: **Elizabeth Sánchez Jiménez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Aranda Ocampo Sergio

ASESOR (A)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ochoa Martinez Daniel L.

ASESOR (A)

  
\_\_\_\_\_  
DR. Mejía Sánchez Dimas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2022

# CONTROL BIOLÓGICO DE *Agrobacterium tumefaciens* MEDIADO POR BACTERIAS NATIVAS EN LA AGALLA DE LA CORONA

Elizabeth Sánchez Jiménez, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

Se consigna que la agalla de la corona causada por *A. tumefaciens* es un nicho ecológico altamente específico; sin embargo, nuestra hipótesis sugiere que dentro de este tejido se albergan bacterias nativas con potencial antagonismo contra *A. tumefaciens*. El objetivo de este estudio fue explorar la densidad de poblaciones bacterianas nativas en la agalla de la corona de frambuesa y comprobar su potencial antagonismo. Se aislaron poblaciones bacterianas dentro de seis muestras de agallas de frambuesa var. elvira. Se identificó a *A. tumefaciens* mediante caracterización bioquímica, patogenicidad y por la secuenciación del gen *virD2*. Las densidades de poblaciones bacterianas totales se calcularon por el conteo directo de placas en medios agar nutritivo, R2A y Pseudomonas-agar, se evaluó el antagonismo de las bacterias nativas en la agalla de la corona *in vitro* contra *A. tumefaciens* mediante el índice de eficiencia antagónica; las bacterias con potencial antagónico fueron empleadas para el modelo *in vivo*. Se emplearon plantas de jitomate var. rámses, tratadas por inmersión de raíces en suspensión de bacterias antagónicas  $1 \times 10^7$  UFC, mediante dos tipos de inoculación del patógeno, por herida y por sustrato, cuatro tratamientos con cinco repeticiones en un diseño completamente al azar manteniendo el experimento bajo condiciones de invernadero. La densidad poblacional dentro de la agalla de corona es poco diversa, identificando por amplificación del gen 16S rARN *Pseudomonas spp* (61.5 %), *Bacillus spp* (15.3 %), *Alcaligenes faecalis* (15.3 %) y *Delftia sp* (7.69 %). La bacteria con mayor índice de eficiencia antagónica *in vitro* contra *A. tumefaciens* fue *Alcaligenes faecalis*, seguido de *Delftia sp*, ( $p \leq 0.05$ ). La inoculación *in vivo* de las antagonistas no suprimió la infección; sin embargo, reducen significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la severidad de tumores en el tallo de las plantas, siendo *Alcaligenes faecalis* la bacteria más eficiente contra *A. tumefaciens*.

**Palabras clave:** *Agrobacterium tumefaciens*, agalla de la corona, bacterias nativas, antagonismo, biocontrol.

# BIOLOGICAL CONTROL OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MEDIATED BY NATIVE BACTERIA IN THE CROWN GALL

Elizabeth Sánchez Jiménez M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## ABSTRACT

Crown gall caused by *A. tumefaciens* is reported to be a highly specific ecological niche; however, our hypothesis suggests that native bacteria with potential antagonism against *A. tumefaciens* are harbored within this tissue. The objective of this study was to explore the density of native bacterial populations in the raspberry crown gall and to verify their potential antagonism. Bacterial populations were isolated within six gall samples of raspberry var. elvira. *A. tumefaciens* was identified by biochemical characterization, pathogenicity, and by sequencing of the *virD2* gene. The densities of total bacterial populations were calculated by direct plate count in nutrient agar, R2A and Pseudomonas-agar media, the antagonism of native bacteria in the crown gall in vitro against *A. tumefaciens* was evaluated by means of the efficiency index antagonistic; bacteria with antagonistic potential were used for the in vivo model. Tomato plants var. ramses, treated by immersion of roots in suspension of antagonistic bacteria  $1 \times 10^7$  CFU, by means of two types of inoculation of the pathogen, by wound and by substrate, four treatments with five repetitions in a completely randomized design, maintaining the experiment under greenhouse conditions. The population density within the crown gall is not very diverse, identifying by amplification of the 16S rRNA gene *Pseudomonas spp* (61.5%), *Bacillus spp* (15.3%), *Alcaligenes faecalis* (15.3%) and *Delftia sp* (7.69%). The bacterium with the highest rate of in vitro antagonistic efficiency against *A. tumefaciens* was *Alcaligenes faecalis*, followed by *Delftia sp*, ( $p \leq 0.05$ ). In vivo inoculation of the antagonists did not suppress the infection; however, they significantly reduce ( $p \leq 0.05$ ) the severity of tumors in the stem of plants, with *Alcaligenes faecalis* being the most efficient bacteria against *A. tumefaciens*.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, crown gall, native bacteria, antagonism, biologic control.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y al Posgrado de Fitosanidad–Fitopatología, por permitirme continuar con mi formación profesional, por las instalaciones, materiales, equipo y conocimientos proporcionados para el desarrollo de mi investigación.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el financiamiento del proyecto y la confianza depositada en mi persona para el desarrollo de nuevo conocimiento.

Agradecimientos a Driscoll´s Tlaxcala por la donación de material vegetal indispensable para el desarrollo de la investigación.

Agradezco a mi comité académico, principalmente al Dr. Sergio Aranda Ocampo y al Dr. Dimas Mejía Sánchez por su asesoramiento, paciencia y dedicación a lo largo del posgrado, su apoyo fue fundamental para el inicio, desarrollo y conclusión del proyecto.

Finalmente agradezco a mis compañeros del posgrado y al Ing. Jesús Castillo Zambrano por recordarme la importancia del compañerismo y trabajo en equipo, por la confianza y la motivación en el proceso, agradezco a mi papá y a mi hermano por ser mi soporte técnico-informático en toda mi formación profesional.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo es dedicado a mis padres, G. Adriana Jiménez Martínez y Martin Sánchez Flores queines con su amor y paciencia me han permitido cumplir una meta más, gracias por inculcar en mí el ejemplo del esfuerzo y dedicación, han sido mi apoyo incondicional en cada nueva idea y propósito, mi soporte y mi principal motivación.

A mi hermano y mi cuñada por sus ánimos, porras, por todo su apoyo, que muy a su manera ha estado presente en este y en otros procesos de mi vida. A mi sobrina Annette, por su cariño incondicional y por creer siempre en mí, esperando que un día sea capaz de cumplir sus metas y sueños.

A mis abuelitos que no dejan de confiar en mis capacidades y me han alentado a seguir adelante, con su cariño y palabras de motivación.

Finalmente dedico este trabajo a mis amigos Karen, Héctor, Nicol y Dalia quienes han estado presentes en este y en otros logros académicos y personales, alentándome y llenándome de energía en los momentos difíciles, sus palabras de apoyo y su constante presencia hacen que los procesos académicos sean menos exhaustivos.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS Y HIPÓTESIS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2.1 Objetivos específicos.....	4
2.2 Hipótesis.....	4
2.2.1 Hipótesis alternativa.....	4
III. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1. Género <i>Agrobacterium</i> .....	5
3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	6
3.3. Plásmido Inductor de tumores Ti.....	7
3.4. Proceso de infección por <i>A. tumefaciens</i> .....	8
3.5. Agalla de la corona.....	10
3.6. Opinas.....	12
3.7. Ecología microbiana en la agalla de la corona.....	12
3.8. Manejo de <i>A. tumefaciens</i> .....	13
3.9. Interacción bacteria-planta-ambiente.....	14
3.10. Control biológico.....	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. Material vegetal de frambuesa con síntomas de agalla de la corona.....	17
4.2 Aislamiento e identificación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	17
4.2.1. Caracterización bioquímica y determinación del biovar de <i>A. tumefaciens</i> .....	18
4.2.2. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>A. tumefaciens</i> .....	18
4.2.3. Secuenciación directa del gen <i>VirD2</i> .....	19
4.3. Aislamiento de poblaciones bacterianas cultivables totales de la agalla de la corona.....	19

4.3.1. Aislamiento de poblaciones de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. de la agalla de la corona .....	20
4.4. Antagonismo de bacterias aisladas de la agalla contra <i>A. tumefaciens</i> .....	21
4.4.1. Antagonismo <i>in vitro</i> .....	21
4.4.2. Antagonismo <i>in vitro</i> por metabolitos.....	21
4.4.3. Antagonismo <i>in vivo</i> contra <i>A. tumefaciens</i> .....	22
4.4.4. Colonización de raíces por los antagonistas.....	22
4.4.5. Inoculación de <i>A. tumefaciens</i> .....	23
4.5. Análisis estadístico .....	23
4.6. Identificación de cepas antagonistas contra <i>A. tumefaciens</i> .....	23
4.6.1. Secuenciación .....	24
4.6.2 Filogenia de cepas antagonistas.....	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
5.1. Aislamiento de <i>A. tumefaciens</i> .....	25
5.1.1 Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> .....	25
5.1.2. Pruebas de patogenicidad <i>in vivo</i> .....	26
5.1.3 Caracterización e identificación de <i>A. tumefaciens</i> .....	26
5.1.4. Secuenciación directa del gen <i>VirD2</i> .....	28
5.1.5. Análisis filogenético de la cepa A1 identificada como <i>A. tumefaciens</i> .....	29
5.2. Densidad de poblaciones bacterianas totales en la agalla de la corona en frambuesa.....	30
5.2.1 Aislamiento de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. de la agalla de la corona en frambuesa.....	31
5.2.3. Identificación molecular de antagonistas .....	34
5.2.4. Análisis filogenéticos de cepas nativas en la agalla de la corona.....	36
5.2.4.1 <i>Alcaligenes faecalis</i> .....	36
5.2.4.2. <i>Delftia</i> sp.....	37
5.2.4.3. <i>Bacillus</i> spp.....	38
5.2.4.4. <i>Pseudomonas</i> spp.....	39
5.3. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	41
5.3.1. Antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>A. tumefaciens</i> .....	41

5.3.2. Índice de Eficiencia de Antagonismo (IEA) .....	43
5.3.3. Antagonismo <i>in vitro</i> por metabolitos.....	44
5.3.4. Antagonismo <i>in vivo</i> contra <i>A. tumefaciens</i> .....	44
5.3.5. Análisis estadístico.....	46
5.3.6. Colonización de raíces por los antagonistas.....	48
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>54</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Triángulo de la enfermedad de *Agrobacterium tumefaciens*..... 9
- Figura 2.** Muestras de agalla de la corona de frambuesa var. elvira con diferentes estados de lignificación; el tejido blanco indica que la agalla se encuentra en un estado inicial de desarrollo..... 17
- Figura 3.** Cepas A1, A2 y A3 inoculadas en rodajas de zanahoria causando proliferación anormal del tejido y desarrollo de pequeños tumores. La cepa A1 indujo mayor severidad de tumoración con respecto a la cepa A2 y A3. .... 25
- Figura 4.** Plantas inoculadas con  $1 \times 10^7$  UFC/ml y masa bacteriana de la cepa A1. **A) y B).** Desarrollo de tumores a lo largo del tallo en plantas de jitomate inoculadas por inyección de una suspensión bacteriana en el tallo. **C) y E).** Desarrollo de tumores a lo largo del tallo en plantas de jitomate inoculadas por herida con masa bacteriana en el cuello de la raíz. **E).** Desarrollo de raíces e hinchazón del tallo en plantas de jitomate. **F).** Desarrollo de pequeños tumores a lo largo del tallo en plantas de girasol inoculadas por inyección de una suspensión bacteriana en el tallo. **G).** Síntomas de hinchazón de tallo, desarrollo de raíces y tumores. .... 26
- Figura 5.** Amplificación del gen *virD2* por PCR de la cepa A1 aislada de agallas de frambuesa e inoculada en rodajas de zanahoria, plantas de jitomate y girasol. Línea 1. Marcador de peso molecular 1 kb Invitrogen plus DNA ladder, 2: cepa A1, 3: cepa A2, 4; cepa A3, 5: control negativo..... 29
- Figura 6.** Análisis filogenético de la cepa A1 de *Agrobacterium tumefaciens* aislada de agalla de la corona de frambuesa basado en la secuencia del gen *virD2* descrito por Haas et al., (1995), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX, el aislamiento a1 de frambuesa esta asociado con clados de *A. tumefaciens*. .... 29
- Figura 7.** Poblaciones bacterianas totales (UFC/g de tejido) en agallas de frambuesa en los medios de cultivo agar nutritivo (AN) y R2A agar..... 31
- Figura 8.** Densidad de poblaciones de *Bacillus* spp. En UFC/g de tejido de agalla de frambuesa a 70 y 80 °c por 7 y 5 minutos respectivamente. \*Indica diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ) ..... 32

<b>Figura 9.</b> Poblaciones bacterianas fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> en microplacas con medio caldo BK suplementado con antibióticos observadas bajo luz ultravioleta (260 nm) a las 72 h de incubación a 28 °c. Cada placa corresponde a una muestra de agalla de la corona.....	33
<b>Figura 10.</b> UFC/g de tejido de poblaciones de <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. Aisladas del tejido de la agalla de la corona de frambuesa. *Indica diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).....	34
<b>Figura 11.</b> Árbol filogenético consenso de <i>Alcaligenes faecalis</i> aislada de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16s rARN descrito por Baker et al., (2003), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX, el aislamiento correspondiente a las bacterias AAC1 y AAC5 estan asociadas con clado de <i>Alcaligenes</i> spp.....	36
<b>Figura 12.</b> Árbol filogenético consenso de <i>Delftia</i> sp. Aislada de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16s rARN descrito por Baker et al., (2003), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de bootstrap calculado por el software MegaX, la cepa aislada de la agalla de la corona AAC2 esta asociada con el clado de <i>Delftia</i> sp.....	37
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético consenso de la cepa AAC6 y AAC10 aisladas de la agalla de la corona en frambuesa, asociadas con el clado de <i>Bacillus</i> spp, basado en la secuencia del gen 16s rARN descrito por Baker et al., (2003), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX.....	38
<b>Figura 14.</b> Árbol filogenético consenso de <i>Pseudomonas</i> spp. Aisladas de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16s rARN descrito por Baker et al., (2003), asociadas con el clado de <i>P. putida</i> , <i>P. citronillois</i> y <i>P. plecoglossicida</i> basadas en el modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de bootstrap calculado por el software MegaX. ....	40
<b>Figura 15.</b> Antagonismo in vitro de bacterias aisladas del tejido de la agalla de la corona en frambuesa contra <i>A. tumefaciens</i> . <i>Delftia</i> sp. (AAC2), <i>Alcaligenes faecalis</i> (AAC5) y <i>Pseudomonas citronenollis</i> (AAC9). 4 repeticiones (R1-R4). ....	42

<b>Figura 16.</b> Índice de eficiencia de antagonismo in vitro de <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Delftia sp.</i> y <i>Pseudomonas citronellolis</i> . *Diferencia significativa (Tukey $\alpha=0.05$ ) (p=0.0104).....	44
<b>Figura 17.</b> Severidad de tumores en plantas de jitomate var. ramsés a los 40 días con los antagonistas AAC5 ( <i>Alcaligenes faecalis</i> ), AAC2 ( <i>Delftia sp.</i> ), AAC9 ( <i>Pseudomonas citronenollis</i> ), CPS (Consorcio de <i>Pseudomomas spp.</i> ) Y <i>A. tumefaciens</i> . Inoculación de <i>A. tumefaciens</i> <b>A y C</b> ) herida en el cuello del tallo con masa bacteriana, <b>B y D</b> ) Suspensión con $1 \times 10^7$ UFC/mL en el sustrato. <b>D</b> ) Testigo sin inoculación. ....	46
<b>Figura 18.</b> Área infectada del tallo (mm) con la inoculación de <i>A. tumefaciens</i> + antagonistas. A) suspensión bacteriana con $1 \times 10^7$ en el sustrato. B) Herida y masa bacteriana en el cuello de la raíz.....	47
<b>Figura 19.</b> Densidad de poblaciones en unidades formadoras de colonias (UFC/g raíz) de antagonistas reaislados a los 7 dds en la raíz de jitomate var. ramsés. ....	48

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación del género <i>Agrobacterium</i> . .....	5
<b>Cuadro 2.</b> Determinación del biovar de seis cepas aisladas de agallas de frambuesa .....	27
<b>Cuadro 3.</b> Densidad de poblaciones de <i>Bacillus</i> spp. en tejido de la agalla en frambuesa a 70 y 80 °C. ....	32
<b>Cuadro 4.</b> Densidad de poblaciones de <i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas fluorescences</i> (UFC/g de tejido) en agalla en frambuesa. ....	33
<b>Cuadro 5.</b> Identificación molecular por amplificación parcial del gen 16s rADN de 13 cepas aisladas con mayor frecuencia del tejido de agalla de la corona en frambuesa .....	35
<b>Cuadro 6.</b> Ubicación taxonómica de cepas aisladas con mayor frecuencia del tejido de la agalla de la corona en frambuesa. ....	35
<b>Cuadro 7.</b> Índice de eficiencia de antagonismo (IEA) de bacterias aisladas de la agalla en frambuesa. *Diferencia significativa entre medias anova( $\alpha=0.05$ ), $p=0.00002023$ . el mayor índice de antagonismo se registró con <i>Alcaligenes faecalis</i> (AAC5), seguido de <i>Delftia</i> spp. (AAC2) y <i>Pseudomonas citronenollis</i> (AAC9). ....	43
<b>Cuadro 8.</b> Área infectada del tallo (mm) con la inoculación de <i>A. tumefaciens</i> por herida y suspensión bacteriana en el sustrato y la interacción con los antagonistas.....	47

## I. INTRODUCCIÓN

El género *Agrobacterium* se incluye dentro del orden Rhizobiales; las poblaciones dentro de este orden habitan en suelo y rizósfera donde establecen una relación de simbiosis con las plantas principalmente relacionado con la fijación de nitrógeno (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2015). *Agrobacterium* incluye especies tumorogénicas y no tumorogénicas. Las especies que causan tumores (agallas) en plantas se han clasificado en biovars con base en su metabolismo; el biovar 1 incluye a poblaciones de *Agrobacterium tumefaciens* y *A. radiobacter*, el biovar 2 a *A. rhizogenes* y el biovar 3 a *A. vitis*, las cuales causan enfermedad en un amplio rango de hospedantes de importancia económica en la agricultura. *A. tumefaciens* es la especie más importante como fitopatógeno, causa la enfermedad “agalla de la corona” por la transferencia e inserción del plásmido Ti (inductor de tumores) en el genoma de la planta hospedante. Las poblaciones de *A. vitis* se han diferenciado metabólicamente de la especie *tumefaciens* por causar la enfermedad agalla de la corona específicamente en vid (*Vitis vinifera* L.). *A. rhizogenes* patógenas induce proliferación anormal de raíces por la transferencia del plásmido Ri (inductor de raíces) y la especie *A. radiobacter* incluye poblaciones no patógenas, saprófitas que no albergan ninguno de los genes Ti y Ri (Martínez *et al.*, 1987; Escobar y Dandekar, 2003; Abrahamovich *et al.*, 2014; Barton *et al.*, 2018).

*A. tumefaciens* como fitopatógeno es de gran importancia económica en todo el mundo por su amplio rango de hospedantes. Se han identificado más de 1000 especies en aproximadamente 90 familias de plantas dicotiledóneas susceptibles a la infección que incluyen plantas leñosas frutales de importancia económica como manzano, peral, vid, cereza y nogal; así como ornamentales y en años recientes ha sido un patógeno importante en berries tanto en la producción en vivero como en cultivos en campo abierto (Escobar y Dandekar, 2003; Alippi *et al.*, 2011; Abrahamovich *et al.*, 2014; Nester, 2015; Ahmed *et al.*, 2018; Lacroix y Citovsky, 2019; Clarence, 2020).

La producción de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es un sector agrícola de gran importancia económica en México. La mayor producción se concentra principalmente en los estados de Sinaloa, Jalisco, México y Michoacán. Se estima que aproximadamente el 41% de la producción se exporta al mercado internacional. Asimismo, en el 2019 México se ubicó en el cuarto país como

productor de frambuesa a nivel mundial (SENASICA, 2019). En los últimos años, las infecciones por *A. tumefaciens* ha sido uno de los principales problemas fitosanitarios en la producción de plantas de frambuesa en vivero. El control químico ha sido ineficiente en el manejo de este patógeno (Anand *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2018).

El control biológico de fitopatógenos mediado por microorganismos benéficos es una alternativa que se ha estudiado intensamente en los últimos años, principalmente debido al uso intensivo de pesticidas químicos en la agricultura que impactan negativamente el medio ambiente. El uso de microorganismos eficientes en el control de patógenos en plantas puede ser una herramienta para reducir el uso de agroquímicos e integrar alternativas ecológicamente sustentables en el control de enfermedades (Johansson *et al.*, 2004; Landa *et al.*, 2006; Lenteren *et al.*, 2018; Köhl *et al.*, 2019; Saikia *et al.*, 2022). El control biológico con base en la competencia de espacio y nutrientes entre diversas poblaciones de microorganismos se ha estudiado en diferentes patosistemas. En nichos ecológicos específicos se han aislado e identificado cepas de bacterias cultivables que han mostrado alta eficiencia en la colonización y competencia contra microorganismos fitopatógenos (Penyalver *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2009; Hassani *et al.*, 2018; Barton *et al.*, 2018; Odesa *et al.*, 2018; Slama *et al.*, 2019).

Se consigna que la agalla de la corona inducida en plantas, es un nicho altamente específico para el desarrollo de las poblaciones bacterianas de *A. tumefaciens* (Gordon y Christie, 2014; Ahmed *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Durante la formación de la agalla, *A. tumefaciens* induce una transformación fisiológica en la planta hospedante y las células se especializan en la producción de nutrientes derivados de aminoácidos y azúcares llamados opinas; las opinas son compuestos de bajo peso molecular que sirven como fuentes de carbono y energía exclusivos para este patógeno, disminuyendo la competencia de otros microorganismos (Aloni y Ullrich, 2008; Deeken *et al.*, 2006). Otros compuestos que se han evidenciado en la formación de la agalla son auxinas, citocinas y ácido abscísico (Deeken *et al.*, 2006; Gohlke y Deeken, 2014). Sin embargo, aún cuando la agalla se considera un nicho altamente específico para el crecimiento de *A. tumefaciens*, que limita la competencia con bacterias de otras especies, es posible que pueden coexistir en el tejido de la agalla con otras bacterias con la capacidad de metabolizar opinas y sobrevivir en el mismo tejido. Estas poblaciones bacterianas podrían ser cepas nativas con alta capacidad de competencia y de interés como agentes de control biológico contra *A. tumefaciens*

para evita la infección o reducir la severidad de los síntomas u otras aplicaciones biotecnológicas; actualmente son escasas las investigaciones que aborden el estudio de microorganismos asociados al tejido de la agalla de la corona causados por *A. tumefaciens* ( Brencic y Winans, 2005; Faist *et al.*, 2016; Barton *et al.*, 2018; Gelvin, 2018); hasta donde sabemos, en México no existe ningún estudio sobre estas poblaciones bacterianas, ni su potencial como posible agente de control biológico de *A. tumefaciens*.

## II. OBJETIVOS Y HIPÓTESIS

### 2.1. Objetivo general

- Examinar la densidad bacteriana mediante aislamientos de bacterias nativas en la agalla de la corona en frambuesa para identificar potenciales bacterias antagonistas contra *Agrobacterium tumefaciens*

#### 2.2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar e identificar *Agrobacterium tumefaciens* aislado de tejido de agallas en frambuesa por amplificación del gen *VirD2*
- Identificar molecularmente mediante la amplificación del gen 16S rADN las cepas con mayor frecuencia de aislamiento de agallas y antagonistas contra *A. tumefaciens*
- Identificar bacterias nativas en la agalla de la corona antagonistas *in vitro* e *in vivo* contra *Agrobacterium tumefaciens*

### 2.2 Hipótesis

En el tejido de la agalla de la corona con especificidad para el crecimiento de *A. tumefaciens*, coexisten otras poblaciones bacterianas cultivables; entre estas bacterias se pueden identificar cepas que son antagonistas y protegen contra la infección de *A. tumefaciens* en planta.

#### 2.2.1 Hipótesis alternativa

En el tejido de la agalla de la corona con especificidad para el crecimiento de *A. tumefaciens*, coexisten otras poblaciones bacterianas cultivables; entre estas bacterias no se encuentran antagonistas que protegen contra la infección de *A. tumefaciens* en planta.

### III. REVISION DE LITERATURA

#### 3.1. Género *Agrobacterium*

El género *Agrobacterium* se ubica dentro de la familia Rhizobiaceae de las  $\alpha$ -proteobacterias (Cuadro 1). Son principalmente bacterias del suelo que colonizan sustratos y rizósfera, baciliformes, flageladas, gram negativas que tienen asociaciones con las plantas. Como habitantes naturales del suelo, pueden establecerse como saprófitas o patógenas bajo ciertas condiciones ambientales. Las agrobacterias son causantes de tumores conocidas como “agalla de la corona”, proliferación de tejido en la caña o “agalla de la caña”, y proliferación anormal de las raíces denominada “raíz de la hilacha”, resultado de la transferencia de plásmidos Ti (inductor de tumores) o Ri (inductor de raíces) en el genoma de la planta hospedante (Escobar y Dandekar, 2003; Velázquez *et al.*, 2010; Abrahamovich *et al.*, 2014).

**Cuadro 1.** Clasificación del género *Agrobacterium*.

Dominio	Bacteria
Filo	Protobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rhizobiales
Familia	Rhizobiaceae
Género	<i>Agrobacterium</i>

Fuente: Schoch *et al.*, 2020

Se han determinado tres biovares dentro del género *Agrobacterium* por sus características metabólicas; en el biovar 1 se incluyen cepas de *A. tumefaciens* y *A. radiobacter*, en el biovar 2 de *A. rhizogenes* y en el biovar 3 de *A. rubi*; todas las cepas entre las diferentes especies de *Agrobacterium* comparten ciertas características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas; así mismo, la presencia de los plásmidos Ti o Ri entre ellas determinan la capacidad de causar enfermedad en la planta hospedante; en contraste, las poblaciones saprófitas de *Agrobacterium* no albergan ninguno de estos plásmidos (Alippi *et al.*, 2011; Flores-Félix *et al.*, 2020).

El género *Agrobacterium* es de gran interés para la ingeniería genética debido a su capacidad de insertar genes de manera horizontal de procariontes a eucariontes por lo cual se considera una herramienta genética de importancia para la investigación biotecnológica (Krenek

*et al.*, 2015; Lacroix y Citovsky, 2019; Xu *et al.*, 2021). Sin embargo, como fitopatógeno sigue siendo relevante; se reportan aproximadamente 90 familias de plantas dicotiledóneas susceptibles a la infección por este patógeno ocasionando pérdidas económicas importantes sobre todo en viveros donde se producen plantas frutales, ornamentales, hortalizas y forestales disminuyendo drásticamente la producción (Abrahamovich *et al.*, 2014). Las infecciones por *Agrobacterium* no causa la muerte de la planta; sin embargo, afectan el desarrollo y reducen considerablemente la productividad de frutos por la desviación de nutrientes y alteraciones en la vascularización del tejido (Escobar y Dandekar, 2003; Yang *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018).

Las especies fitopatógenas de *Agrobacterium* requieren de factores de virulencia para infectar y colonizar el tejido del hospedante susceptible; la virulencia de estas especies se atribuye a la presencia y expresión de los plásmidos Ti (inductores de tumores) y Ri (inductores de proliferación anormal de raíces) (Gelvin, 2003; Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). Las cepas que carecen de estas regiones genéticas corresponden a especies saprófitas que colonizan tejido vivo y pueden mantenerse en el suelo por largos periodos de tiempo. También, se ha demostrado que las especies de *Agrobacterium* saprófitas, bajo ciertas circunstancias de competencia, pueden ser fitopatógenas por la adquisición del plásmido Ti o Ri por transferencia genética horizontal de una célula donadora y una receptora (Gelvin, 2018). En las infecciones causadas por *Agrobacterium* se destaca especialmente el sistema de secreción tipo IV, el cual lo utiliza para la transferencia del plásmido Ti o Ri al cromosoma de las células de la planta hospedante; además, le confiere la capacidad de sobrevivir y evadir los sistemas de defensa de las plantas por la degradación de diferentes compuestos fenólicos. Las infecciones causadas por especies de *Agrobacterium* son denominadas colonizaciones genéticas al insertar el plásmido Ti o Ri directamente en el genoma de la planta para modificar la actividad hormonal del hospedante, y promover un microambiente específico que favorecen su desarrollo y sobrevivencia, así como evadir la competencia de otros microorganismos en el tejido (Gohlke y Deeken, 2014; Gonzalez-Mula *et al.*, 2019).

### **3.2. *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* es un microorganismo habitante natural de los suelos y de la rizosfera, gram negativa, baciliforme, flagelada; dentro de las  $\alpha$ -proteobacterias de la familia *Rhizobiaceae*. *A. tumefaciens* es la especie fitopatógena más importante y de mayor rango de

hospedantes dentro del género, causa la enfermedad conocida como “agalla de la corona” (Escobar y Dandekar, 2003; Velazquez *et al.*, 2010; Yaakov *et al.*, 2017).

*A. tumefaciens* como especie es una bacteria fitopatógena agente causal de tumores (agalla de la corona) mediado por la transferencia e integración del plásmido Ti (inductor de tumores) en el genoma del hospedante alterando el crecimiento y producción de nutrientes. Por lo anterior, se considera que la patogenicidad de esta especie se debe a la presencia del plásmido-Ti en las poblaciones bacterianas. Durante la inducción del tumor, un segmento específico de ADN del plásmido Ti, se transfiere y se integra en el genoma de la planta susceptible. Se reporta que *A. tumefaciens* es inductora de tumores en más de 1000 especies de plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas. Su rango de hospedantes incluye cultivos de gran importancia económica entre los que se encuentran frutales como la vid, el manzano, perales, nogales, ornamentales como las rosas, crisantemos y margaritas, y actualmente diversas especies de berries. En la producción de plántulas en vivero actualmente se considera un problema fitosanitario de importancia (Escobar y Dandekar, 2003; Pulawska, 2010; Clarence, 2020). La enfermedad agalla de la corona ocasiona la muerte en plantas jóvenes; en plantas adultas se relaciona directamente con la reducción del rendimiento y vigor de los cultivos (Escobar y Dandekar 2003; Barton *et al.*, 2018).

### **3.3. Plásmido Inductor de tumores Ti**

El plásmido Ti en el genoma de *A. tumefaciens* codifica para el proceso de infección y colonización del hospedante, el tamaño se encuentra entre 150 y 250 kb, está compuesto por una molécula circular de ADN de doble cadena cerrada; este plásmido alberga un conjunto de genes que determina la capacidad patogénica de *A. tumefaciens*. Para que se active la fase virulenta entre las especies de *Agrobacterium* se requiere la percepción química de compuestos fenólicos producidos por la célula vegetal por las poblaciones bacterianas desencadenando la expresión de los genes de virulencia que alberga el plásmido Ti. Las principales funciones del plásmido Ti están asociadas con la replicación y el mantenimiento de la información genética, la transferencia de genes de virulencia, comunicación celular con las células del hospedante; así mismo, permite la modificación de tejidos por un proceso de hipertrofia mediado por fitohormonas. En este tejido, ocurre la síntesis de opinas que son aminoácidos para la asimilación específica de las poblaciones de *A. tumefaciens* (Gordon y Christie, 2014; Lacroix y Citovsky, 2019).

Entre las poblaciones de *A. tumefaciens*, el plásmido Ti tiene diferencias estructurales y funcionales; lo anterior promueve la síntesis de diferentes tipos de aminoácidos (opinas) entre las cuales se han identificado diferentes grupos de octopinas, nopalinas, agropinas, manopinas, entre otros, que sirven como fuentes de carbono y nitrógeno; por lo tanto, se considera que el plásmido Ti juega un papel importante en patogenicidad y la colonización exitosa del tejido de la planta hospedante (Chen, 2021).

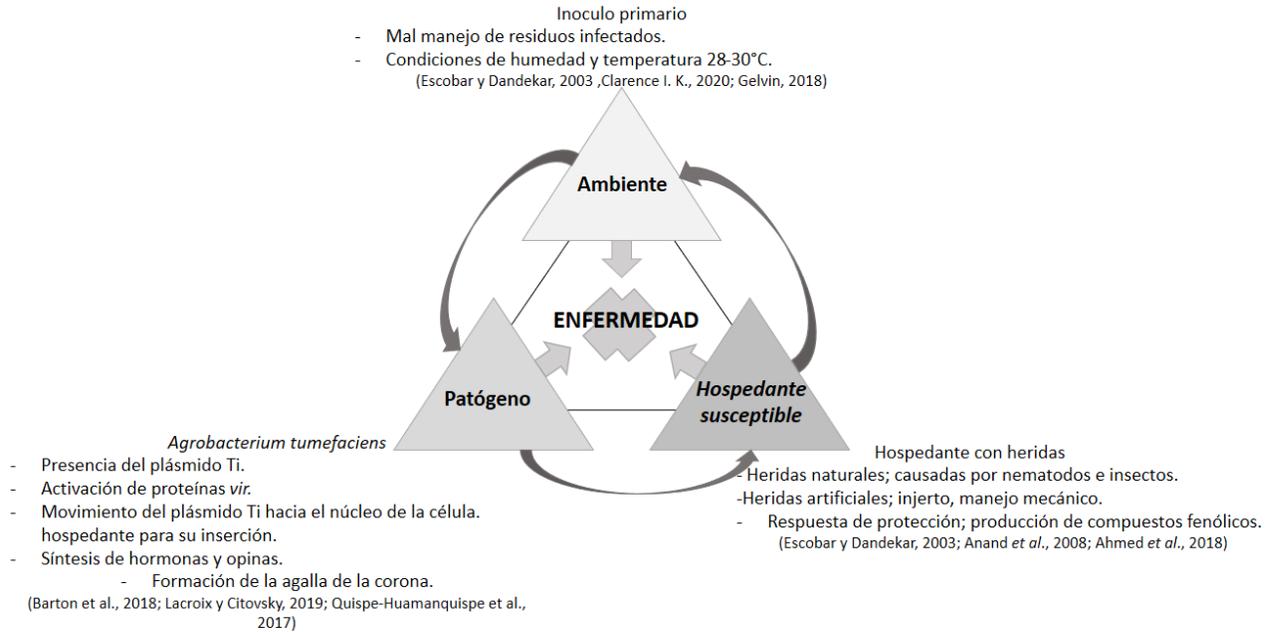
### **3.4. Proceso de infección por *A. tumefaciens***

Las cepas de *A. tumefaciens* albergan un cromosoma circular y material extra cromosomal donde se incluye el factor de virulencia inductor de tumores (plásmido Ti) capaz de iniciar el proceso de infección a través de la escisión y transferencia del plásmido. El plásmido Ti contiene las instrucciones para el movimiento de ADN hacia el núcleo de la célula y los factores de virulencia; así como la información para producir proteínas que intervienen con la transducción de señales y el transporte de información dentro de la célula que finalizan con la modificación morfológica y fisiológica del hospedante (Tzfira y Citovsky, 2000; Lacroix y Citovsky, 2019; Xu *et al.*, 2021).

Para que inicie el proceso de infección, primero debe ingresar a una planta susceptible, lo cual ocurre principalmente a través de heridas causada por insectos, nematodos o por daños mecánicos como injertos y podas (Anand *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2018). Como respuesta a una herida, la planta produce compuestos fenólicos y otros quimioatrayentes bacterianos que favorecen la atracción, colonización e inserción del plásmido Ti (Ahmed *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). Los compuestos fenólicos son fundamentales en el proceso de infección, su dualidad como defensa-atrayente favorece la adhesión bacteriana a la célula vegetal y la consecuente inserción de genes de virulencia regulados por el plásmido Ti. Entre los compuestos fenólicos que favorecen la colonización se identifican la acetosiringona y el ácido parahidroxibenzoico que atraen y favorecen la inserción de factores de virulencia como los genes *VirA*, expresados en *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* y *A. rubi* (Bhattacharya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019).

Al inicio del proceso de infección, la bacteria produce sustancias que le permitan adherirse a la célula a través de una red de transporte compuesta por las proteínas *VirB*; esta red induce el ingreso de los genes bacterianos hacia la célula hospedante y la activación de pilus, los cuales

inducen la comunicación de las células bacterianas a las células vegetales formando un canal de entrada e inicio del proceso de infección ( Tzfira y Citovsky, 2000; Barton *et al.*, 2018; Gelvin, 2018). Para que ocurra la enfermedad, se han identificado la interacción de diversos factores de patogenicidad por las poblaciones de *A. tumefaciens*, medio ambiente y manejo (Figura 1).



**Figura 1.** Triángulo de la enfermedad de *Agrobacterium tumefaciens*.

Durante la infección, *A. tumefaciens* activa los genes *vir* que alberga el plásmido Ti; el receptor conocido como *VirA* inicia el proceso infectivo; transfiere un fosfato a la proteína *VirG* que estimula y activa las demás proteínas de virulencia iniciando con la formación de un complejo de transferencia en el que se involucra el sistema de secreción tipo IV. Las proteínas *VirD1* y *VirD2* inician con la síntesis de un fragmento de ADN monocatenario (cadena T) e instalación en el núcleo de la célula hospedante (Escobar y Dandekar, 2003; Gelvin, 2017). El plásmido Ti adherido a la proteína *VirD2*, más un complejo de proteínas efectoras como es *VirD5*, *VirE2*, *VirE3* y *VirF* permiten transportar el material genético fuera de la célula mediante el sistema de secreción tipo IV. Una vez integrado el plásmido Ti en el genoma vegetal, se desencadena una serie de procesos moleculares regulados principalmente por proteínas codificadas en el plásmido Ti, que inducen a la planta a sintetizar compuestos específicos para su desarrollo y modificar los procesos normales de síntesis de las fitohormonas, para iniciar con un proceso de crecimiento celular que dará paso a la formación de la agalla y de un nicho específico completamente diseñado para el

desarrollo de *A. tumefaciens* (Gelvin, 2009; Gordon y Christie, 2014; Ahmed *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021).

Los oncogenes presentes en el plásmido Ti son responsables de modificar el comportamiento de las células del hospedante, el primer grupo de genes envía señales para el aumento en la producción de auxinas y citosinas, estas inducen la proliferación celular que da origen a la formación de la agalla; el segundo grupo de genes induce la producción de opinas que son compuestos de bajo peso molecular utilizados específicamente por *Agrobacterium*; estas opinas juegan un papel ecológico importante ya que promueven un ambiente altamente específico el cual se considera tóxico para otras bacterias oportunistas, favorece la expresión de factores de virulencia aumentando drásticamente las poblaciones de bacterias patógenas, promueve un aumento en la comunicación bacteriana y la futura diseminación a nuevos hospedantes, así como una presencia constante en la rizósfera y suelo (Gelvin, 2018; Gonzalez-Mula *et al.*, 2019).

### **3.5. Agalla de la corona**

La agalla de la corona es el resultado de una serie compleja de transporte de moléculas hacia el ADN de la planta hospedante; puede definirse como un proceso similar al de los tumores animales, pero a diferencia de estos no ocurre por un proceso de divisiones celulares descontroladas sino por la regulación genética mediada por el plásmido Ti. La formación de la agalla tiene como consecuencia un desvío del flujo de agua y nutrientes en la planta que causan reducción del crecimiento, deformidades y una baja productividad de frutos (Aloni y Ullrich, 2008; Tzfira y Citovsky, 2000).

La agalla es la modificación de tejido y de producción de nutrientes que permite el desarrollo de un nicho específico para el crecimiento de *A. tumefaciens*. Entre las modificaciones inducidas está la producción de fitohormonas que favorece la modificación de los haces vasculares (Gelvin, 2009); el floema y xilema están conectados a la agalla para mantener un flujo constante y abundante de agua. Este proceso es la consecuencia del aumento en la producción de auxinas y citocinas esenciales para el desarrollo de la agalla. Otra de las consecuencias es la alteración de la epidermis y cutícula que permite la transpiración de la agalla (Aloni y Ullrich, 2008). Las auxinas se secuestran dentro del tejido de la agalla para favorecer el desarrollo de un sistema vascular hacia el tejido modificado, que resulta en la producción excesiva de flavonoides que a su vez mantiene

altas concentraciones de citocinas. Estas hormonas permiten la concentración de etileno que aumenta las concentraciones de ácido abscísico en el tumor y las hojas del hospedante, lo cual favorece el paso de agua hacia la agalla. El ácido abscísico se concentra en la periferia de la agalla y permite la acumulación de sacarosa y prolina que evitan la desecación del tumor; aumenta la expresión de canales de K<sup>+</sup> y una disminución de los transportadores de aniones por lo que depende del xilema para importar nutrientes (Aloni y Ullrich, 2008; Gonzalez-Mula *et al.*, 2019). Otro grupo de genes que alberga el plásmido Ti codifican para la producción de nutrientes específicos conocidos como opinas, la cual es la principal fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo de *A. tumefaciens* (Ridé *et al.*, 2000; Aloni y Ullrich, 2008; Gelvin, 2009).

La agalla causada por *A. tumefaciens* se considera el diseño de un nicho altamente específico que le aporta grandes ventajas como colonizador eficiente. *A. tumefaciens* es un microorganismo que habita el suelo, pero como patógeno puede colonizar una planta hospedante e inducir la agalla de la corona el cual es un hábitat específico para su ciclo de vida (Gordon y Christie, 2014; Ahmed *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019). La especificidad de este hábitat se basa en la síntesis de opinas que son compuestos de bajo peso molecular que son las fuentes de carbono y aminoácidos específicos para el metabolismo y colonización en altas densidades de las poblaciones de *Agrobacterium*. Así mismo, se ha determinado que en la agalla existen otros compuestos orgánicos y minerales producidos por la planta hospedante; se consigna que tanto las opinas específicas y estos compuestos producidos por la planta podrían permitir el desarrollo en la agalla de algún otro microorganismo, pero en menor densidad de población. Para *A. tumefaciens* este nicho específico le permite disminuir la capacidad de defensa de la planta hospedante, evadir la competencia contra otros microorganismos bacterianos y fúngicos, promover la comunicación entre poblaciones de la especie y finalmente la transferencia horizontal de genes de virulencia (Deeken *et al.*, 2006; Aloni y Ullrich, 2008). Por lo tanto, la formación de la agalla de la corona es el resultado de la transformación genética en la que ocurren cambios en la expresión génica, metabólica y morfológica. Durante el desarrollo de la agalla se estimula genéticamente la expresión controlada de las fitohormonas auxinas y citocinas, las cuales inducen el crecimiento en tamaño y cantidad de las células de la agalla; otra de las modificaciones en el tejido es la formación de vascularización que permite la llegada de nutrientes a la agalla. También, investigaciones previas demostraron que en la agalla se producen grandes cantidades de ácido abscísico y enzimas

que evita la pérdida de líquidos y la desecación de la agalla (Deeken *et al.*, 2006; Gohlke y Deeken, 2014).

### **3.6. Opinas**

La colonización genética mediada por *A. tumefaciens* favorece la transformación fisiológica de la planta, las células se especializan en la producción de compuestos derivados de aminoácidos y azúcares llamados opinas, las cuales sirven como fuentes de carbono y energía. Entre las poblaciones de *A. tumefaciens* la producción de opinas es diferente, ya que no todas las especies inducen la síntesis de las mismas opinas; se conoce que la síntesis de algunos tipos de opinas está influenciado por la especie del hospedante y las condiciones ambientales (Szegedi *et al.*, 1988; Aloni y Ullrich, 2008; Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017;). Se han descrito aproximadamente 20 tipos de opinas con una composición química diferente por el tipo de azúcar o aminoácido. Por ejemplo, las octopinas están formadas por una reducción de piruvato con arginina o lisina, nopalina y manopina; cada tipo de opina está compuesta por proteínas especialmente reguladas para su producción, estas proteínas inducen la transcripción de los genes necesarios para su asimilación y catabolismo. Las opinas no solo cumplen un papel nutricional, sino que también están involucradas en el transporte del plásmido Ti; por lo anterior, las opinas se han considerado como moléculas de señalización en este patosistema. Las especies de *Agrobacterium* que albergan el plásmido Ti pueden producir nopalinas, agrocipinas y octopinas; estas opinas son quimioatrayentes para otras poblaciones de bacterias dentro del género *Agrobacterium* que albergan el plásmido Ti, por lo cual se consideran específicas (Szegedi *et al.*, 1988; Aloni y Ullrich, 2008; Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). Sin embargo, se postula que las opinas también pueden ejercer una presión ambiental para el desarrollo de especies bacterianas diferentes al género *Agrobacterium* por bacterias con la capacidad de transformar estos mismos compuestos y colonizar la agalla de la corona (Brencic y Winans, 2005).

### **3.7. Ecología microbiana en la agalla de la corona**

Las interacciones entre microorganismos dependen estrechamente de factores bióticos y abióticos. *Agrobacterium*, como parásito facultativo, inicia un proceso de infección que modifica las condiciones micro ambientales bióticas y abióticas que influyen el hospedante; como resultado de la infección en la planta, ocurre una reprogramación fisiológica por la inserción del

plásmido Ti, alterando completamente la dinámica establecida con otros microorganismos presentes o cercanos al nuevo nicho (agalla). Se sabe que las bacterias con las que convive y comparte este nicho de forma inter e intra específica pueden atribuirle o limitar su potencial de virulencia a *Agrobacterium* spp. La formación de la agalla de la corona y la cantidad de poblaciones bacterianas diferentes al género se consideran limitadas y diferenciadas dependiendo de los compuestos fenólicos y azúcares específicos del hospedante. Se postula que la falta de nitrógeno y fósforo, y las condiciones hipóxicas de la agalla de la corona pueden limitar el crecimiento de bacterias fuera del género *Agrobacterium* y que solo bacterias con la capacidad de metabolizar opinas podrían convivir y sobrevivir en este nicho altamente específico. El análisis de estas poblaciones bacterianas que habitan en la agalla de la corona sigue siendo desconocido (Barton *et al.*, 2018; Gelvin, 2018). Sin embargo, estas poblaciones de bacterias que crecen en un nicho altamente específico, como lo es la agalla de la corona, podrían ser también cepas con alta capacidad de competir por nutrientes con poblaciones de *A. tumefaciens* (Faist *et al.*, 2016; Barton *et al.*, 2018).

### **3.8. Manejo de *A. tumefaciens***

*A. tumefaciens* ha causado pérdidas económicas considerables en viveros de árboles frutales, frutillas y plantas ornamentales (Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017). Esta bacteria quizás es la que incluye un mayor rango de hospedantes dicotiledóneas a diferencia de otras bacterias fitopatógenas y su rango de hospedantes continúa extendiéndose infectando especies de plantas anteriormente no identificados como es el caso de *Hibiscus* sp. (Chen *et al.*, 2022). En diferentes sistemas de producción, el manejo de técnicas de injertos o podas han sido importantes para que *A. tumefaciens* colonice con eficiencia los cultivos principalmente en viveros (Escobar y Dandekar, 2003; Anand *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2018). Actualmente, se ha incrementado la incidencia y severidad de *A. tumefaciens* en diversas especies de frutillas en México, principalmente en plántulas producidas en vivero, ya que el control químico ha sido ineficiente en el manejo de este patógeno (Anand *et al.*, 2008; Ahmed *et al.*, 2018).

*A. tumefaciens* requiere estrictamente de una herida para establecerse y causar infección en su planta hospedante, por lo que las medidas de control son preventivas. Entre las medidas más utilizadas para evitar la infección está el uso de material vegetal de propagación libre del patógeno, eliminar plantas con síntomas, evitar el uso de suelos contaminados con el patógeno, deficientes

técnicas de injerto, heridas mecánicas en viveros principalmente durante las prácticas culturales, así como el control de insectos y nematodos que pueden causar heridas en raíces. Son pocos los ingredientes activos eficientes para el manejo de la enfermedad; en algunos casos, el control biológico ha sido eficiente mediado por el uso de cepas avirulentas en formulaciones con la cepa *A. radiobacter* K84 la cual se encuentra disponible en el mercado (Escobar y Dandekar, 2003; Anand *et al.*, 2008; Peñalver *et al.*, 2018). *A. tumefaciens* se disemina a partir de plantas infectadas, la bacteria puede sobrevivir en el suelo y diseminarse también a través del agua, o manualmente con herramientas de corte o equipo de labranza infectados. (Barton *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

En los últimos años, el desarrollo de investigaciones sobre antagonistas microbianos nativos en diferentes nichos ecológicos ha tomado relevancia como una alternativa de manejo (Agrimundo, 2019). Las comunidades bacterianas nativas en nichos ecológicos específicos se consideran una fuente importante de nuevos aislamientos para el control biológico mediado por la producción de compuestos antimicrobianos, competencia de nutrientes y espacio, promoción del crecimiento e inducción de resistencia de plantas (Silva *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2007; González y Fuentes, 2017; Barton *et al.*, 2018; Köhl *et al.*, 2019; Saikia *et al.*, 2022).

### **3.9. Interacción bacteria-planta-ambiente**

Las interacciones biológicas entre bacterias-planta-ambiente generan micro-ecosistemas que pueden determinar el equilibrio entre la salud de la planta y la sobrevivencia bacteriana. Las bacterias pueden tener funciones benéficas en la planta, protección contra patógenos y protección contra el estrés producido por diversos factores abióticos. El estudio de estas interacciones puede generar conocimiento sobre poblaciones bacterianas en nichos ecológicos específicos que pueden ser usados como alternativas de biocontrol en el manejo de bacterias fitopatógenas de importancia económica (Johansson *et al.*, 2004; Brencic y Winans, 2005; Brown *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015; Barton *et al.*, 2018; Karimi *et al.*, 2018).

La estructura y la diversidad de poblaciones bacterianas definen gran parte la ecología microbiana en diversos ambientes; por ejemplo, la gran biodiversidad de los suelos puede establecer su funcionalidad para suelos agrícolas y el desarrollo de ciertas especies de plantas. Las poblaciones de microorganismos y la compleja red de comunicación mediada por compuestos químicos pueden favorecer la expresión de genes de virulencia, influir en la efectividad de

colonización y también podría jugar un papel importante en el desarrollo de poblaciones específicas con alta competencia que favorecería el control biológico de *A. tumefaciens* (Loh *et al.*, 2002; von Bodman *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2010).

La necesidad de estudiar las poblaciones bacterianas nativas en la agalla de la corona se basa en el diseño altamente específico para el desarrollo de esta transformación de tejido (Antunes *et al.*, 2010). Aunque el diseño de la agalla de la corona tiene como finalidad formar un nicho altamente específico, se conoce que la producción de opinas y los procesos de fermentación que ocurren durante su formación; pueden promover la colonización y establecimiento de otro tipo de microorganismos con capacidad de asimilar las opinas específicas producidas en la agalla de la corona. Estas bacterias pudieran ser altamente competitivas como antagonistas contra *A. tumefaciens* (Barton *et al.*, 2018; Faist *et al.*, 2016; Gelvin, 2018). Hasta donde sabemos, en México aún no hay estudios sobre las poblaciones bacterianas nativas en tejido de la agalla de la corona causado por *A. tumefaciens*.

### **3.10. Control biológico**

El control biológico de fitopatógenos mediado por microorganismos benéficos es una alternativa que se ha estudiado intensamente en los últimos años, principalmente debido al uso intensivo de pesticidas químicos en la agricultura que impactan negativamente el medio ambiente. El uso de microorganismos eficientes en el control de patógenos en plantas puede ser una herramienta eficiente para reducir el uso de agroquímicos e integrar alternativas de manejo de enfermedades en plantas ecológicamente sustentables (Johansson *et al.*, 2004; Landa *et al.*, 2006; Lenteren *et al.*, 2018).

La interacción entre un agente de control biológico (ACB) – planta – patógeno, implica la expresión de diferentes mecanismos fisiológicos de cada componente para que ocurra el control eficiente; se han estudiado diversos procesos fisiológicos con los ACB relacionados con el control de patógenos como la antibiosis por metabolitos primarios y secundarios, inducción de resistencia y promoción de crecimiento en las plantas, así como competencia por nutrientes y espacio en un nicho ecológico específico (Köhl *et al.*, 2019). El control biológico con base en la competencia de espacio y nutrientes entre diversas poblaciones de microorganismos se ha estudiado en diferentes patosistemas. En nichos ecológicos específicos se han aislado e identificado cepas de bacterias

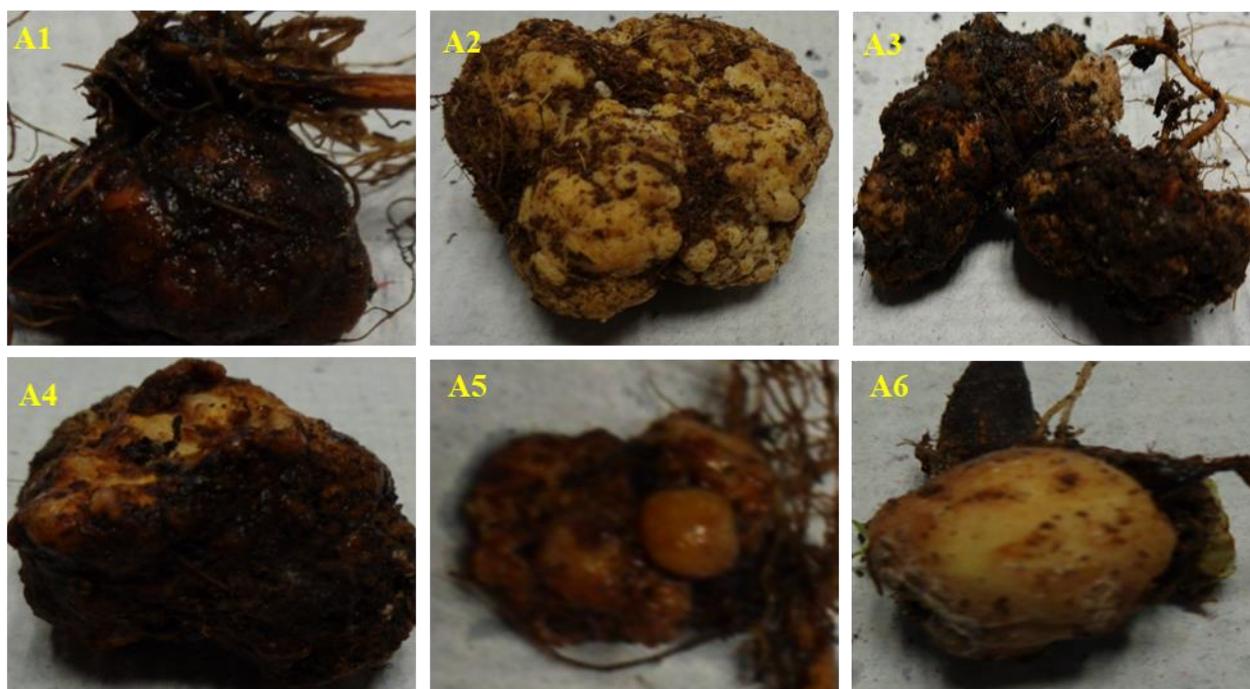
cultivables que han mostrado alta eficiencia en la colonización y competencia contra microorganismos fitopatógenos (Penyalver *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2009; Barton *et al.*, 2018).

En el patosistema de *A. tumefaciens* durante el desarrollo del tumor (agalla), las células oncogénicas sintetizan opinas que son utilizadas como fuente de carbono, nitrógeno y energía por las poblaciones patógenas de *A. tumefaciens*, creando un nicho ecológico altamente específico y reduciendo la competencia de la mayoría de otros microorganismos que no son capaces de utilizar estas opinas como fuente de energía (Deeken *et al.*, 2006; Aloni y Ullrich, 2008). Sin embargo, es posible que algunas poblaciones de microorganismos puedan coexistir con *A. tumefaciens* por su habilidad de utilizar las opinas específicas (Gordon y Christie, 2014; Ahmed *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), así como otros compuestos identificados que se producen en el tejido del tumor (Deeken *et al.*, 2006; Gohlke y Deeken, 2014). Estas poblaciones bacterianas podrían ser de interés en estudios de control biológico contra *A. tumefaciens* para evitar la infección o reducir la severidad de los síntomas, así como otras futuras aplicaciones biotecnológicas. En México no existe ningún estudio sobre estas poblaciones bacterianas, ni su potencial como posible ACB de *A. tumefaciens* *in vitro* e *in vivo*.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal de frambuesa con síntomas de agalla de la corona

En marzo y agosto del 2020, se recibieron seis muestras de agallas desarrolladas en plantas de frambuesa var. elvira provenientes de viveros de Driscoll's Tlaxcala, México. Las agallas recolectadas fueron de diferente tamaño y color blanquecino (tejido no lignificado) y se mantuvieron en una hielera con bolsas plásticas para su traslado al laboratorio. Las agallas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 20% durante 2 min; después, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron en papel absorbente durante 5 min (Figura 2).



**Figura 2.** Muestras de agalla de la corona de frambuesa var. Elvira con diferentes estados de lignificación; el tejido blanco indica que la agalla se encuentra en un estado inicial de desarrollo.

### 4.2 Aislamiento e identificación de *Agrobacterium tumefaciens*

El aislamiento de *A. tumefaciens* se realizó a partir del tejido de la periferia de la agalla; de cada agalla se utilizó 1 g de tejido que se colocó en agua destilada estéril durante 30 min para permitir la difusión bacteriana. Después, se sembraron 20  $\mu$ l en medio de cultivo D1-M (Schaad *et al.*, 2000; Alippi *et al.*, 2011) y se incubaron a 28 °C durante 72 h. A partir del crecimiento bacteriano se reaislaron y purificaron seis colonias (una por agalla de cada planta de frambuesa)

con morfología de crecimiento redondas, mucoides, brillantes a la luz, de color azulado en el medio D1-M, la cual es una característica descrita para *A. tumefaciens*, a las 48 h de crecimiento a 28 °C (Alippi *et al.*, 2011). Las cepas aisladas se preservaron en cultivo criogénico en caldo nutritivo y glicerol (40% v/v).

#### **4.2.1. Caracterización bioquímica y determinación del biovar de *A. tumefaciens***

La caracterización de las cepas aisladas se realizó por el método descrito por Schaad *et al.*, (2000). La caracterización bioquímica incluyó: reducción de nitratos, hidrólisis de arginina, producción de levana, utilización de citrato, eritritol, dulcitol, sacarosa, melezitosa y álcalisis a partir de ácido L-tartárico. La utilización de fuentes de carbono se realizó en microplaca por el método descrito por Cubero y Lopez (2001).

#### **4.2.2. Pruebas de patogenicidad *in vitro* e *in vivo* de *A. tumefaciens***

Para evaluar la patogenicidad de las bacterias aisladas a partir de las agallas se utilizaron rodajas de zanahoria (Schaad *et al.*, 2000); las zanahorias se seleccionaron por su frescura y corto periodo de almacenamiento; en todas ellas, se eliminó el tejido de la epidermis y se lavaron tres veces con alcohol al 95%, seguido de tres lavados con agua destilada estéril; posteriormente, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1% durante 15 min y se realizaron tres últimos lavados con agua destilada estéril. Las zanahorias se cortaron en rodajas de 5 mm de grosor y se inocularon en el centro de las mismas con 100 µl de una suspensión bacteriana acuosa con  $1 \times 10^7$  UFC/mL de cada cepa bacteriana y se incubaron durante tres semanas en cámara húmeda a 28 °C. Para las pruebas de patogenicidad *in vivo*, se utilizaron cinco plántulas de jitomate y girasol, las cuales son hospedantes naturales de *A. tumefaciens*, con dos semanas de crecimiento. La inoculación de cada cepa (n=6) en las plantas de ambas especies se realizó por dos métodos: 1) inoculación con masa bacteriana en una herida en el cuello del tallo producida al momento de la inoculación con un palillo de madera estéril, y 2) por inyección con jeringa en el cuello del tallo de 100 µl de una suspensión acuosa con  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Las cepas se inocularon con 48 h de crecimiento en medio cultivo agar nutritivo incubados a 28 °C. Las plantas inoculadas se cubrieron con una bolsa de plástico durante 48 h y se mantuvo una humedad constante durante dos meses en condiciones de laboratorio.

### 4.2.3. Secuenciación directa del gen *VirD2*

El ADN genómico de las seis cepas se obtuvo con el kit comercial Qiagen® Alemania. La concentración y calidad del ADN se verificó con un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Para la amplificación molecular se utilizaron los iniciadores específicos al gen *VirD2* A (5'-ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT-3') y C (5'-TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA-3') descritos por Haas *et al.*, (1995) que amplifica un fragmento de 224-338 pb. Se utilizó master mix prefabricado de la marca Promega, 12 µl de mastermix, 1 µl de cada primer (0.04 µM), 2 µl de ADN (concentración 100 ng/µl) y 8.5 µl de agua libre de nucleasas. La temperatura de termociclaje fue de 94°C durante 1 min, seguido de 40 ciclos de 94°C, 50°C y 72 °C durante 1 min cada una para finalizar con un ciclo a 72°C durante 5 min. Se almacenó a -4°C hasta su secuenciación.

La secuencia obtenida fue editada con el software Chromas, ensamblada con ayuda del software DNA Star. Adicionalmente, se realizó un análisis filogenético, se apoyó del software Mega-X Modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap y la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias se compararon en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI-National Center of Biotechnology Information), empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

### 4.3. Aislamiento de poblaciones bacterianas cultivables totales de la agalla de la corona

De cada agalla (n=6), se cortaron trozos de 1 g de tejido y se colocaron en un matraz con 5 ml de agua destilada estéril; la suspensión se mantuvo en reposo durante 30 min para permitir la difusión bacteriana. De esta suspensión, se realizaron diluciones en serie desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-3</sup> de las seis muestras y se sembraron 100 µl de cada dilución con tres repeticiones en medio de cultivo agar nutritivo y agar R2A. Las placas sembradas se incubaron a 28°C durante 48 h. Las colonias bacterianas totales se observaron a las 48 h de crecimiento en un microscopio estereoscópico con luz oblicua para identificar diferencias en los morfotipos bacterianos aislados. Los morfotipos se purificaron y preservaron en cultivo criogénico en caldo nutritivo y glicerol (40% v/v) a -20°C hasta su uso. Así mismo, se seleccionó la dilución en serie que permitió el conteo entre 30 y 300 colonias y se calculó la densidad bacteriana total expresado en UFC/g de tejido de agalla. La

densidad de poblaciones bacterianas totales se estimó por conteo directo en placa (Forbes, 2009) con un crecimiento de 48 h con la fórmula:

$$\frac{UFC \times VS \times FD}{P}$$

Dónde:

UFC= Unidades formadoras de colonias

VS= volumen sembrado

FD= Factor de dilución utilizado

P= Peso de tejido

#### **4.3.1. Aislamiento de poblaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. de la agalla de la corona**

Para el aislamiento de poblaciones de *Bacillus* spp. se utilizó la suspensión inicial descrita anteriormente de cada muestra de agalla (1 g de tejido de agalla en 5 ml de agua destilada estéril y reposo por 30 min). De cada muestra de agalla (n=6), se utilizaron tubos con 2 mL de la suspensión bacteriana y se expusieron en baño maría a 70 y 80 °C durante 7 y 5 min respectivamente en tratamientos independientes para inducir la esporulación y prevalencia de *Bacillus* spp. Después, se sembraron 100 µl de la suspensión bacteriana de cada tubo en medio agar R2A y se incubaron a 28°C durante 48 h. Las colonias bacterianas se observaron en un microscopio estereoscópico con luz oblicua para identificar diferencias entre morfotipos de *Bacillus* spp. a las 24 y 48 h después de la siembra. Los diferentes morfotipos de *Bacillus* spp. se purificaron y preservaron en cultivo criogénico en caldo nutritivo y glicerol (40% v/v) a -20°C. Se calculó la densidad total y se expresó en UFC/g de tejido de agalla con el mismo método anteriormente descrito. Para el aislamiento de poblaciones de *Pseudomonas* spp. se utilizó la técnica de cultivo en microplaca (96 pozos) con medio caldo B de King (BK) suplementado con ampicilina, cloranfenicol y cicloheximida (Landa *et al.*, 2006). En cada pozo, se colocaron 200 µl del medio caldo BK; después, en la primera columna se inocularon 100 µl de la suspensión bacteriana (1 g de tejido de agalla en 5 ml de agua destilada estéril y reposo por 30 min); a partir de esta columna, se tomaron 100 µl y se realizaron diluciones seriadas hasta la columna 12 de la microplaca; se utilizó una microplaca por muestra de tejido de agalla (n=6). Las microplacas se incubaron a 28°C durante 72 h; después, se observaron bajo luz ultravioleta (260 nm) para la detección de pigmentos fluorescentes. De los pozos con mayor fluorescencia de cada microplaca,

se sembraron 20 µl en medio BK agar suplementado con antibióticos y se incubaron a 28°C durante 72 h. Los diferentes morfotipos de *Pseudomonas* spp. se purificaron y preservaron en cultivo criogénico en caldo nutritivo y glicerol (40% v/v) a -20°C. Se calculó la densidad total y se expresó en UFC/g de tejido de agalla con el mismo método anteriormente descrito.

#### **4.4. Antagonismo de bacterias aisladas de la agalla contra *A. tumefaciens***

##### **4.4.1. Antagonismo *in vitro***

De las seis agallas de frambuesa se aislaron 86 cepas bacterianas. Se evaluó el antagonismo *in vitro* de las bacterias (n=86) contra *A. tumefaciens* patógeno identificado por la amplificación y secuenciación del gen *VirD2* (No. Acceso LC052332.1). Las bacterias se sembraron en microplacas de 96 pozos con 200 µL de caldo nutritivo y se incubaron a 28°C durante 48 h. El antagonismo se evaluó por cultivo dual *in vitro* en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio de cultivo agar nutritivo. Las placas se inocularon por extensión en la superficie del medio con 250 µL de una suspensión acuosa de *A. tumefaciens* con 1x10<sup>7</sup> UFC/mL y se mantuvieron en reposo durante 30 min hasta la completa absorción de la suspensión en el medio de cultivo. Después, las bacterias se inocularon con un inoculador multipunto (Boekel®, microplate replicator 96 puntos) permitiendo la inoculación simultánea de las 86 bacterias y se incubaron a 28 °C por 72 h. Posteriormente se reaislaron las cepas bacterianas que mostraron algún grado de antagonismo (halo de inhibición del crecimiento bacteriano) contra *A. tumefaciens*. El antagonismo se evaluó con cuatro repeticiones en ensayos independientes para la comparación de medias ANOVA. Con los datos del halo de inhibición (mm) se calculó el Índice de Eficiencia Antagonista (IEA) por el método descrito por Abou El-Yazeid *et al.*, (2007):

$$IEA = \frac{\text{Área del halo}}{\text{Área de la colonia}}$$

##### **4.4.2. Antagonismo *in vitro* por metabolitos**

Las bacterias antagonistas *in vitro* contra *A. tumefaciens* se inocularon en matraces con 20 mL de medio caldo-soja-triptona (TSB); de cada cepa bacteriana antagonista se inocularon 10 µl de una suspensión acuosa con 1 x 10<sup>7</sup> UFC/mL; los matraces se mantuvieron en agitación constante durante 48 h a temperatura de laboratorio. Después, 10 mL de cada cultivo en TSB se utilizarón

filtros bacteriológicos (.22  $\mu\text{m}$ ) estériles para eliminar las células bacterianas y obtener únicamente los metabolitos producidos por cada cepa. El efecto del filtrado contra *A. tumefaciens* se realizó en placas Petri cuadradas (120 x 120 mm) con medio agar nutritivo; las placas se inocularon por extensión en la superficie del medio con 250  $\mu\text{L}$  de una suspensión acuosa de *A. tumefaciens* con  $1 \times 10^7$  UFC/mL y se mantuvo en reposo durante 30 min hasta la completa absorción de la suspensión en el medio de cultivo. Después, se colocaron discos (3 mm de diámetro) de papel filtro embebido en el filtrado de cada cepa antagonista con tres repeticiones. Las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 48 h. El efecto del filtrado se evaluó por la formación de halos de inhibición del crecimiento de *A. tumefaciens*. Así mismo, se evaluó la actividad proteolítica y lipolítica de las cepas antagonistas con los protocolos descritos por Slifkin, (2000).

#### **4.4.3. Antagonismo *in vivo* contra *A. tumefaciens***

Para las pruebas de antagonismo *in vivo* se seleccionaron tres cepas bacterianas (AAC2, AAC5 y AAC9) que fueron aisladas con mayor frecuencia de las agallas y que mostraron algún grado de antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens*; así mismo, se seleccionaron ocho cepas (AAC8, AAC3, AAC4, AAC12, AAC11, AAC9, AAC7, AAC13) aisladas con mayor frecuencia e identificadas como *Pseudomonas spp.* para su inoculación en consorcio; todas las cepas se inocularon a partir de un cultivo puro de 48 h incubados a 28 °C en agar nutritivo. Las cepas AA2, AA5 y AAC9 se inocularon individualmente y las cepas AAC8, AAC3, AAC4, AAC12, AAC11, AAC9, AAC7, AAC13 de *Pseudomonas spp.* en consorcio en 10 plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) var. ramsés susceptible a *A. tumefaciens* 20 días después de la germinación en condiciones de invernadero. La inoculación individual y en consorcio se realizó por inmersión de la raíz y cuello del tallo de las plantas de jitomate durante 30 minutos en una suspensión celular con  $1 \times 10^7$  UFC/mL basado en el patrón de turbidez de la escala de McFarland. Las plantas inoculadas se trasplantaron en en bolsas de plástico negro (2 kg) con sustrato tierra-agrolita (75:25) estéril y se mantuvieron en invernadero por 7 días para promover la colonización bacteriana con una humedad relativa >70 y temperatura entre 30 y 33 °C.

#### **4.4.4. Colonización de raíces por los antagonistas**

Para verificar la capacidad de colonización de raíces de los antagonistas, a los 7 días después de la inoculación, se cortaron trozos de 1 g de raíz y se colocaron en un matraz con 5 ml

de agua destilada estéril por 30 min para permitir la difusión bacteriana. De esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ ; de cada dilución se sembraron 100  $\mu$ l con tres repeticiones en placas Petri con medio de cultivo agar nutritivo y Pseudomonas-agar. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h. La densidad de poblaciones bacterianas totales se estimó en UFC/g de raíz por conteo directo en placa (Forbes, 2009) descrito anteriormente.

#### **4.4.5. Inoculación de *A. tumefaciens***

Posterior a los 7 días de la inmersión de las raíces y cuello de las plantas de jitomate en la suspensión bacteriana de los antagonistas, se inoculó *A. tumefaciens* por dos métodos en tratamientos independientes: 1) por heridas en el cuello del tallo con un palillo de madera estéril e inoculación con masa bacteriana, y 2) inoculación diaria en el sustrato durante 7 días con 150 mL, de una suspensión bacteriana con  $1 \times 10^7$  UFC/ML (basado en el patrón de turbidez de la escala de McFarland) del patógeno. Se utilizaron dos testigos, 1) plantas inoculadas por ambos métodos con *A. tumefaciens* sin la inmersión de las raíces en la suspensión de los antagonistas, y 2) plantas inoculadas con agua destilada estéril en el cuello de la raíz por herida y en el sustrato, sin antagonistas ni patógeno. Las plantas se mantuvieron en invernadero bajo las condiciones descritas anteriormente durante 40 días. El estudio se realizó en un diseño completamente al azar, con dos tipos de inoculación del patógeno, cuatro tratamientos antagonistas con cinco repeticiones. La variable analizada fue el área del tallo (mm) con desarrollo de tumores causado por *A. tumefaciens*.

#### **4.5. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico descriptivo utilizando el software R-UCA 4.1.1 para el ANOVA y prueba Tukey para el análisis de significancia estadístico. Para los resultados no paramétricos se utilizó el análisis de varianza ANOVA de Kruskal-Wallis, finalizando con la prueba Post-hoc para el análisis de significancia, se consideraron significativos los resultados con una  $P < 0.05$  (Kuehl y Kuehl, 2000; Wong González, 2010).

#### **4.6. Identificación de cepas antagonistas contra *A. tumefaciens***

Las 13 cepas más abundantes se identificaron por la amplificación parcial del gen 16S rARN con los iniciadores 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT3') (Baker *et al.*, 2003). Las condiciones de termociclaje fueron de 95°C

durante 1 min, seguido de 30 ciclos de 95°C, 54°C y 72°C durante 5, 1, 0.45 y 1 min cada una para finalizar con un ciclo a 72°C durante 8 min, finalizando 4°C durante 8 min. Se almacenó a -4°C hasta su secuenciación. Las bandas de los amplificadores se verificaron por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio (500 ng mL<sup>-1</sup>).

#### **4.6.1. Secuenciación**

Los productos de PCR que mostraron fragmentos amplificados de un peso molecular de 1500 pb se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Korea). La secuencia obtenida fue editada con el software Chromas, ensamblada con ayuda del software DNA Star.

#### **4.6.2 Filogenia de cepas antagonistas**

Se realizó el análisis filogenético, con el software Mega-X Modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap y la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias se compararon en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI-National Center of Biotechnology Information), empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

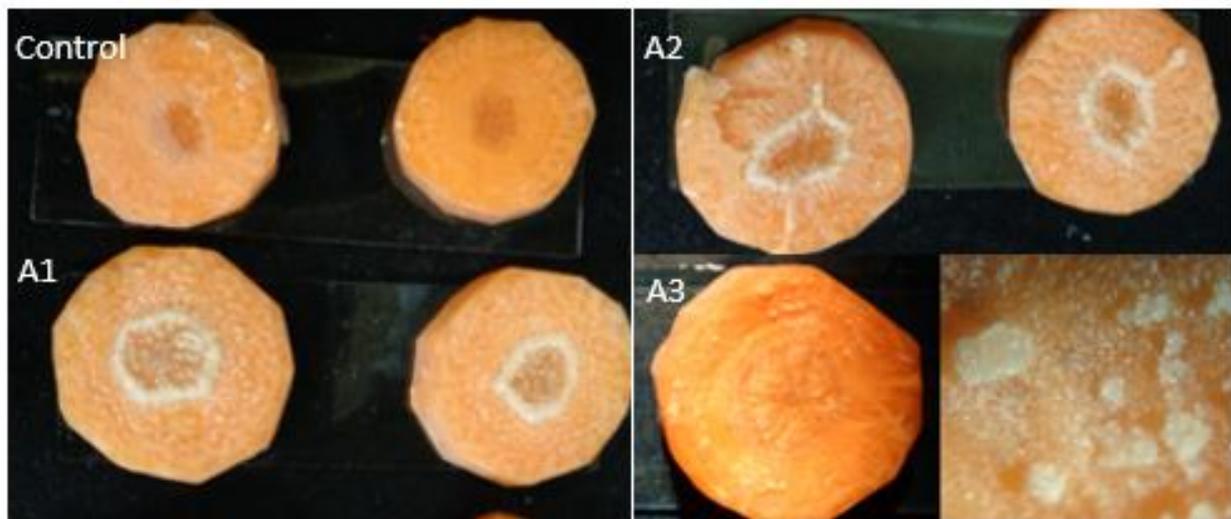
## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Aislamiento de *A. tumefaciens*

Se aislaron seis morfotipos bacterianos, de los cuales se identificaron tres potenciales *A. tumefaciens* por pruebas de patogenicidad *in vitro* positivas, la caracterización bioquímica arrojó similitud con los biovares 1 y 2, de las cuales mediante la amplificación del gen *virD2* se identificó a la cepa A1 como *A. tumefaciens*.

#### 5.1.1 Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Los resultados de las pruebas de patogenicidad *in vitro* en rodajas de zanahoria mostraron que tres cepas (A1, A2 y A3) de las seis cepas inoculadas indujeron una proliferación anormal del tejido inoculado y la formación de pequeños tumores; no se observó ningún síntoma en los controles no inoculados (Figura 3). Los síntomas observados con este modelo de inoculación *in vitro* se han reportado previamente como confirmatorias para identificar cepas tumorogénicas de *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (Schaad *et al.*, 2000). La cepa A1 aislada de agallas de frambuesa causó mayor severidad de síntomas y se seleccionó para los ensayos de inoculación en planta (Figura 4).



**Figura 3.** Cepas A1, A2 y A3 inoculadas en rodajas de zanahoria causando proliferación anormal del tejido y desarrollo de pequeños tumores. La cepa A1 indujo mayor severidad de tumoración con respecto a la cepa A2 y A3.

### 5.1.2. Pruebas de patogenicidad *in vivo*

La inoculación de la cepa A1 en plantas de jitomate y girasol indujo el desarrollo de pequeños tumores a lo largo del tallo (Figura 4). Las plantas que se inocularon con masa bacteriana también causaron un abultamiento del tallo que posteriormente dio lugar al desarrollo de un tumor; así mismo, en algunas plantas inoculadas se observó el desarrollo de raíces laterales. La severidad del síntoma de tumoración en el tejido en ambas especies de plantas (tomate y girasol) fue diferente.



**Figura 4.** Plantas inoculadas con  $1 \times 10^7$  UFC/mL y masa bacteriana de la cepa A1. **A) y B).** Desarrollo de tumores a lo largo del tallo en plantas de jitomate inoculadas por inyección de una suspensión bacteriana en el tallo. **C) y E).** Desarrollo de tumores a lo largo del tallo en plantas de jitomate inoculadas por herida con masa bacteriana en el cuello de la raíz. **D).** Desarrollo de raíces e hinchazón del tallo en plantas de jitomate. **F).** Desarrollo de pequeños tumores a lo largo del tallo en plantas de girasol inoculadas por inyección de una suspensión bacteriana en el tallo. **G).** Síntomas de hinchazón de tallo, desarrollo de raíces y tumores.

### 5.1.3 Caracterización e identificación de *A. tumefaciens*

De las muestras de la agalla de la corona de frambuesa, se obtuvieron seis cepas con morfología similar a la descrita para *A. tumefaciens* (Schaad *et al.*, 2000). De acuerdo con la descripción de biovar por Schaad *et al.*, (2000) y Cubero y López (2001), las seis cepas (A1-A6)

se incluyen en el biovar 1 y 2. Los resultados de la caracterización mostraron que la cepa A1 tuvo 83.4% de similitud con el biovar 1 (Cuadro 2), las cepas A4-A6 no dieron resultado positivo a las pruebas de patogenicidad sin embargo si comparten características bioquímicas con biovares de *A. tumefaciens*.

**Cuadro 2.** Determinación del biovar de seis cepas aisladas de agallas de frambuesa

Fuente de carbono	Biovar			A1	A2	A3	A4	A5	A6
	1	2	3						
Sucrosa	+	-	V	+	+	+	-	+	-
Eritritol	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Melezitosa	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Dulcitol	+	+	-	-	V-	+	+	-	-
L-tartárico	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Utilización de citrato	V-	+	+	-	V+	-	V-	V-	V-

+: Positivo, -: Negativo, V-; Variable con tendencia a negativo, V+; Variable con tendencia a positivo

**Caracterización e identificación de *A. tumefaciens*.** Las cepas aisladas de tejido de la agalla de frambuesa, se evidenciaron como potenciales *A. tumefaciens* después de producir crecimiento anormal en las pruebas de patogenicidad *in vivo* e *in vitro*. Mediante la caracterización bioquímica la cepa A1 aislada de agallas de frambuesa var. elvira se identificó como *A. tumefaciens* biovar 1. Este resultado es consistente con la relación que se establece con cepas tumorogénicas de *A. tumefaciens* con el biovar 1 el cual es el más ampliamente estudiado; se sabe que las poblaciones de *A. tumefaciens* incluidas en este biovar tienen una gran capacidad de adaptación para colonizar nichos ecológicos como suelo, agua y plantas ( Cubero y Lopez, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Genov *et al.*, 2015).

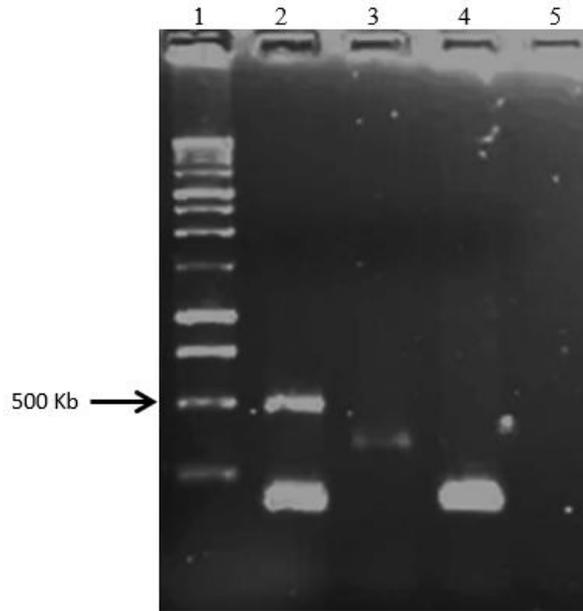
En frambuesa, se describe a *A. rubi* como el agente causal de la agalla de la corona caracterizadas por metabolizar D-glucosa, D-arabinosa, manitol, malonato, citrato, eritritol, y no producen 3-cetalosa (Slater *et al.*, 2009; Alippi *et al.*, 2010). En esta investigación, la cepa aislada

de tumores de frambuesa e identificada como *A. tumefaciens*, mostró 83% de similitud con el biovar 1 descrito por Schaad *et al.*, (2000) y Cubero y López (2001); la cepa A1 fue positivo para metabolizar sacarosa, melezitosa y negativo para dulcitol, eritritol, L-tartárico y citrato; difiere con la utilización de citrato y eritritol con cepas de *A. rubi*. Diferentes agrobacterias pueden colonizar un mismo nicho y compartir características de virulencia para causar enfermedad; en vid, arándano y frambuesa se ha demostrado que pueden ser susceptibles a diferentes especies de *Agrobacterium* (Alippi *et al.*, 2012; Nester, 2015; Barton *et al.*, 2018), lo cual podría explicar la identificación de *A. tumefaciens* en las agallas de frambuesa en este estudio.

La cepa A1 causó tumores *in vitro* en rodajas de zanahoria, así como *in vivo* en plantas de jitomate y girasol bajo condiciones de invernadero. Estos tres modelos experimentales se reportan como pruebas confirmatorias de la patogenicidad de cepas de *A. tumefaciens* (Schaad *et al.*, 2000).

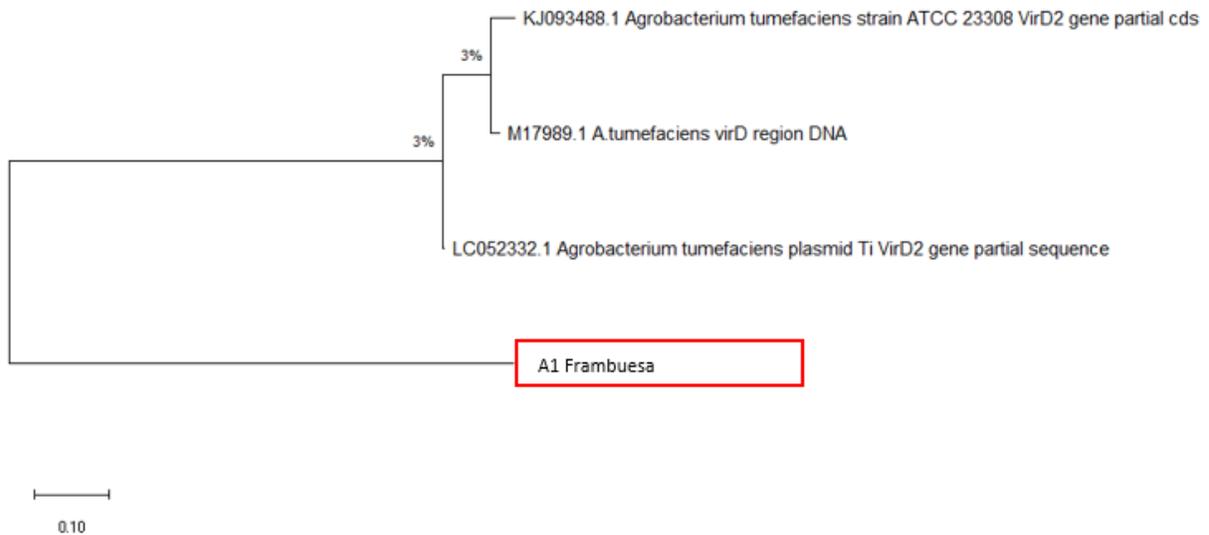
#### **5.1.4. Secuenciación directa del gen *VirD2***

Por PCR, la cepa A1 amplificó un fragmento aproximado de 450 pb reportado por Haas *et al.*, (1995) para el del gen *VirD2* (Figura 5). La comparación de la secuencia en el GenBank del producto amplificado mostró 98 % de similitud con la secuencia del gen *VirD2* de *Agrobacterium tumefaciens* 70DZCEMU016 plásmido Ti *VirD2* (Núm. de acceso LC05332.1) (Figura 7).



**Figura 5.** Amplificación del gen VirD2 por PCR de la cepa A1 aislada de agallas de frambuesa e inoculada en rodajas de zanahoria, plantas de jitomate y girasol. Línea 1. Marcador de peso molecular 1 Kb Invitrogen Plus DNA Ladder, 2: cepa A1, 3: cepa A2, 4; cepa A3, 5: control negativo.

### 5.1.5. Análisis filogenético de la cepa A1 identificada como *A. tumefaciens*



**Figura 6.** Análisis filogenético de la cepa A1 de *Agrobacterium tumefaciens* aislada de agalla de la corona de frambuesa basado en la secuencia del gen VirD2 descrito por Haas *et al.*, (1995), Modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX, el aislamiento A1 de frambuesa esta asociado con clados de *A. tumefaciens*.

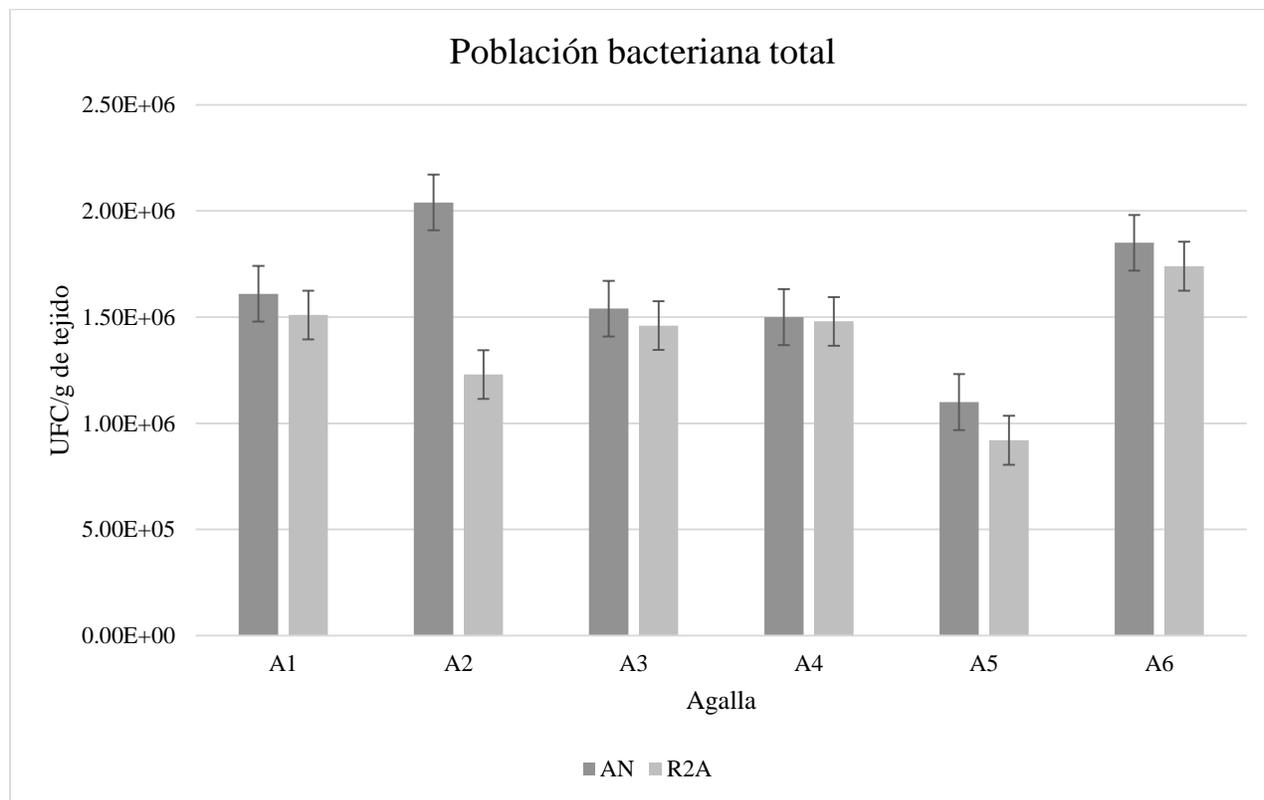
**Identificación molecular de *Agrobacterium tumefaciens*.** Por amplificación y secuenciación del gen *VirD2*, la cepa A1 aislada de agallas de frambuesa var. elvira se identificó como *A. tumefaciens*. El gen *VirD2* es parte de la secuencia del plásmido Ti, se considera fundamental para el inicio del proceso de infección, direccionar el ADN monocatenario a los sistemas de secreción tipo IV para integrarse al genoma de la planta hospedante; está conformado por 25 pb y 424 aminoácidos, protege el genoma del ADN-T y evitar la degradación por endonucleasas, así como expresar proteínas de transporte para la colonización del hospedante (Nester, 2015).

En esta investigación, la inoculación de las cepas A2 y A3 causaron tumores en rodajas de zanahoria, así como en plantas de jitomate y girasol con menor severidad que la cepa A1; sin embargo, por PCR no se obtuvo la amplificación del gen *VirD2* con los iniciadores utilizados. Al respecto, se conoce que cepas con mutaciones en el gen *VirD2* son capaces de infectar y transferir su genoma al núcleo del hospedante, pero en tasas más bajas. También se ha relacionado la influencia de las proteínas del hospedante y las interacciones del ambiente con alteraciones en las regiones del gen *VirD2* (Gelvin, 2012; Tzfira y Citovsky, 2000). Así mismo, en estudios realizados por Bravo-Angel *et al.*, (1998) demostraron que existen diferencias entre las secuencias del gen *VirD2* en diversas cepas de *A. tumefaciens* conservando 90% de la región inicial de 203 aminoácidos; lo anterior podría sugerir que las cepas A2 y A3 aisladas de agallas de plantas de frambuesa, pudieron haber tenido alteraciones en las secuencias que no permitieron la compatibilidad con los iniciadores utilizados para su identificación, pero que en las pruebas de patogenicidad si mostraron la capacidad de inducir tumores en el tejido aunque con menor severidad. Se consigna que las especies de *Agrobacterium* que carece del gen *VirD2*, pierden su capacidad tumorogénica (Gordon y Christie, 2014; Gelvin, 2018); por lo anterior, nuestros resultados confirman que la cepa A1 corresponde a una cepa tumorogénica de *A. tumefaciens*.

## **5.2. Densidad de poblaciones bacterianas totales en la agalla de la corona en frambuesa**

Los resultados de esta investigación indicaron que en las muestras de agalla (n=6) de frambuesa existe diferente densidad de poblaciones bacterianas totales entre ellas. Se registró mayor densidad de poblaciones de bacterias en el tejido (UFC/g de tejido) más joven de la agalla (tejido blanquecino) y menor en las agallas con mayor desarrollo (tejido lignificado); sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ellas, ni con el medio de cultivo utilizado (agar nutritivo o R2A) (Figura 8). Entre las poblaciones bacterianas totales aisladas de las agallas se observó que la

diversidad bacteriana fue limitada identificando únicamente 13 morfotipos con la mayor frecuencia de aislamiento en las seis agallas analizadas, las cuales se seleccionaron para estudios posteriores.



**Figura 7.** Poblaciones bacterianas totales (UFC/g de tejido) en agallas de frambuesa en los medios de cultivo agar nutritivo (AN) y R2A agar.

### 5.2.1 Aislamiento de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. de la agalla de la corona en frambuesa

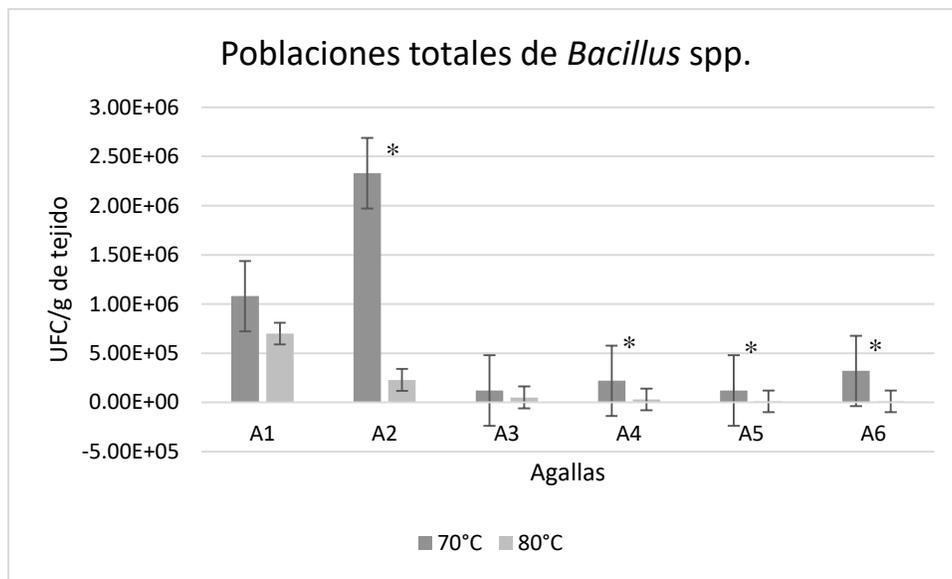
Para la densidad de poblaciones de *Bacillus* spp. en medio de cultivo R2A, la prueba Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) mostró diferencias ( $P=0.024$ ) entre las temperaturas de 70 y 80 °C a las 48 h de incubación a 28 °C. Con la comparación Post-hoc con Mann Whitney test ( $\alpha=0.05$ ) se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $P=0.03$ ) en el cual la extracción de UFC/g de tejido a la temperatura de 70°C es significativamente mayor que a 80 °C. Con la temperatura de 70 °C por 7 min, la densidad bacteriana estuvo en un promedio de 6.98E+05; en tanto que a 80 °C por 5 min fue en promedio de 1.71E+05 UFC/g de tejido entre las seis agallas evaluadas (Cuadro 3; Figura 8). Lo anterior sugiere que la exposición en baño maría a 70 °C por 7 min de la suspensión acuosa del tejido de la agalla es más eficiente para la inducción de esporulación y prevalencia de especies de *Bacillus* eliminando otras bacterias asociadas al tejido; la esporulación

en altas temperaturas es una característica conocida del género *Bacillus*. Entre las colonias de *Bacillus*, se identificaron cuatro morfotipos diferentes las cuales se preservaron para estudios posteriores en esta investigación.

**Cuadro 3.** Densidad de poblaciones de *Bacillus* spp. en tejido de la agalla en frambuesa a 70 y 80 °C.

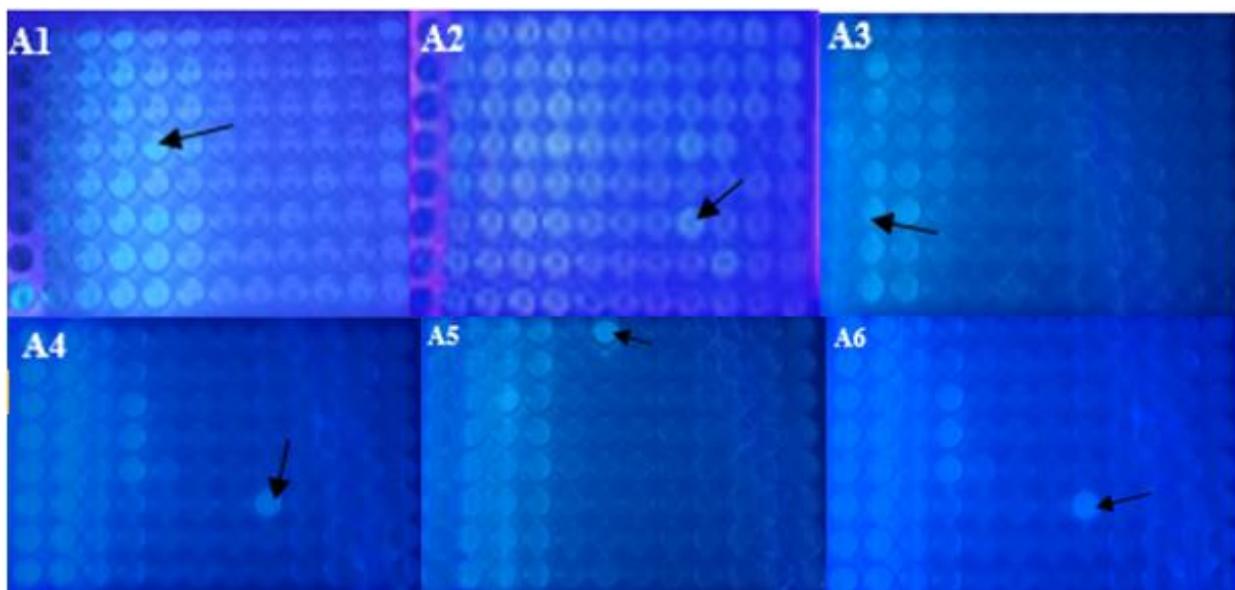
Agallas							
Tratamiento	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Promedio
70°C/7 min	1.08E+06*	2.33E+06	1.20E+05	2.20E+05	1.20E+05	3.20E+05	6.98E+05
80°C/5 min	7.00E+05	2.28E+05	5.00E+04	3.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	1.71E+05

\*UFC/g de tejido de agalla de frambuesa



**Figura 8.** Densidad de poblaciones de *Bacillus* spp. en UFC/g de tejido de agalla de frambuesa a 70 y 80 °C por 7 y 5 minutos respectivamente. \*Indica diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ )

Los pozos con mayor fluorescencia fueron identificados y seleccionados para aislar las poblaciones bacterianas de *Pseudomonas* spp. (Figura 9).



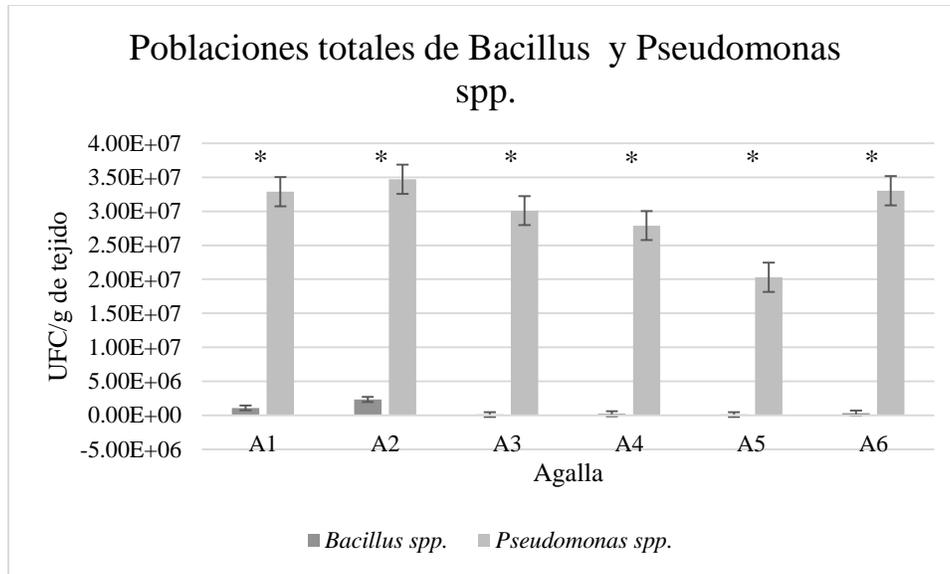
**Figura 9.** Poblaciones bacterianas fluorescentes de *Pseudomonas* en microplacas con medio caldo BK suplementado con antibióticos observadas bajo luz ultravioleta (260 nm) a las 72 h de incubación a 28 °C. Cada placa corresponde a una muestra de agalla de la corona.

Los resultados de las poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes aisladas mostraron que la densidad bacteriana estuvo en promedio de 2.98E07 UFC/g de tejido entre las seis agallas evaluadas. Comparado con la densidad de *Bacillus* en el mejor tratamiento de aislamiento (70 °C/7 min) (Cuadro 3), los resultados indican que las poblaciones de *Pseudomonas* son más abundantes que las de *Bacillus* colonizando el tejido de la agalla de la corona en frambuesa (Cuadro 4; Figura 10). El análisis de varianza ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) mostró diferencias significativas entre las poblaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas* spp. Del crecimiento bacteriano, se identificaron 23 morfotipos diferentes de los cuales se seleccionaron nueve con la mayor frecuencia de aislamiento para estudios posteriores.

**Cuadro 4.** Densidad de poblaciones de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* fluorescentes (UFC/g de tejido) en agalla en frambuesa.

Poblaciones	Agallas						Promedio
	A1	A2	A4	A5	A6	A7	
<i>Bacillus</i>	1.08E+06*	2.33E+06*	1.20E+05*	2.20E+05*	1.20E+05*	3.20E+05*	6.98E+05
<i>Pseudomonas</i>	3.29E+07	3.47E+07	3.01E+07	2.79E+07	2.03E+07	3.30E+07	2.98E+07

\*; Diferencia estadística significativa Tukey ( $\alpha=0.05$ ).



**Figura 10.** UFC/g de tejido de poblaciones de *Bacillus* y *Pseudomonas spp.* aisladas del tejido de la agalla de la corona de frambuesa. \*Indica diferencia estadística significativa ( $\alpha=0.05$ ).

### 5.2.3. Identificación molecular de antagonistas

Por PCR se amplificaron fragmentos de aproximadamente 1500 pb del gen 16S rARN en 13 morfotipos con la mayor frecuencia de aislamiento del tejido de agallas. La comparación de las secuencias del fragmento amplificado en el banco de genes (Gen Bank) del NCBI identificaron con un porcentaje de similitud entre el 95.9 y 100 % a 8 (61.5%) cepas en el género *Pseudomonas* con la mayor abundancia en el tejido de agallas; entre estas, se identificaron las especies *P. putida*, *P. citronenllois*, y *P. plecoglossicida*; 2 (15.3%) cepas de *Bacillus* y las especies *B. subtilis* y *B. halotolerans* y 3 (23%) cepas en otros géneros y especies: *Delftia sp.* y *Alcaligenes faecalis*, (Cuadro 4 y 5).

**Cuadro 5.** Identificación molecular por amplificación parcial del gen 16S rRNA de 13 cepas aisladas con mayor frecuencia del tejido de agalla de la corona en frambuesa

ID cepa	Muestra agalla	Identificación	Homología (%)	Número de acceso Genbank
AAC2	A2	<i>Delftia sp</i>	100	<a href="#">MK414965.1</a>
AAC12	A3	<i>Pseudomonas putida</i>	100	<a href="#">CP045551.1</a>
AAC8	A5	<i>Pseudomonas sp</i>	100	<a href="#">MT397006.1</a>
AAC3	A7	<i>Pseudomonas sp</i>	99.84	<a href="#">MK281650.1</a>
AAC11	A1	<i>Pseudomonas putida</i>	100	<a href="#">CP045551.1</a>
AAC9	A4	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	100	<a href="#">MT437044.1</a>
AAC1	A4	<i>Alcaligenes faecalis</i>	100	<a href="#">MK603124.1</a>
AAC4	A2	<i>Pseudomonas sp</i>	100	<a href="#">ON046197.1</a>
AAC13	A3	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100	<a href="#">ON287254.1</a>
AAC10	A1	<i>Bacillus subtilis</i>	100	<a href="#">ON102775.1</a>
AAC6	A2	<i>Bacillus halotolerans</i>	100	<a href="#">MT539148.1</a>
AAC5	A6	<i>Alcaligenes faecalis</i>	95.95	<a href="#">KY427117.1</a>
AAC7	A7	<i>Pseudomonas sp</i>	99.77	<a href="#">MT397006.1</a>

**Cuadro 6.** Ubicación taxonómica de cepas aisladas con mayor frecuencia del tejido de la agalla de la corona en frambuesa.

	<i>Alcaligenes</i>	<i>Delftia</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Dominio</b>	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria	Proteobacteria	Firmicutes	Proteobacteria
<b>Clase</b>	$\beta$ -proteobacteria	$\beta$ -proteobacteria	Bacilli	$\gamma$ -proteobacteria
<b>Orden</b>	Burkholderiales	Burkholderiales	Bacillales	Pseudomonadales
<b>Familia</b>	Alcaligenaceae	Comamonadaceae	Bacillaceae	Pseudomonadaceae
<b>Género</b>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Delftia</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Especie</b>	<i>Faecalis</i>		<i>subtilis</i> <i>haloterans</i>	<i>Putida</i> <i>citronillolis</i> <i>plecoglossicida</i>

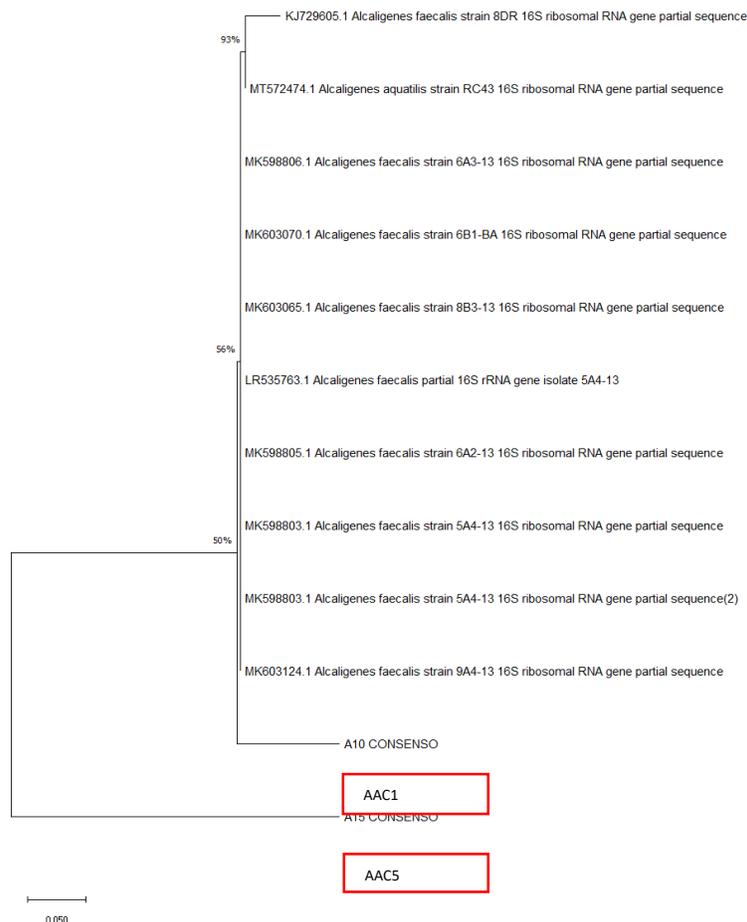
Fuente: Schoch *et al.*, 2020

#### 5.2.4. Análisis filogenéticos de cepas nativas en la agalla de la corona

La relación filogenética de cada cepa se infirió con el software Mega-X y la base de datos NCBI.

##### 5.2.4.1 *Alcaligenes faecalis*

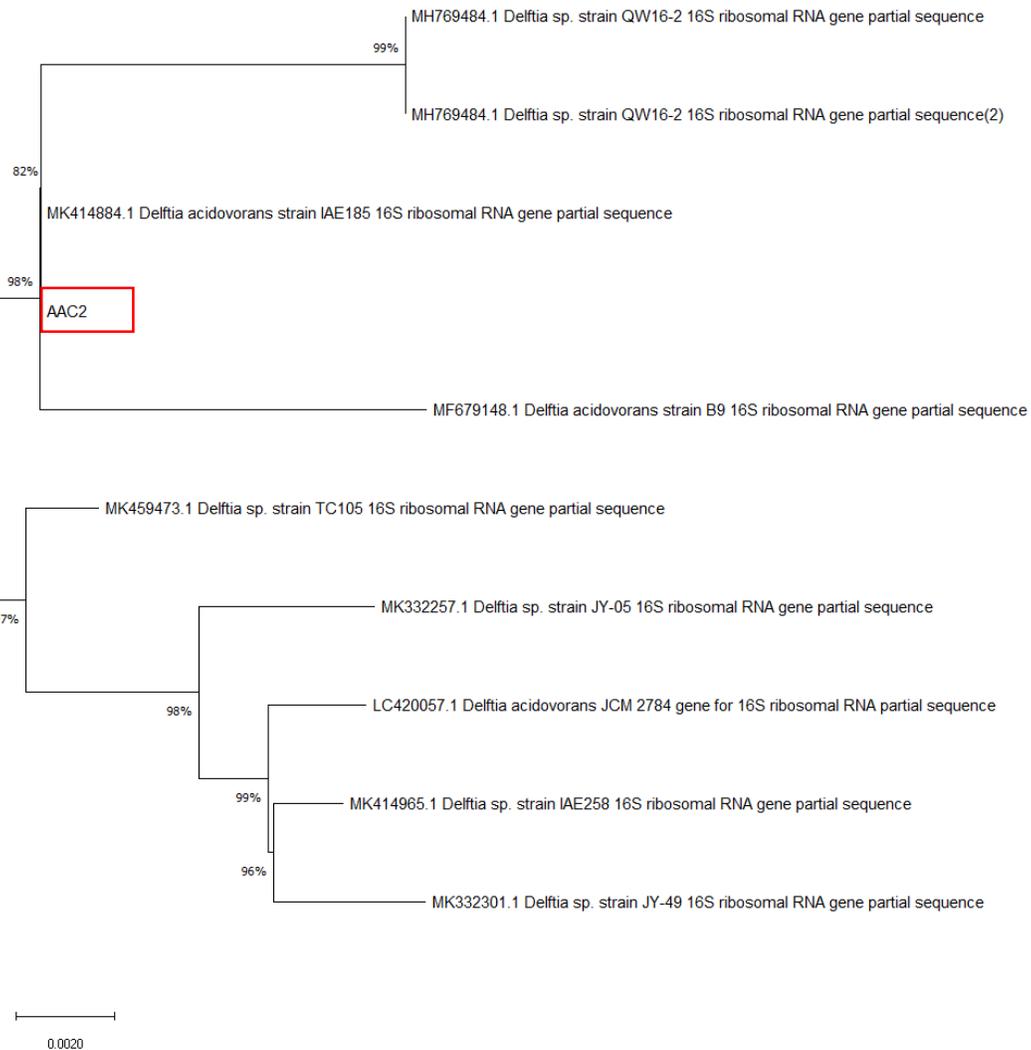
Las cepas AAC1 y AAC5 se identificaron como *Alcaligenes faecalis* (Figura 11). *A. faecalis* se caracteriza por colonizar diversos nichos ecológicos, principalmente en suelos, agua y rizósfera, las especies dentro del género *Alcaligenes* son ampliamente estudiadas por su capacidad de bioremediación entre los que se incluyen fenoles, pesticidas e hidrocarburos (Basharat *et al.*, 2018).



**Figura 11.** Árbol filogenético consenso de *Alcaligenes faecalis* aislada de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16S rARN descrito por Baker *et al.*, (2003), Modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX, el aislamiento correspondiente a las bacterias AAC1 y AAC5 están asociadas con clado de *Alcaligenes* spp.

### 5.2.4.2. *Delftia* sp.

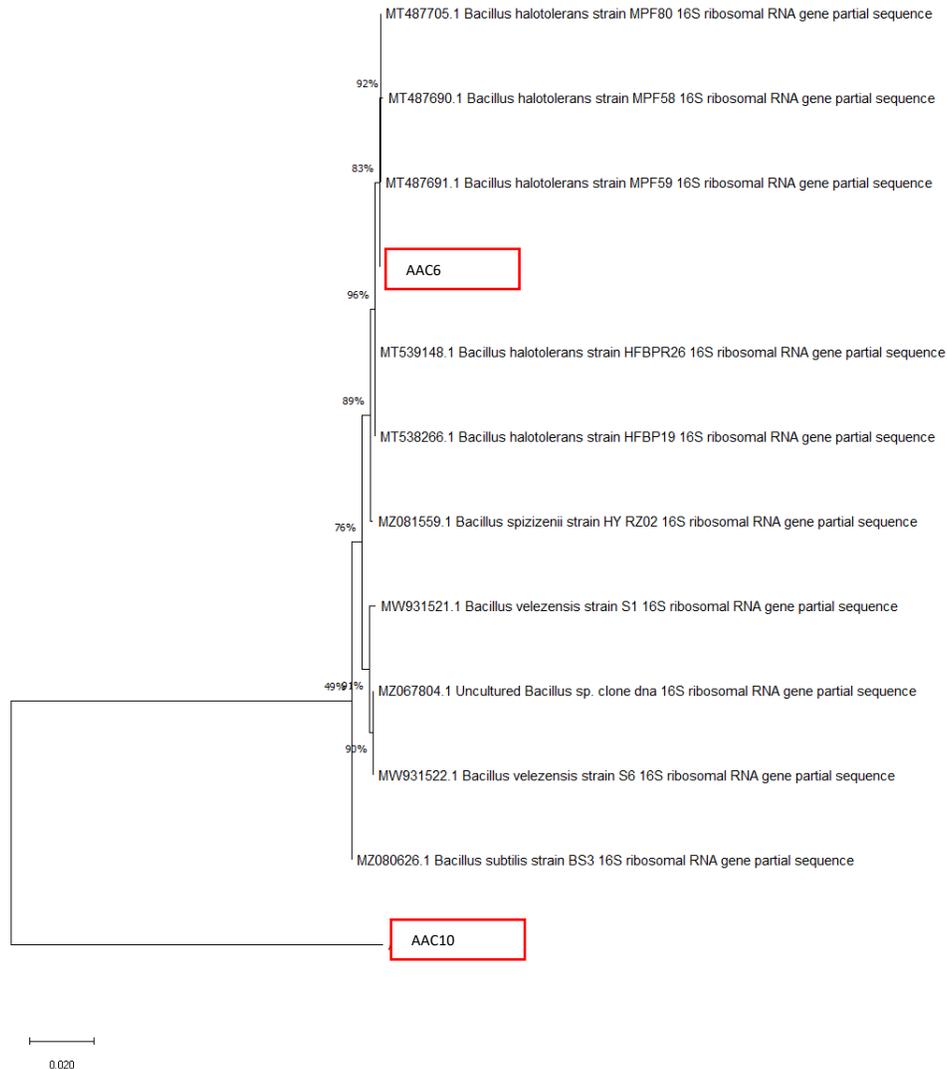
La cepa AAC2 se identificó como *Delftia* sp. Las especies dentro del género son gram negativas, móvil, flagelada, en forma de varilla y dependiendo de la especie puede ser completamente recta o ligeramente curva (Wen *et al.*, 1999). La cepa aislada de agallas se relaciona con dos cepas del género (Figura 12).



**Figura 12.** Árbol filogenético consenso de *Delftia* sp. aislada de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16s descrito por Baker *et al.*, (2003), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX, la cepa aislada de la agalla de la corona AAC2 esta asociada con el clado de *Delftia* sp.

### 5.2.4.3. *Bacillus* spp.

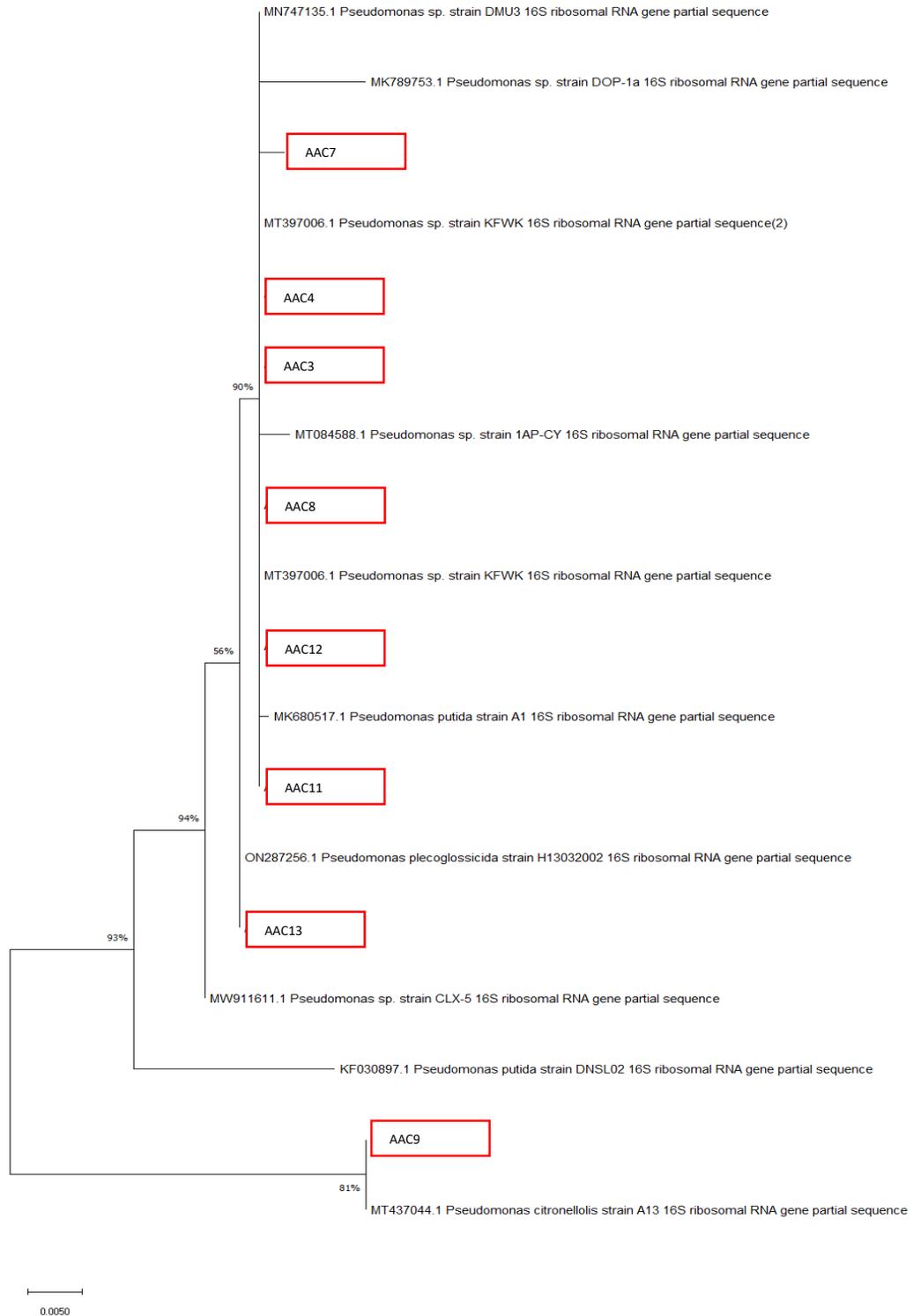
En el tejido de la agalla de la corona en frambuesa se aislaron e identificaron con mayor frecuencia a las especies *B. subtilis* (cepa AAC10) y *B. halotolerans* (cepa AAC6) (Figura 13). El género *Bacillus* incluye cepas con células en forma de bastón, gram positivas, y anaerobias facultativas, actualmente se han descrito diversas especies de este género como potenciales agentes de biocontrol contra hongos y bacterias fitopatógenas (Fira *et al.*, 2018).



**Figura 13.** Árbol filogenético consenso de la cepa AAC6 y ACC10 aisladas de la agalla de la corona en frambuesa, asociadas con el clado de *Bacillus* spp, basado en la secuencia del gen 16S rARN descrito por Baker *et al.*, (2003), modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX.

#### **5.2.4.4. *Pseudomonas* spp.**

*Pseudomonas* spp. fueron las poblaciones más abundantes colonizando el tejido de la agalla en frambuesa. *Pseudomonas* spp. son bacterias baciliformes rectas y curvadas dependiendo la especie, gram negativas que colonizan una amplia diversidad de nichos ecológicos (Hesse *et al.*, 2018). Las *Pseudomonas* spp. identificadas en este estudio se relacionan filogenéticamente con las especies *P. putida*, *P. citronillolis* y *P. plecoglossicida* (Figura 13).



**Figura 14.** Árbol filogenético consenso de *Pseudomonas spp.* aisladas de la agalla de la corona en frambuesa, basado en la secuencia del gen 16S rARN descrito por Baker *et al.*, (2003), asociadas con el clado de *P. putida*, *P. citronillois* y *P. plecoglossicida* basadas en el modelo Tamura-Nei 1000 repeticiones de Bootstrap calculado por el software MegaX.

**Densidad de poblaciones bacterianas totales en la agalla de la corona en frambuesa.** Se evidenció que en el tejido de la agalla en frambuesa colonizan en diferente densidad otras poblaciones bacterianas fuera del género *Agrobacterium*, pero con limitada diversidad. Las bacterias que colonizan un mismo nicho pueden establecer relaciones benéficas o de competencia (Díaz y Sen, 2011; Platt *et al.*, 2012). Se conoce que *A. tumefaciens* puede convivir con un gran número de bacterias en el suelo y la rizósfera; sin embargo, la coexistencia en el tumor con otros microorganismos es aún poco explorado. Durante el desarrollo de la agalla, *A. tumefaciens* puede inducir la producción de diversas clases de opinas como nopalina, agrocipina y octopina las cuales son utilizadas por este patógeno como fuentes de carbono y energía creando un nicho altamente específico para su ciclo de vida (Szegedi *et al.*, 1988; Aloni y Ullrich, 2008; Quispe-Huamanquispe *et al.*, 2017).

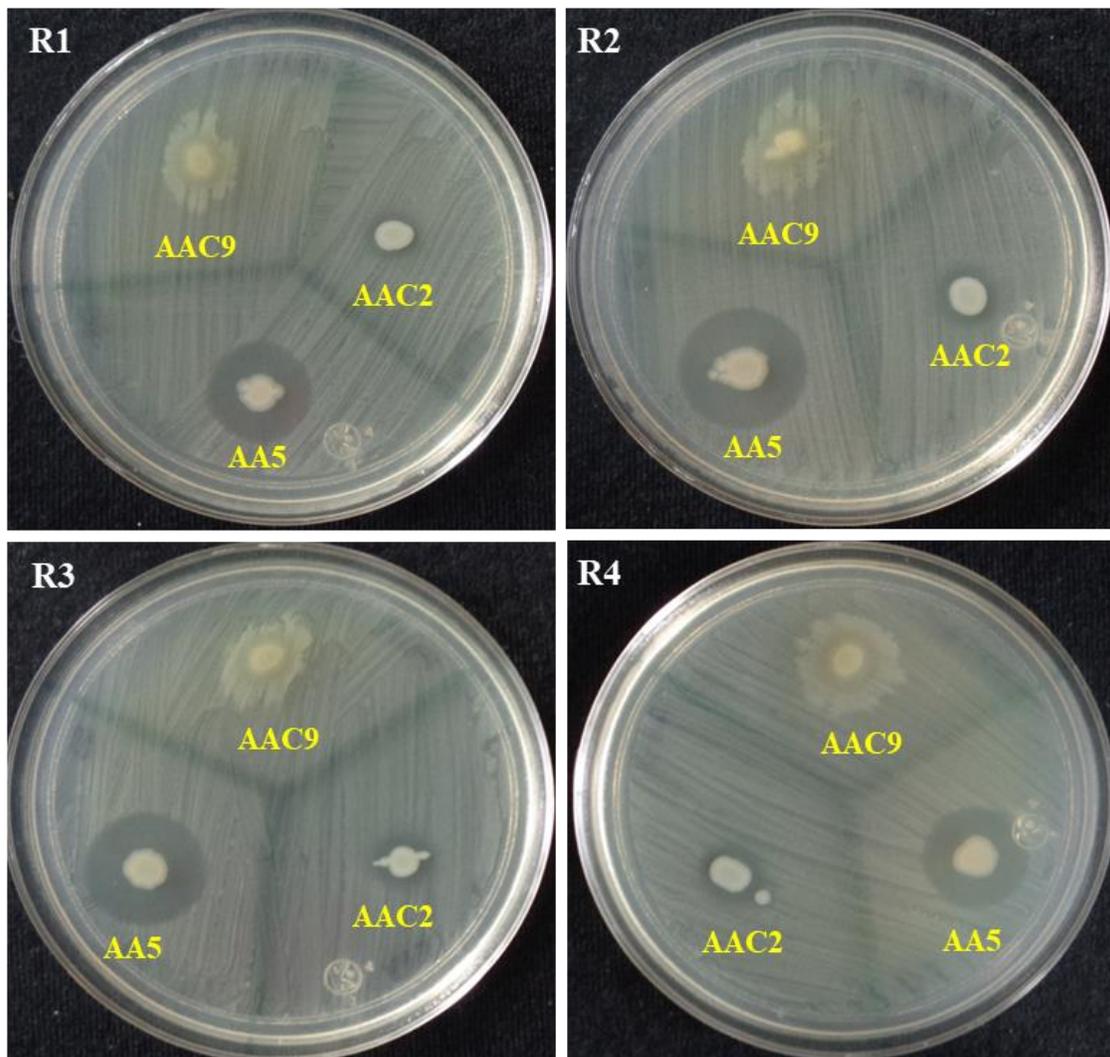
El estudio de las opinas específicas utilizadas por *A. tumefaciens*, postula que podrían ser también quimioatrayentes para otras especies bacterianas diferentes al género *Agrobacterium* (Brencic y Winans, 2005; Barton *et al.*, 2018; Nester, 2015), capaces de utilizar estos mismos compuestos como fuentes de carbono, colonizar el tejido de la agalla y establecer posiblemente una relación de competencia (Tzfira y Citovsky, 2000; Nester, 2015; Lacroix y Citovsky, 2019). Por lo anterior, los resultados de esta investigación podrían sugerir que las opinas y otros compuestos sintetizados en el tumor influyen la densidad y diversidad de otros microorganismos que colonizan el tejido del tumor ya que entre las poblaciones bacterianas totales aisladas de las agallas se observó una limitada diversidad bacteriana identificando únicamente 13 morfotipos con la mayor frecuencia de aislamiento en las seis agallas analizadas.

### **5.3. Pruebas de antagonismo *in vitro* e *in vivo***

#### **5.3.1. Antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens***

De seis muestras de agalla de la corona en frambuesa var. elvira se aislaron 13 cepas bacterianas asociados con mayor frecuencia al tejido de las agallas. Entre estos, la prueba de antagonismo *in vitro* identificó a las cepas AAC2, AA5 y AAC9 con algún grado de inhibición del crecimiento contra *A. tumefaciens* (Figura 14). La amplificación y secuenciación del gen 16S rARN identificaron estas cepas antagonistas con 100% de similitud con *Delftia* sp. (AAC2);

*Alcaligenes faecalis* (AAC5) y *Pseudomonas citronenollis* (AAC9) (Cuadro 4). Las tres cepas se seleccionaron para las pruebas de antagonismo *in vivo*.



**Figura 15.**Antagonismo *in vitro* de bacterias aisladas del tejido de la agalla de la corona en frambuesa contra *A. tumefaciens*, *Delftia* spp. (AAC2), *Alcaligenes faecalis* (AA5) y *Pseudomonas citronenollis* (AAC9). 4 repeticiones (R1-R4).

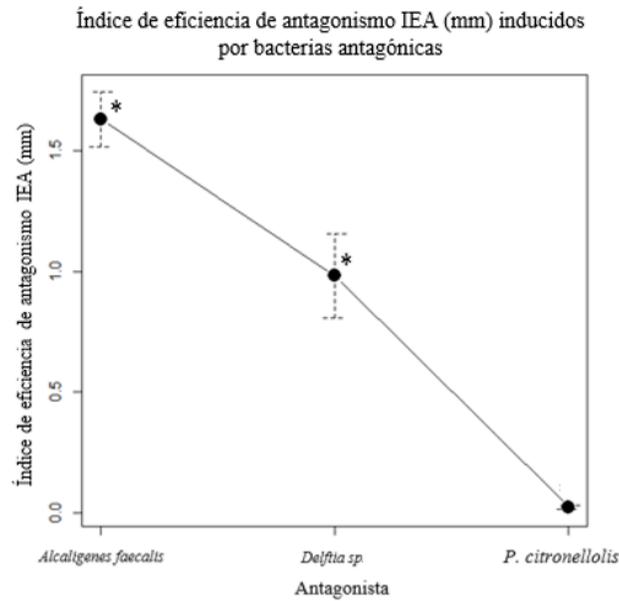
*Pseudomonas citronenollis* (cepa AAC9) indujo la formación de un halo blanquecino alrededor de la colonia, lo anterior podría indicar potencial de antagonismo mediado por la formación de biopelículas (D'aes *et al.*, 2014).

### 5.3.2. Índice de Eficiencia de Antagonismo (IEA)

Los resultados del análisis estadístico del IEA *in vitro* (Tukey  $\alpha= 0.05$ ) mostraron diferencias entre las tres cepas antagonistas ( $P= 0.00002023$ ). El mayor grado de antagonismo se observó con *Alcaligenes faecalis* (AA5), seguido de *Delftia* sp. (AA2) y *Pseudomonas citronenollis* (AAC9) (Cuadro 6, Figura 15).

**Cuadro 7.** Índice de eficiencia de antagonismo (IEA) de bacterias aisladas de la agalla en frambuesa. \*Diferencia significativa entre medias ANOVA( $\alpha=0.05$ ),  $P= 0.00002023$ . El mayor índice de antagonismo se registró con *Alcaligenes faecalis* (AA5), seguido de *Delftia* sp. (AA2) y *Pseudomonas citronenollis* (AAC9).

<i>Antagonista</i>	IEA (mm)	Promedio
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1.56	1.63*
	1.96	
	1.44	
	1.56	
<i>Delftia</i> sp.	0.73	0.02275*
	1.47	
	0.73	
	1	
<i>P. citronellolis</i>	0.01	0.9825
	0.015	
	0.024	
	0.042	



**Figura 16.** Índice de eficiencia de antagonismo *in vitro* de *Alcaligenes faecalis*, *Delftia sp.* y *Pseudomonas citronellolis*. \*Diferencia significativa (Tukey  $\alpha=0.05$ ) ( $P=0.0104$ ).

### 5.3.3. Antagonismo *in vitro* por metabolitos

Los resultados del antagonismo *in vitro* mediante el filtrado de metabolitos de las tres cepas bacterianas: *Alcaligenes faecalis* (AA5), *Delftia sp.* (AA2) y *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) no inhibieron el crecimiento de *A. tumefaciens*; así mismo, las tres cepas no mostraron actividad proteolítica ni lipolítica en la caracterización enzimática *in vitro*.

### 5.3.4. Antagonismo *in vivo* contra *A. tumefaciens*

Las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) var. ramsés fueron susceptibles a la infección por *A. tumefaciens*. A los 40 días después de la inoculación (ddi), en todos los tratamientos se desarrollaron tumores de diferente tamaño en el cuello y tallo de las plantas inoculadas tanto por herida con masa bacteriana como por suspensión celular en el sustrato con *A. tumefaciens*. Se observó mayor severidad en los tratamientos inoculados por herida que en el sustrato. Con la inoculación por herida, se desarrollaron tumores de diferente tamaño en una mayor área del tallo.

Con la interacción de los antagonistas + *A. tumefaciens* ningún tratamiento suprimió la infección y el desarrollo de tumores; sin embargo, se observaron diferencias en la severidad y área del tallo afectado entre los diferentes tratamientos con los antagonistas inoculados individualmente

como con el consorcio con *Pseudomonas* spp. Con la inoculación de *Alcaligenes faecalis* (AAC5) se observó menor severidad en general que el resto de los tratamientos. Con este tratamiento, los tumores desarrollados en las plantas se distribuyeron en áreas del tallo más distantes del cuello y corona de la raíz aún con la inoculación por herida y masa bacteriana de *A. tumefaciens* en esa zona. Los tumores en el tallo fueron de menor tamaño, blanquecino y no lignificado. El área de tallo de las plantas de jitomate con tumores fue menor cuando se inoculó *A. tumefaciens* en el sustrato con suspensión celular que con masa bacteriana.

Las plantas inoculadas con *Delftia* sp. (AAC2) mostraron el desarrollo de agallas de diferentes tamaños en áreas dispersas del tallo de las plantas. Así mismo, este tratamiento se caracterizó por un ensanchamiento del tallo, lo cual puede ser una respuesta a la infección por *A. tumefaciens*.

El tratamiento con *Pseudomonas citronellolis* (AAC9) mostró mayor severidad que con las cepas *Alcaligenes faecalis* (AAC5) y *Delftia* sp. (AAC2); los tumores fueron de mayor tamaño y en mayor área del tallo de las plantas infectadas.

Con la inoculación del consorcio de *Pseudomonas* spp. se observó la mayor severidad entre todos los tratamientos (Figura 17), se desarrollaron tumores en una mayor área del tallo; en algunas zonas del tallo los tumores más pequeños coalescieron formando amplia área con protuberancias del tejido. Además, hubo una reducción del crecimiento de las plantas con los tallos ensanchados (Figura 16).



**Figura 17.** Severidad de tumores en plantas de jitomate var. ramsés a los 40 ddi con los antagonistas AAC5 (*Alcaligenes faecalis*), AAC2 (*Delftia* spp.), AAC9 (*Pseudomonas citronenollis*), CPS (Consortio de *Pseudomonas* spp.) y *A. tumefaciens*. Inoculación de *A. tumefaciens* **A** y **C**) herida en el cuello del tallo con masa bacteriana, **B** y **D**) suspensión con  $1 \times 10^7$  UFC/mL en el sustrato. **D**) testigo sin inoculación.

En los testigos, las plantas inoculadas con *A. tumefaciens* (testigo 1) desarrollaron distintas protuberancias a lo largo del tallo y diferentes áreas; en algunas plantas se observó ensanchamiento del tallo que dará lugar a la formación de la agalla. Las plantas del testigo negativo no desarrollaron ningún síntoma (Figura 16).

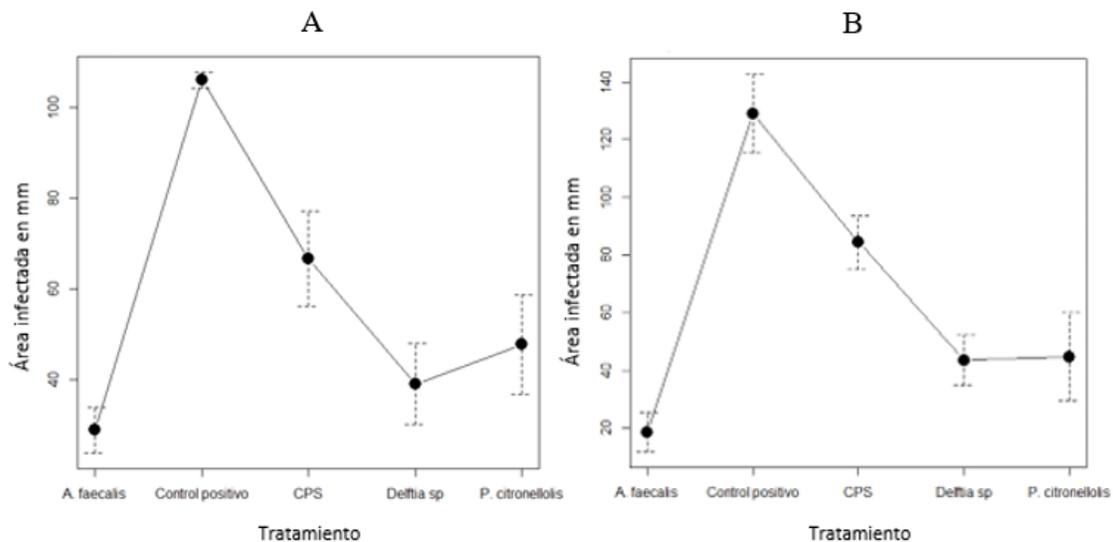
### 5.3.5. Análisis estadístico

Con los datos del área (mm) infectada (desarrollo de tumores) del tallo, los resultados del análisis estadístico (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) mostraron diferencias entre los tratamientos. Con la inoculación de *Alcaligenes faecalis* (AAC5), el área del tallo con tumores fue menor que el resto

de los antagonistas, seguido de *Delftia* sp. (AAC2) y *Pseudomonas citronellolis* (AAC9). Con la inoculación de consorcio de *Pseudomonas* spp. (CPS) no hubo diferencia con el testigo (Cuadro 7). En todos los tratamientos con los antagonistas, no hubo diferencia entre el método de inoculación de *A. tumefaciens* tanto por herida y masa bacteriana en el cuello del tallo como por suspensión bacteriana en el sustrato y el área infectada del tallo (Figura 18).

**Cuadro 8.** Área infectada del tallo (mm) con la inoculación de *A. tumefaciens* por herida y suspensión bacteriana en el sustrato y la interacción con los antagonistas.

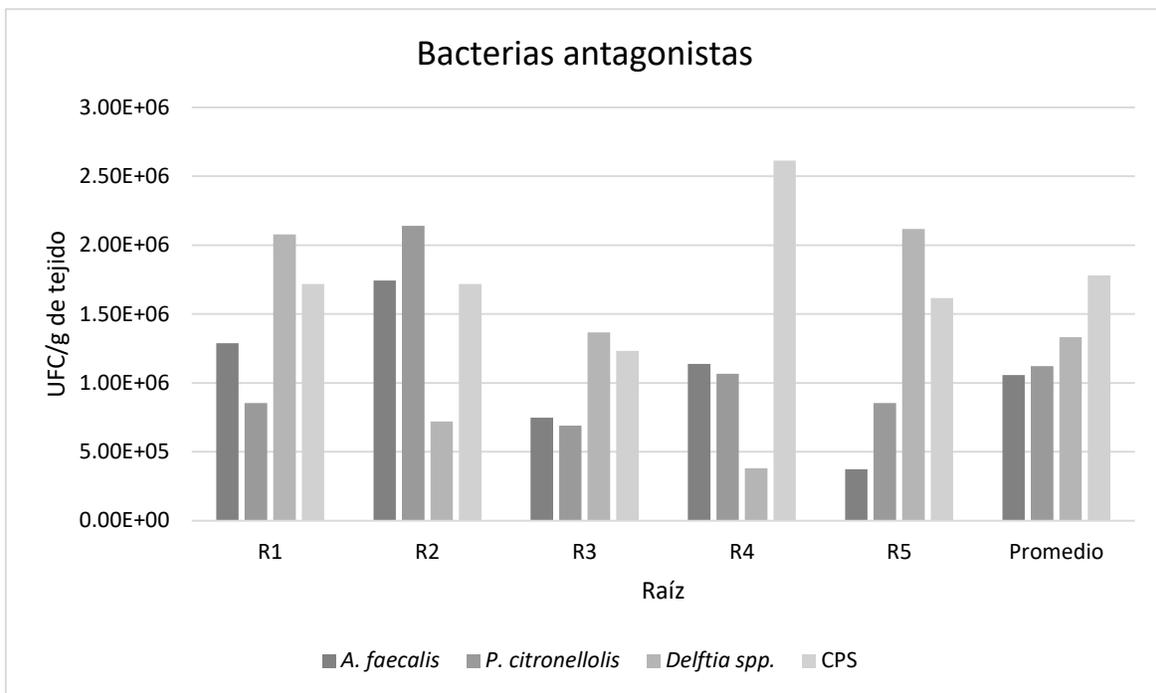
Inoculación <i>A. tumefaciens</i>	Tratamiento	Promedio de área infectada	Anova ( $\alpha=0.05$ )	Tukey ( $\alpha=0.05$ )
<b>Sustrato</b>	Control positivo	106		
	<i>A. faecalis</i>	28.92		0.0000163*
	<i>P. citronellolis</i>	47.74	0.000015	0.00056*
	<i>Delftia</i> sp.	39.06		0.0001064
	CPS	76.7		0.06
<b>Herida</b>	Control positivo	129		
	<i>A. faecalis</i>	18.66		0.0000086*
	<i>P. citronellolis</i>	44.78	0.0000087	0.00029*
	<i>Delftia</i> sp.	43.66		0.00025*
	CPS	84.42		0.07



**Figura 18.** Área infectada del tallo (mm) con la inoculación de *A. tumefaciens* + antagonistas. A) Suspensión bacteriana con  $1 \times 10^7$  en el sustrato. B) Herida y masa bacteriana en el cuello de la raíz.

### 5.3.6. Colonización de raíces por los antagonistas

A los 7 días después de la inoculación (inmersión) en la raíz de las plantas de jitomate var. ramsés, todos los antagonistas incluyendo el consorcio de *Pseudomonas* spp. (CPS) fueron reaislados de la raíz; lo cual demostró la eficiente colonización *in vivo* de los antagonistas en las raíces de las plantas de jitomate utilizados en esta investigación (Figura 19). No se observaron diferencias significativas en la densidad (UFC/g raíz) entre los antagonistas; sin embargo, se reaisló una mayor densidad promedio del consorcio de *Pseudomonas* spp. seguido de las cepas *Delftia* sp., *P. citronenollis* y *A. faecalis* (Figura 19).



**Figura 19.** Densidad de poblaciones en unidades formadoras de colonias (UFC/g raíz) de antagonistas reaislados a los 7 ddi en la raíz de jitomate var. ramsés.

**Antagonismo *in vitro* e *in vivo*.** En esta investigación se aislaron e identificaron con mayor frecuencia a *Alcaligenes faecalis*, *Delftia* sp., *Pseudomonas citronenollis* y *Pseudomonas* spp. del tejido de tumores en frambuesa causado por *A. tumefaciens* y se evaluaron como potenciales antagonistas *in vitro* e *in vivo* en plantas de jitomate contra este patógeno.

*Alcaligenes faecalis* fue la cepa con mayor grado de antagonismo *in vitro* y protección *in vivo* contra *A. tumefaciens*. *A. faecalis* pertenece a la clase de las  $\beta$ -proteobacterias, gram negativa,

baciliforme, crece óptimamente a 37°C y puede sobrevivir en ambientes alcalinos, de lo cual deriva la nomenclatura del género. Genéticamente está relacionada con *Pseudomonas*, su genoma alberga genes que le permiten catalizar fenoles y metabolizar diversos compuestos aromáticos por lo cual se ha utilizado en biorremediación (Klem, 1999; Basharat *et al.*, 2018).

Cepas de *A. faecalis* se han estudiado como antagonistas y eficientes agentes de biocontrol contra patógenos causantes de enfermedades bacterianas y fúngicas. El antagonismo de *A. faecalis* se relaciona con su actividad bacteriostática y fungistática (Yokoyama *et al.*, 2013). Poblaciones de *A. faecalis* se han identificado como endófitas en diversas especies vegetales, así como habitantes naturales del suelo. Como endófito se asocia con la síntesis de fitohormonas, promoción del crecimiento en plantas y protección contra la infección de patógenos (Saikia *et al.*, 2022). Se reporta que *A. faecalis* estimula las vías de defensa de la planta hospedante ante el estrés ambiental y la resistencia a la lisis celular, así como la inducción para la producción de compuestos fenólicos y antioxidantes en plantas (Ray *et al.*, 2020).

La eficiente metabolización de componentes fenólicos y aminoácidos podría sugerir la capacidad de colonizar el tejido de la agalla de la corona. Así mismo, se ha identificado como endófito en diferentes especies de plantas como promotora del crecimiento, y con capacidad de biotransformar compuestos tóxicos (Basharat *et al.*, 2018; Ray *et al.*, 2020). En tejidos animales, *A. faecalis* muestra actividad antagónica mediada por la producción de compuestos antimicrobianos resistentes a temperaturas y actividad enzimática, los cuales se sintetizan en la fase de crecimiento exponencial inhibiendo con éxito bacterias gram negativas y positivas (Ilham *et al.*, 2013); lo anterior puede explicar que en esta investigación no fue posible evidenciar la producción de metabolitos y enzimas involucrados en el antagonismo de *A. tumefaciens* de todas las cepas aisladas del tejido del tumor; es posible que el tiempo de 48 h de crecimiento establecido no fue suficiente para alcanzar la fase exponencial relacionada con la síntesis de metabolitos involucrados en el antagonismo contra *A. tumefaciens*.

En esta investigación, *A. faecalis* no suprimió la infección por *A. tumefaciens* en plantas de jitomate; sin embargo, redujo significativamente la severidad de tumores. Cepas de *A. faecalis* se han utilizado como agentes de biocontrol, su genoma alberga genes para producir compuestos antimicrobianos de origen proteico, péptidos antimicrobianos y sideróforos; su utilización en la agricultura es amplia y funcional considerándose una especie de importancia ecológica (Sayed y

Chincholkar, 2009; Liu *et al.*, 2016; Lahlali *et al.*, 2020). Así mismo, Odesa *et al.*, (2019) analizó la comunidad bacteriana en flores y bayas de uva de plantas infectadas por *Agrobacterium* spp., y demostró que *A. faecalis* y *Agrobacterium* coexisten en este nicho, resaltando la capacidad de convivencia de *Agrobacterium* con bacterias antagónicas. Lo anterior sugiere que la presencia de *A. faecalis* en la agalla de la corona de frambuesa tienen una relación con la convivencia con *A. tumefaciens* y que estudios futuros se deben enfocar en dilucidar los factores que determinan esta relación de convivencia para entender con mayor profundidad su potencial como agente de control contra este patógeno.

*Delftia* spp. es un género que se ha considerado con potencial para la biorremediación, son bacterias gram negativas, aerobias obligadas, con una amplia capacidad metabólica; se asocia colonizando diversos nichos como rizósfera, suelos, agua dulce, salada y lodos activados con capacidad de adquirir nutrientes primarios como fructosa, manitol y aminoácidos (Wen *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2009; Braña *et al.*, 2016). Especies dentro este género también se reportan como promotoras de crecimiento mediado por la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas que aumentan el tamaño de las raíces y sideróforos para la captación de hierro, lo cual se relaciona con la competencia por espacio y nutrientes; algunas especies producen compuestos antimicrobianos y tienen la capacidad de biotransformar compuestos orgánicos e inorgánicos; como biofertilizante han demostrado mejorar la producción de biomasa vegetal por lo cual ha sido de interés su aplicación en la agricultura (Braña *et al.*, 2016; Morel *et al.*, 2016; Cagide *et al.*, 2018).

Otras investigaciones reportan su eficiencia como agente de biocontrol contra bacterias fitopatógenas como el caso de *Pectobacterium carotovorum* (Ubalde *et al.*, 2012; Maisuria y Nerurkar, 2015). Se han descrito diversas especies dentro del género *Delftia* con mecanismos de acción diferentes pero eficientes para inhibir a bacterias fitopatógenas; una de las estrategias más estudiadas se relaciona con la producción de enzimas que interfieren en los sistemas de Quorum Sensing (QS) en procariontes (Jorgensen *et al.*, 2009; Maisuria y Nerurkar, 2015).

Entre las especies en este género capaces de inhibir las señales QS mediado por la producción de enzimas, se han identificado a *Delftia tsuruhatensis*, *D. lacustris* y *D. acidovorans*. *D. tsuruhatensis* fue la primera especie caracterizada como antagonista y promotora del crecimiento dentro del género; esta especie se aisló de la rizósfera de plantas de arroz y mostró

antagonismo eficiente contra los patógenos *Xanthomonas oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Pyricularia oryzae* (Han *et al.*, 2005). *Delftia* sp. al igual que las otras especies identificadas y aisladas a partir de tejido de la agalla de la corona en frambuesa, son microorganismos que en otras investigaciones mostraron una amplia adaptación metabólica y resistencia a condiciones ambientales adversas, manteniendo una relación estrecha con el hospedante principalmente como bacterias promotoras de crecimiento (Agafonova *et al.*, 2017; Hesse *et al.*, 2018; Sansinenea *et al.*, 2019; Ray *et al.*, 2020).

En este estudio, la identificación mediante la amplificación del gen 16S rARN evidenció la presencia de bacterias del género *Delftia* en el tejido de la agalla de la corona en frambuesa, el análisis filogenético mostró que esta cepa se encuentra dentro del clado de este género y se relacionó filogenéticamente con la especie *D. acidovorans*, la cual ha sido comprobada como promotora de crecimiento de plantas (Agafonova *et al.*, 2017; Khalifa y AlMalki, 2019).

*Pseudomonas citronellolis* es una bacteria gram negativa dentro de la familia Pseudomonadaceae. Esta especie se ha estudiado por su capacidad para degradar hidrocarburos y su potencial para reducir contaminantes como agente de biorremediación. Es eficiente colonizador de diversos nichos como suelos; se reconoce como habitante natural de la filósfera en plantas en donde establece una interacción de competencia por la producción de sideróforos y degradación de terpenoides, desplazando otras bacterias en este nicho ecológico (Remus-Emsermann *et al.*, 2016).

Cepas de *P. citronellolis* se relacionan como antagonistas en suelos agrícolas, eficientes para suprimir enfermedades fúngicas y bacterianas (Haas y Keel, 2003). En este estudio, la cepa *P. citronenollis* aislada de tumores mostró el menor Índice de Eficiencia Antagonista *in vitro* contra *A. tumefaciens*; sin embargo, fue considerada para las pruebas *in vivo* por inducir *in vitro* la formación de un halo de crecimiento bacteriano, relacionado con la motilidad, formación de biopelículas y potencial producción de antimicrobianos y estimulantes promotores de crecimiento (Khan *et al.*, 2009; D'aes *et al.*, 2014;). En las pruebas *in vivo*, la severidad de tumores fue significativamente menor con respecto al testigo. Este resultado se podría atribuir a su capacidad de colonización de raíces; en esta investigación se utilizó una densidad de inóculo de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Otros estudios demostraron que la eficiente protección contra fitopatógenos por *P. citronenollis* depende de altas densidades de inóculo (Haas y Keel, 2003; Remus-Emsermann *et*

*al.*, 2016). Lo anterior sugiere que estudios futuros se deben enfocar en la evaluación de densidades más altas de inóculo de esta y las otras cepas para una probable mejor protección contra *A. tumefaciens*.

**Antagonismo de *Pseudomonas* sp en consorcio.** El género *Pseudomonas* ha sido ampliamente estudiado como agente de biocontrol (Haas y Keel, 2003; Remus-Emsermann *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017). Se conoce que la dinámica cooperativa entre especies bacterianas favorece la colonización de un nicho determinado. El establecimiento de un consorcio bacteriano demanda la competencia por nutrientes con base en una densidad poblacional óptima entre las bacterias que actúan en consorcio; sin embargo, también se ha demostrado que la funcionalidad de un consorcio bacteriano puede afectarse cuando algún factor de la interacción incrementa o disminuye la densidad de una o más especies involucradas en el consorcio (Platt *et al.*, 2012).

En esta investigación, la inoculación en la raíz de plantas de jitomate variedad ramsés con un consorcio de ocho cepas de *Pseudomonas* spp. aisladas de la agalla de la corona en frambuesa, no tuvo efecto en el desarrollo de tumores siendo estadísticamente igual que el testigo inoculado únicamente por *A. tumefaciens*.

El control biológico de *A. tumefaciens* es difícil de alcanzar en condiciones de campo. Existen estudios que evidencian que *Pseudomonas* sp. muestran alta actividad de antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens*, pero ineficiente antagonismo con la inoculación *in vivo* en plantas; por ejemplo, Barton *et al.*, (2018) observó que una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* mostró fuerte antagonismo *in vitro* contra *A. tumefaciens* pero fue ineficiente en inoculaciones *in vivo* contra el desarrollo de tumores causados por *A. tumefaciens*, atribuyendo este efecto a la mayor capacidad de *A. tumefaciens* de contrarrestar el efecto antagonista y retomar el control celular y colonización del tumor. Lo anterior podría explicar el nulo efecto de la inoculación en consorcio de *Pseudomonas* spp. contra la infección y desarrollo de tumores por *A. tumefaciens* en este estudio. Así mismo, podría evidenciar que la interacción con el ambiente altamente específico en el tejido del tumor juega un papel fundamental en la interacción bacteriana (Akiyoshi *et al.*, 1987; McCarthy *et al.*, 2019).

En esta investigación se identificaron las especies *P. citronellolis*, *P. putida*. y *P. plecoglossicida* con la mayor frecuencia de aislamiento en el tejido de la agalla de frambuesa.

Especies de este género han sido ampliamente estudiadas como habitantes naturales en diversos nichos ecológicos por su capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuentes de energía, producir compuestos antimicrobianos, actividad como promotoras de crecimiento vegetal, competencia por la adquisición de hierro y por su eficiencia para evadir compuestos antimicrobianos; lo anterior los caracteriza como microorganismos con una amplia aptitud ecológica para el control biológico ( Berendsen *et al.*, 2015; Hesse *et al.*, 2018).

Otras investigaciones destacan que el medio ambiente que rodea a la plantas hospedantes influye en la interacción entre bacterias de múltiples taxones; se ha comprobado que especies de *Pseudomonas* y *Agrobacterium* pueden establecer una comunicación estrecha más allá de la coexistencia, ya que mantienen una comunicación activa mediante la producción de citocinas para la colonización endófitas, formación de biopelículas, aumento de poblaciones bacterianas y la capacidad de *Pseudomonas* de adquirir genes para la biotransformación de las opinas producidas por *A. tumefaciens* (Yamada *et al.*, 1985; Akiyoshi *et al.*, 1987; An *et al.*, 2006). Así mismo, *Pseudomonas* spp. naturalmente son colonizadoras de la raíz, principalmente habitan en la epidermis, y sitios de exudación; en la agalla de la corona ocurre abundante exudación de agua y nutrientes lo cual pudiera explicar el éxito para colonizar este tejido (An *et al.*, 2006).

Los patógenos de plantas puede desarrollar diferentes estrategias de colonización; entre estos, *A. tumefaciens*, agente causal de la agalla de la corona, se caracteriza por inducir el desarrollo de tumores mediado por la inserción del plásmido Ti en el genoma de la planta hospedante. Este tumor se considera un nicho de colonización altamente específico ya que durante su desarrollo (tumorigénesis) se producen fuentes de carbono exclusivos para las poblaciones de *A. tumefaciens*; sin embargo, es posible que también colonicen otras poblaciones bacterianas que compitan por la asimilación de los mismos nutrientes en este nicho específico. En esta investigación, se evidenció que *A. faecalis*, *Delftia* sp. aislados con mayor frecuencia del tejido de tumores en frambuesa, reducen la severidad de tumores en plantas de jitomate inoculados con *A. tumefaciens* en condiciones de invernadero.

## VI. CONCLUSIONES

*A. tumefaciens* biovar 1 es el agente causal de la agalla de la corona de frambuesa. La cepa A1 identificada como *A. tumefaciens* mediante PCR por la amplificación y secuenciación del gen *VirD2* causó tumores con la inoculación *in vitro* en rodajas de zanahoria, así como *in vivo* en plantas de jitomate y girasol en invernadero. Lo anterior sugiere que la amplificación y secuenciación de este gen puede ser una estrategia útil para identificar cepas tumorogénicas de *A. tumefaciens*.

En el tejido de la agalla de la corona en frambuesa colonizan otras bacterias fuera del género *Agrobacterium* en diferente densidad poblacional; sin embargo, la diversidad de estas poblaciones es limitada. *Pseudomonas* spp. son más abundantes y frecuentes colonizadoras de la agalla, seguido de *Bacillus* spp. Otros géneros aislados con alta frecuencia fueron *Alcaligenes* y *Delftia*. La síntesis de nutrientes específicos en la agalla podría estar influenciando la prevalencia de estos géneros y la relación común de convivencia con *A. tumefaciens*.

La agalla de la corona en frambuesa alberga bacterias antagonistas *in vitro* e *in vivo* contra *A. tumefaciens*. La secuenciación del gen 16S rARN identificó a *Alcaligenes faecalis*, *Delftia* sp. y *Peudomonas citronellolis* como antagonistas *in vitro* de *A. tumefaciens*. La inoculación *in vivo* de *Alcaligenes faecalis* en la raíz de tomate produjo significativamente la mayor protección y menor severidad de síntomas, seguido de *Delftia* sp. y *Peudomonas citronellolis*.

La inoculación del consorcio de *Pseudomonas* spp. no tiene ningún efecto en el desarrollo de tumores causados por *A. tumefaciens*. Los resultados de otras investigaciones indican que la densidad de inóculo de los mismos antagonistas aquí evaluados, es un factor importante en la eficiencia antagonista *in planta*; lo anterior sugiere que estudios futuros podrían enfocarse en la evaluación de densidades de inóculo mayores de los antagonistas utilizados en esta investigación para inducir probablemente una mayor protección contra la infección y desarrollo de tumores por *A. tumefaciens*.

La inoculación de las bacterias antagonistas *Alcaligenes faecalis*, *Delftia* sp. y *Peudomonas citronellolis* y consorcio de *Pseudomonas* spp. en la raíz de jitomate mostraron una colonización eficiente de la raíz. Todos los antagonistas fueron reaislados 7 días después de la inoculación en condiciones de invernadero. Este modelo de estudio podría ser útil para futuras investigaciones

sobre la interacción de antagonistas de diversos nichos ecológicos para el control de *A. tumefaciens*.

Las bacterias antagonistas aisladas del tejido de tumores no suprimieron la infección *in vivo* de *A. tumefaciens* en plantas de jitomate; sin embargo, redujeron la severidad de tumores en el tallo de las plantas inoculadas. La inoculación de *Alcaligenes faecalis* produjo la menor área de infección del tallo y severidad de síntomas. Principalmente las cepas *A. faecalis* y *Delftia* sp. aisladas en esta investigación pueden ser útiles para futuras aplicaciones biotecnológicas como agentes de biocontrol contra este patógeno; otros estudios deberán enfocarse en dilucidar con mayor profundidad las bases fisiológicas y metabólicas que están involucrados con la interacción y antagonismo de estas cepas contra *A. tumefaciens*.

## VII. LITERATURA CITADA

- A. Morel, M., Iriarte, A., Jara, E., Musto, H., Castro-Sowinski, S., 1 Unidad Microbiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av Italia 3318, 11600, Montevideo, Uruguay, 2016. Revealing the biotechnological potential of *Delftia* sp. JD2 by a genomic approach. *AIMS Bioeng.* 3, 156–175. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.2.156>
- Abrahamovich, E., López, A.C., Alippi, A.M., 2014. Diversidad de cepas de *Agrobacterium rubi* aisladas de arándanos. *Rev. Argent. Microbiol.* 46, 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70078-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70078-1)
- Agafonova, N.V., Doronina, N.V., Kaparullina, E.N., Fedorov, D.N., Gafarov, A.B., Sazonova, O.I., Sokolov, S.L., Trotsenko, Yu.A., 2017. A novel *Delftia* plant symbiont capable of autotrophic methylophony. *Microbiology* 86, 96–105. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010039>
- Ahmed, R., Akira, S., Aktories, K., Casadevall, A., Compans, R.W., Galan, J.E., Garcia, S.A., Iwasaki, A., Malissen, B., Palme, K., Rappuoli, R., 2018. *Agrobacterium* Biology. From Basic Science to Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg, New York, NY.
- Akiyoshi, D.E., Regier, D.A., Gordon, M.P., 1987. Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* 169, 4242–4248. <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4242-4248.1987>
- Alippi, A.M., López, A.C., Balatti, P.A., 2012. Diversity among agrobacteria isolated from diseased plants of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 415–430. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0001-x>
- Alippi, A.M., López, A.C., Balatti, P.A., 2011. Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Rev. Argent. Microbiol.* 10.
- Alippi, A.M., Lopez, A.C., Balatti, P.A., 2010. First Report of *Agrobacterium rubi* and *A. rhizogenes* Causing Crown and Root Gall and Hairy Root on Blueberry in Argentina. *Plant Dis.* 94, 1064–1064. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1064C>

- Aloni, R., Ullrich, C.I., 2008. Biology of Crown Gall Tumors, in: Tzfira, T., Citovsky, V. (Eds.), *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. Springer, New York, NY, pp. 565–591. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72290-0_15)
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., Parsek, M.R., 2006. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 3828–3833. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511323103>
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.-M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., Mysore, K.S., 2008a. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 146, 703–715. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>
- Anand, A., Uppalapati, S.R., Ryu, C.-M., Allen, S.N., Kang, L., Tang, Y., Mysore, K.S., 2008b. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 146, 323–324. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111302>
- Andrade, G.M. de, Sartoretto, L.M., Brasileiro, A.C.M., 2003. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. *Fitopatol. Bras.* 28, 465–476. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000500001>
- Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., Finlay, B.B., 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156, 2271–2282. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038794-0>
- Ash, C., 2020. *Agrobacteria* virulence writ large. *Science* 368, 1076–1078. <https://doi.org/10.1126/science.368.6495.1076-k>
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>

- Barton, I.S., Fuqua, C., Platt, T.G., 2018. Ecological and evolutionary dynamics of a model facultative pathogen: *Agrobacterium* and crown gall disease of plants. *Environ. Microbiol.* 20, 16–29. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13976>
- Basharat, Z., Yasmin, A., He, T., Tong, Y., 2018. Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. *Sci. Rep.* 8, 3616. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21919-4>
- Bauer, W.D., Robinson, J.B., 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 234–237. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00310-5)
- Berendsen, R.L., van Verk, M.C., Stringlis, I.A., Zamioudis, C., Tommassen, J., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2015. Unearthing the genomes of plant-beneficial *Pseudomonas* model strains WCS358, WCS374 and WCS417. *BMC Genomics* 16, 539. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1632-z>
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V., 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol. Plant Pathol.* 11, 705–719. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x>
- Braña, V., Cagide, C., Morel, M.A., 2016. The Sustainable Use of *Delftia* in Agriculture, Bioremediation, and Bioproducts Synthesis, in: Castro-Sowinski, S. (Ed.), *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*, *Microorganisms for Sustainability*. Springer, Singapore, pp. 227–247. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_11)
- Bravo-Angel, A.M., Hohn, B., Tinland, B., 1998. The Omega Sequence of VirD2 Is Important but Not Essential for Efficient Transfer of T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 11, 57–63. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.1.57>
- Brencic, A., Winans, S.C., 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155–194. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.155-194.2005>

- Cagide, C., Riviezzi, B., Minteguiaga, M., Morel, M.A., Castro-Sowinski, S., 2018. Identification of Plant Compounds Involved in the Microbe-Plant Communication During the Coinoculation of Soybean with *Bradyrhizobium elkanii* and *Delftia* sp. strain JD2. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 31, 1192–1199. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-18-0080-CR>
- Chen, H.-Y., Lin, C.-C., Wang, C.-W., Lin, N.-C., 2022. First Report of *Agrobacterium tumefaciens* Causing Crown Gall Disease of Roselle ( *Hibiscus sabdariffa* ) in Taiwan. *Plant Dis.* 106, 313. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-1007-PDN>
- Chen, L., 2021. Phenotypic and Genetic diversity of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut orchards in California. UC Davis.
- Clarence I. K., 2020. Crown gall [WWW Document]. Crown Gall. URL <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/CrownGall.aspx> (Accessed 5.2.22).
- Cubero, J., Lopez, M.M., 2001. An Efficient Microtiter System to Determine *Agrobacterium* Biovar. 2001 4.
- D'aes, J., Kieu, N.P., Léclère, V., Tokarski, C., Olorunleke, F.E., De Maeyer, K., Jacques, P., Höfte, M., Ongena, M., 2014. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a: Cyclic lipopeptides of *Pseudomonas* CMR12a. *Environ. Microbiol.* 16, 2282–2300. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12462>
- Deeken, R., Engelmann, J.C., Efetova, M., Czirjak, T., Tietz, O., Krischke, M., Mueller, M.J., Palme, K., Dandekar, T., Hedrich, R., 2006. An Integrated View of Gene Expression and Solute Profiles of Arabidopsis Tumors: A Genome-Wide Approach W. *Plant Cell* 18, 3617–3634. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044743>
- Díaz, D.M., Sen, A.S. de la, 2011. Sistemas de quorum sensing en bacterias. *REDUCA Biol.* 3.
- Escobar, M.A., Dandekar, A.M., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* 8, 380–386. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)

- Faist, H., Keller, A., Hentschel, U., Deeken, R., 2016. Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5542–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., Stanković, S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J. Biotechnol.* 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Flores-Félix, J.D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., Velázquez, E., 2020. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126046>
- Forbes, B.A., 2009. *Diagnostico Microbiologico*. Ed. Médica Panamericana.
- Gelvin, S.B. (Ed.), 2018. *Agrobacterium Biology: From Basic Science to Biotechnology, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03257-9>
- Gelvin, S.B., 2017. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annu. Rev. Genet.* 51, 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Gelvin, S.B., 2012. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's Journey to the Host Genome. *Front. Plant Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
- Gelvin, S.B., 2009. *Agrobacterium* in the Genomics Age. *Plant Physiol.* 150, 1665–1676. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139873>
- Genov, N., Llop, P., López, M.M., Bobev, S.G., Álvarez, B., 2015. Molecular and phenotypic characterization of *Agrobacterium* species from vineyards allows identification of typical *Agrobacterium vitis* and atypical biovar 1 strains. *J. Appl. Microbiol.* 118, 1465–1477. <https://doi.org/10.1111/jam.12791>
- Gohlke, J., Deeken, R., 2014. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00155>

- González F., H., Fuentes M., N., 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Rev. Cienc. Agríc.* 34, 17–31. <https://doi.org/10.22267/rcia.173401.61>
- Gonzalez-Mula, A., Lachat, J., Mathias, L., Naquin, D., Lamouche, F., Mergaert, P., Faure, D., 2019. The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytol.* 222, 455–467. <https://doi.org/10.1111/nph.15598>
- Gordon, J.E., Christie, P.J., 2014. The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiol. Spectr.* 2, 2.6.19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013>
- Haas, D., Keel, C., 2003. REGULATION OF ANTIBIOTIC PRODUCTION IN ROOT-COLONIZING *PSEUDOMONAS* SPP. AND RELEVANCE FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PLANT DISEASE. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 117–153. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>
- Haas, J.H., Moore, L.W., Ream, W., Manulis, S., 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2879–2884. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2879-2884.1995>
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., Song, W., 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.09.003>
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C.T., Shaffer, B.T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K.A., Varghese, N., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., Kyrpides, N., Woyke, T., Loper, J.E., 2018. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environ. Microbiol.* 20, 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>
- Ilham, Z., Abdellah, H., Wifak, B., Mohammed, I., Saad, I., 2013. A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 5314–5323. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6029>

- Johansson, J.F., Paul, L.R., Finlay, R.D., 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.11.012>
- Jorgensen, N.O.G., Brandt, K.K., Nybroe, O., Hansen, M., 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2195–2199. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.008375-0>
- Karimi, B., Terrat, S., Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Horrigue, W., Lelièvre, M., Nowak, V., Jolivet, C., Arrouays, D., Wincker, P., Cruaud, C., Bispo, A., Maron, P.-A., Bouré, N.C.P., Ranjard, L., 2018. Biogeography of soil bacteria and archaea across France. *Sci. Adv.* 4, eaat1808. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat1808>
- Khalifa, A.Y.Z., AlMalki, M., 2019. Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa*. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 1262–1267. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.015>
- Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Oves, M., 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ. Chem. Lett.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0155-0>
- Klem, T.J., 1999. ALCALIGENES, in: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 38–42. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0040>
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W.J., 2019. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.* 10, 845. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., Samaj, J., 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1024–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>

- Kuehl, R.O., Kuehl, R.O., 2000. Design of experiments: statistical principles of research design and analysis, 2nd ed. ed. Duxbury/Thomson Learning, Pacific Grove, CA.
- Lacroix, B., Citovsky, V., 2019. Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. *Annu. Rev. Phytopathol.* 57, 231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>
- Lahlali, R., Aksissou, W., Lyousfi, N., Ezrari, S., Blenzar, A., Tahiri, A., Ennahli, S., Hrustić, J., MacLean, D., Amiri, S., 2020. Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. *Microb. Pathog.* 139, 103914. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914>
- Landa, B.B., Mavrodi, O.V., Schroeder, K.L., Allende-Molar, R., Weller, D.M., 2006. Enrichment and genotypic diversity of phlD-containing fluorescent *Pseudomonas* spp. in two soils after a century of wheat and flax monoculture: *Pseudomonas* spp. in soils after wheat and flax monoculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 351–368. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00038.x>
- Liu, X., Huang, D., Wu, J., Yu, C., Zhou, R., Liu, C., Zhang, W., Yao, J., Cheng, M., Guo, S., 2016. The Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* NBIB-017 Contains Genes with Potentially High Activities against *Erwinia carotovora*. *Genome Announc.* 4, e00222-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00222-16>
- Loh, J., Pierson, E.A., Pierson, L.S., Stacey, G., Chatterjee, A., 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 285–290. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00274-1)
- Maisuria, V.B., Nerurkar, A.S., 2015. Interference of Quorum Sensing by *Delftia* sp. VM4 Depends on the Activity of a Novel N-Acylhomoserine Lactone-Acylase. *PLOS ONE* 10, e0138034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138034>
- Martínez, E., Palacios, R., Sánchez, F., 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169, 2828–2834. <https://doi.org/10.1128/jb.169.6.2828-2834.1987>

- McCarthy, R.R., Yu, M., Eilers, K., Wang, Y., Lai, E., Filloux, A., 2019. Cyclic di-GMP inactivates T6SS and T4SS activity in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol.* 112, 632–648. <https://doi.org/10.1111/mmi.14279>
- Meyer, T., Thiour-Mauprivez, C., Wisniewski-Dyé, F., Kerzaon, I., Comte, G., Vial, L., Lavire, C., 2019. Ecological Conditions and Molecular Determinants Involved in *Agrobacterium* Lifestyle in Tumors. *Front. Plant Sci.* 10, 978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00978>
- Nester, E.W., 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
- Odesa M., Limanska, N., Galkin, M., Odesa Mechnikov National University, Marynova, I., Odesa Mechnikov National University, Ivanytsia, V., Odesa Mechnikov National University, 2019. Detection of Phytopathogens *Agrobacterium* spp. and their Antagonists *Bacillus thuringiensis*, *Alcaligenes faecalis* and *Lactobacillus plantarum* in Flowers and Berries of Grape. *Mikrobiol. Zh.* 81, 42–53. <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj81.04.042>
- Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L.E., Rogel, M.A., González, V., Peralta, H., Mora, J., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2015. Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>
- Platt, T.G., Fuqua, C., Bever, J.D., 2012. Resource and competitive dynamics shape the benefits of public goods cooperation in a plant pathogen: resource competition and public goods cooperation. *Evolution* 66, 1953–1965. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01571.x>
- Pulawska, J., 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *agrobacterium* spp. *J. Plant Pathol.* 92, S87–S98.
- Quispe-Huamanquispe, D.G., Gheysen, G., Kreuze, J.F., 2017. Horizontal Gene Transfer Contributes to Plant Evolution: The Case of *Agrobacterium* T-DNAs. *Front. Plant Sci.* 8, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02015>
- Ray, S., Swapnil, P., Singh, P., Singh, S., Sarma, B.K., Singh, H.B., 2020. Endophytic *Alcaligenes faecalis* mediated redesigning of host defense itinerary against *Sclerotium rolfsii* through

- induction of phenolics and antioxidant enzymes. *Biol. Control* 150, 104355. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104355>
- Remus-Emsermann, M.N.P., Schmid, M., Gekenidis, M.-T., Pelludat, C., Frey, J.E., Ahrens, C.H., Drissner, D., 2016. Complete genome sequence of *Pseudomonas citronellolis* P3B5, a candidate for microbial phyllo-remediation of hydrocarbon-contaminated sites. *Stand. Genomic Sci.* 11, 75. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0190-6>
- Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y., Gardan, L., 2000. Characterization of Plasmid-Borne and Chromosome-Encoded Traits of *Agrobacterium* Biovar 1, 2, and 3 Strains from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1818–1825. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1818-1825.2000>
- Saikia, B., Gogoi, S., Savani, A.K., Bhattacharyya, A., 2022. Metabolites and peptides of endophytic origin in plant growth promotion and defense reactions in Solanaceous crop tomato, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 89–110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85579-2.00005-8>
- Sansinenea, E., 2019. *Bacillus* spp.: As Plant Growth-Promoting Bacteria, in: Singh, H.B., Keswani, C., Reddy, M.S., Sansinenea, E., García-Estrada, C. (Eds.), *Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications*. Springer, Singapore, pp. 225–237. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11)
- Sayed, R.Z., Chincholkar, S.B., 2009. Siderophore-Producing *Alcaligenes faecalis* Exhibited More Biocontrol Potential Vis-à-Vis Chemical Fungicide. *Curr. Microbiol.* 58, 47–51. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9264-z>
- Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I., 2020. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* 2020, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

- Schaad N. W., Jones J. B., Chun W. (2000) Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacterial. Tercera edición. Editorial Amer Phytopathological Society
- SENASICA, 2019. Berries mexicanas, caso de éxito [WWW Document]. gob.mx. URL <http://www.gob.mx/senasica/articulos/berries-mexicanas-caso-de-exito> (accessed 5.3.22).
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K.L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H., Wood, D.W., 2009. Genome Sequences of Three *Agrobacterium* Biovars Help Elucidate the Evolution of Multichromosome Genomes in Bacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2501–2511. <https://doi.org/10.1128/JB.01779-08>
- Slifkin, M., 2000. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4626–4628. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.12.4626-4628.2000>
- Spanu, P.D., Panstruga, R., 2017. Editorial: Biotrophic Plant-Microbe Interactions. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00192>
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X., Zou, H., 2017. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biol. Control* 114, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.015>
- Szegedi, E., Czakó, M., Otten, L., Koncz, C.S., 1988. Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32, 237–247. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(88\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(88)80020-1)
- Tzfira, T., Citovsky, V., 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Mol. Plant Pathol.* 1, 201–212. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00026.x>
- Ubalde, M.C., Braña, V., Sueiro, F., Morel, M.A., Martínez-Rosales, C., Marquez, C., Castro-Sowinski, S., 2012. The Versatility of *Delftia* sp. Isolates as Tools for Bioremediation and

- Biofertilization Technologies. *Curr. Microbiol.* 64, 597–603.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-012-0108-5>
- van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A., 2018. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63, 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- von Bodman, S.B., Bauer, W.D., Coplin, D.L., 2003. Quorum sensign in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 455–482.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095652>
- Wang, C., Ye, F., Chang, C., Liu, X., Wang, Jianhe, Wang, Jinpei, Yan, X.-F., Fu, Q., Zhou, J., Chen, S., Gao, Y.-G., Zhang, L.-H., 2019. Agrobacteria reprogram virulence gene expression by controlled release of host-conjugated signals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 22331–22340. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903695116>
- Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S., Sly, L.I., 1999. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49, 567–576. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-567>
- Wong González, E., 2010. ¿Después de un análisis de variancia?qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agron. Mesoam.* 21, 349. <https://doi.org/10.15517/am.v21i2.4899>
- Wu, C.-F., Santos, M.N.M., Cho, S.-T., Chang, H.-H., Tsai, Y.-M., Smith, D.A., Kuo, C.-H., Chang, J.H., Lai, E.-M., 2019. Plant-Pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* Strains Have Diverse Type VI Effector-Immunity Pairs and Vary in In-Planta Competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interactions®* 32, 961–971. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0021-R>
- Xu, N., Yang, Q., Yang, X., Wang, M., Guo, M., 2021. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant Pathol.* 22, 348–360. <https://doi.org/10.1111/mpp.13032>

- Yaakov, N., Barak, Y., Pereman, I., Christie, P.J., Elbaum, M., 2017. Direct fluorescence detection of VirE2 secretion by *Agrobacterium tumefaciens*. PLOS ONE 12, e0175273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175273>
- Yamada, T., Palm, C.J., Brooks, B., Kosuge, T., 1985. Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 6522–6526. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6522>
- Yang, Q., Li, X., Tu, H., Pan, S.Q., 2017. Agrobacterium-delivered virulence protein VirE2 is trafficked inside host cells via a myosin XI-K-powered ER/actin network. Proc. Natl. Acad. Sci. 114, 2982–2987. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612098114>
- Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S., Kohyama, E., 2013. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. J. Gen. Appl. Microbiol. 59, 89–95. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.089>