



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Control de la marchitez vascular del tomate
causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* por
cepas de *Acinetobacter* sp. productoras de sideróforos**

Yeinny Carolina Pisco Ortiz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Medellín, Colombia
2022

**Control de la marchitez vascular del tomate
causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* por
cepas de *Acinetobacter* sp. productoras de sideróforos**

Yeinny Carolina Pisco Ortiz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Director (a):

Ph.D. Carol Viviana Amaya Gómez

Codirector (a):

Ph.D. Adriana González Almario

Línea de Investigación: Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2022

A mi hija Allison Hernández Pisco, por ser mi fuente de inspiración

A mi madre Carola Ortiz, por su ejemplo y por enseñarme que con disciplina y constancia se llega al éxito. Gracias por su amor desmedido y paciencia.

Declaración de obra original

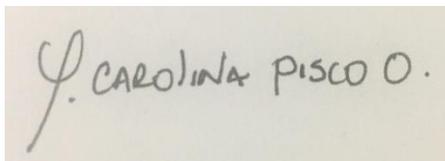
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Y. CAROLINA PISCO O.

Yeinny Carolina Pisco Ortiz

06 de mayo de 2022

Agradecimientos

A DIOS, por permitirme dar un paso más hacia el logro de mis sueños.

A mi directora Carol Amaya Gómez por la oportunidad y confianza brindada para desarrollar este trabajo. Por transmitirme su pasión por la investigación y la microbiología, y por su apoyo.

A mi codirectora Adriana González Almario por su calidad humana, por su paciencia y su disposición incondicional para orientarme. Además de contribuir a mi formación profesional.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín por haberme permitido formar parte de su comunidad educativa.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA por el permiso de estudio y por permitirme hacer uso de los laboratorios y equipos para el desarrollo de esta investigación.

Al equipo de investigadores que participó en la Expedición Colombia Cacao-Bio (convenio especial de cooperación FP44842-142-2018 Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación) por proporcionarme las muestras ambientales que fueron el punto de inicio de esta investigación

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Agrícola del C.I La Libertad de AGROSAVIA, en cabeza de Jamer Jimenez, por su gestión para facilitar los procesos internos en el laboratorio y poder llevar a cabo esta investigación.

A los investigadores Andrea Clavijo y Mauricio Soto de AGROSAVIA por su conocimiento y contribuciones al desarrollo de esta investigación.

A Liz Uribe, Lorena Carmona y Diana Burbano, investigadoras de AGROSAVIA por instruirme en el desarrollo de algunos experimentos y compartir su conocimiento.

A mis compañeros Andrea Mayorga y Luis Eduardo Lizarazo por su amistad, colaboración y entrega en el montaje de experimentos.

A mis compañeras Diana Mateus, Marcela López y Johana Jaramillo por su amistad, por sus aportes individuales y por alentarme en los momentos de angustia.

A Paola Betancourt y Edimer Jaramillo por sus consejos y orientación en la parte estadística.

Resumen

Control de *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* mediado por sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp.

El marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fo*) es una de las enfermedades más limitantes del cultivo. El uso de fungicidas sistémicos y variedades resistentes a ciertas razas del patógeno no ha sido suficiente para su manejo. En este estudio se aislaron microorganismos productores de sideróforos con potencial biocontrolador sobre la cepa *Fo*59. Los aislamientos fueron obtenidos de muestras provenientes de la rizósfera y filósfera de árboles de cacao silvestre de cinco zonas de la Amazonía Colombiana. Los quince aislamientos seleccionados por su eficiencia en la síntesis de sideróforos, fueron clasificados dentro de los géneros *Acinetobacter* sp. (9), *Bacillus* sp. (2), *Delftia* sp. (1), *Serratia* sp. (1), *Pseudomonas* sp. (1) y *Herbaspirillum* sp. (1). La aplicación previa a la infección con *Fo*59 de los sobrenadantes con alto contenido de sideróforos (*SodSid*), de cinco de los aislamientos de *Acinetobacter* sp., logró disminuir el AUDPC de la severidad de la enfermedad hasta en un 45 %, siendo el aislamiento *CBIO117* el que mayor actividad biocontroladora generó. Finalmente, se observó que los *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117* indujeron la expresión de los genes *PR1* y *ERF1* marcadores de las vías hormonales del Ácido Salicílico y Etileno en la planta respectivamente, pero no del gen (*MYC2*), factor de transcripción de los genes de defensa dependientes del Ácido Jasmónico. Sin embargo, en las plantas estimuladas con los *SodSid CBIO117* e infectadas con *Fo*59 se indujo la expresión de manera diferencial del gen *MYC2*, destacando la activación de la defensa dependiente del ácido Jasmónico. Estos resultados demuestran el potencial biocontrolador que tienen los sobrenadantes con sideróforos secretados por aislamientos del género *Acinetobacter* sp. en la disminución del marchitamiento vascular del tomate, actuando como posibles elicitores de la respuesta de defensa de la planta.

Palabras clave: Severidad de la enfermedad, biocontrol, quelantes de hierro, respuesta de defensa.

Abstract

Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by supernatants with siderophores of *Acinetobacter* sp.

The vascular wilt disease of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) is one of the most limiting diseases of this crop. The use of systemic fungicides and varieties resistant to certain races of the pathogen have not provided an adequate control. In this study, siderophore-producing microorganisms with biocontrol potential against *Fol* were isolated from rhizosphere and phyllosphere samples taken from wild cocoa trees in five different locations of the Colombian Amazon. The fifteen isolates selected for being representative of the sampling zones and showing greater production of siderophores were classified within the genera *Acinetobacter* sp. (9), *Bacillus* sp. (2), *Delftia* sp. (1), *Serratia* sp. (1), *Pseudomonas* sp. (1) y *Herbaspirillum* sp. (1). The application before infection with *Fol59* of supernatants with a high content of siderophores (*SodSid*) from five *Acinetobacter* sp. isolates caused a reduction in the AUDPC of the disease severity of up to 45%, being *CBIO117* the isolate which showed greater biocontrol activity. Finally, it was confirmed that *SodSid Acinetobacter CBIO117* generated an induction in the expression of *PR1* and *ERF1* genes, markers of the Salicylic Acid and Ethylene hormonal pathways in the plant, respectively. In contrast the gene (*MYC2*), a transcription factor of the Jasmonic Acid-dependent defense genes was not expressed. However, in plants stimulated with *SodSid CBIO117* and infected with *Fol59*, *MYC2* gene expression was differentially induced, highlighting the activation of the Jasmonic acid-dependent defense that possibly led to counteracting the infection process of the pathogen and reducing the severity of the disease. Our results demonstrate the biotechnological potential of siderophore-producing isolates of the genus *Acinetobacter* sp. for the control of plant pathogens, eliciting the defensive response in the plant.

Keywords: Disease severity, biocontrol, iron chelators, defense response

Contenido

| | Pág. |
|---|-----------|
| Resumen | XI |
| Lista de figuras..... | XVII |
| Lista de tablas | XX |
| Lista de Símbolos y abreviaturas..... | XXI |
| Introducción general..... | 1 |
| 1. Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de sideróforos procedentes del filoplano y rizosfera de cacao de la región amazónica de los departamentos de Caquetá y Putumayo | 2 |
| 1.1 Resumen..... | 2 |
| 1.2 Introducción..... | 3 |
| 1.3 Materiales y métodos | 5 |
| 1.3.1 Aislamientos bacterianos | 6 |
| 1.3.2 Tamizaje de la producción de sideróforos a partir de aislamientos bacterianos | 7 |
| 1.3.3 Caracterización morfológica de los aislamientos..... | 9 |
| 1.3.4 Identificación molecular de los aislamientos bacterianos | 9 |
| 1.3.5 Evaluación de la producción de sideróforos..... | 10 |
| 1.3.6 Producción de sideróforos en diferentes concentraciones de hierro | 11 |
| 1.3.7 Análisis estadístico | 12 |
| 1.4 Resultados y discusión..... | 12 |
| 1.4.1 Caracterización de aislamientos bacterianos productores de sideróforos | 12 |
| 1.4.2 Evaluación de la producción de sideróforos..... | 22 |
| 1.4.3 Relación de la concentración de hierro con la producción de sideróforos de <i>Acinetobacter</i> sp..... | 25 |
| 2. Capítulo 2. Respuesta de defensa relacionada con la aplicación de sobrenadantes con sideróforos de <i>Acinetobacter</i> sp. en el patosistema Tomate-<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> | 29 |
| 2.1 Resumen..... | 29 |
| 2.2 Introducción..... | 31 |
| 2.3 Materiales y métodos | 34 |
| 2.3.1 Efecto de sobrenadantes bacterianos con sideróforos en la disminución de la marchitez vascular del tomate causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> ...34 | |
| 2.3.2 Evaluación del potencial elicitador de un sobrenadante de <i>Acinetobacter</i> sp. en la respuesta de defensa de plantas de tomate infectadas con <i>Fo159</i> | 38 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.3 | Perfil metabólico del aislamiento bacteriano con mayor actividad biocontroladora frente a <i>Fol</i> | 41 |
| 2.3.4 | Análisis estadístico | 42 |
| 2.4 | Resultados y discusión | 43 |
| 2.4.1 | <i>Acinetobacter</i> sp. y su potencial para el control del marchitamiento vascular del tomate mediante sideróforos presentes en sobrenadantes. | 43 |
| 2.4.2 | Efectos de sobrenadantes de <i>Acinetobacter</i> sp. con sideróforos sobre parámetros vegetativos de plantas de tomate infectadas y no infectadas con <i>Fol</i> 59 | 46 |
| 2.4.3 | Expresión relativa de los genes <i>PR1</i> , <i>ERF1</i> y <i>MYC2</i> en plantas de tomate tratadas con <i>SodSid</i> de <i>Acinetobacter</i> CBIO117 e infectadas con <i>Fol</i> 59 | 51 |
| 2.4.4 | Perfil metabólico del aislamiento de <i>Acinetobacter</i> CBIO117 | 57 |
| 3. | Discusión general | 63 |
| 4. | Conclusiones y recomendaciones | 70 |
| 4.1 | Conclusiones | 70 |
| 4.2 | Recomendaciones | 71 |

Lista de figuras

Pág.

- Figura 1.** Ciclo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. a. Estructuras propagativas, b. penetración e invasión de la raíz, c. colonización del xilema, d. destrucción del tejido y, e. taponamiento de haces vasculares y marchitez. Modificado de López et al., 2019.4
- Figura 2.** Estructura química de sideróforos. A. Hidroxamatos (desferrioxamina); B. Catecolatos (enterobactina); C. Carboxilato (vibrioferrina). Tomado de Khan et al., (2018).....9
- Figura 3.** Ubicación espacial de las zonas de muestreo de la expedición Cacao Colombia-Bio. Zona 1, 2 y 3: Departamento de Caquetá, municipio Cartagena del Chaira; Zona 4 y 5: Departamento Putumayo, municipio Puerto Leguizamo. Fuente: Google Earth 2022....6
- Figura 4.** Análisis de clúster algoritmo K-means. Colonias bacterianas productoras de sideróforos. Clúster 1 (21 colonias bacterianas), clúster 2 (16 colonias bacterianas), clúster 3 (23 colonias bacterianas) y clúster 4 (23 colonias bacterianas). 18
- Figura 5.** Árboles filogenéticos usando el algoritmo neighbor-joining basados en la secuencia parcial del gen 16S rRNA. A. árbol filogenético del género *Acinetobacter*, B. árbol filogenético género *Bacillus*, C. árbol filogenético género *Delftia*, D. árbol filogenético género *Herbaspirillum*, E. árbol filogenético género *Pseudomonas*, F. árbol filogenético género *Serratia*. Las barras indican sustituciones por posición de nucleótido. Cada aislamiento se visualiza en un recuadro rojo.21
- Figura 6.** Aislamientos bacterianos productores de sideróforos. A. Concentración de sideróforos expresada en $\mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$ equivalentes de DFOM B. Concentración celular (UFC.mL⁻¹) 72 horas después de la incubación. Barras con la misma letra indican que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, P<0.05), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un n=3.23
- Figura 7.** Producción de sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en medio mínimo sin hierro y suplementado con una concentración de 22 μM y 220 μM FeCl₃.6H₂O. Barras con la misma letra significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, P<0.05), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un n=4.....26
- Figura 8.** Concentración celular (UFC.mL⁻¹) de aislamientos de *Acinetobacter* sp. después de 72 horas de inducirse la producción de sideróforos en medio mínimo sin hierro y suplementado con una concentración de 22 μM y 220 μM FeCl₃.6H₂O. Barras con la

misma letra significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $P < 0.05$), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=4$ 26

Figura 9. Efecto de la aplicación preventiva de *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* en el progreso del marchitamiento vascular del tomate. A. Índice de severidad de la enfermedad B. Eficacia de los *SodSid* de cinco aislamientos de *Acinetobacter* sp. en el AUDPC de la severidad 21 dpi. C. Aspecto visual de la enfermedad en plantas tratadas con *CBIO117* e infectadas con *Fo59*, plantas únicamente infectadas con *Fo59* y plantas sin tartar en infectar. Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas con un $n=15$. Medias con una letra en común significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $p < 0.05$) 45

Figura 10. Gramos de biomasa seca en plantas de tomate tratadas con sobrenadantes con sideróforos con y sin infección por *Fo59* a los 16 dpi. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=6$. Medias con una letra en común significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $p < 0.05$)..... 47

Figura 11. Altura de plantas de tomate (cm). A. Efecto de la inoculación de *Fo59* en la altura de plantas de tomate. B. Efecto de sobrenadantes con sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en la altura de plantas de tomate sin inocular con *Fo59*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=15$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$)..... 48

Figura 12. Valores de unidades SPAD en plantas de tomate. Efecto de la inoculación de *Fo59* en los valores de unidades SPAD de plantas de tomate. B. Efecto de sobrenadantes con sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en los valores de unidades SPAD de plantas sin infectar. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=15$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$).....49

Figura 13. Expresión relativa del gen *PR1* en plantas de tomate a las 48 hpi de *Fo59* en plantas de tomate elicidadas con sideróforos presentes en sobrenadantes de *Acinetobacter* *CBIO117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$)..... 51

Figura 14. Expresión relativa del gen *ERF1* 24 y 48 hpi de *Fo59* en plantas de tomate elicidadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$). Letras mayúsculas y minúsculas corresponden a análisis de varianza de una vía independientes 54

Figura 15. Expresión relativa de del gen *MYC2* 24 y 48 hpi de *Fo59* en plantas de tomate elicidadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$). Letras mayúsculas y minúsculas corresponden a análisis de varianza de una vía independientes. 56

Figura 16. Participación de *MYC2* (The basic helix loop helix transcription factor) en la regulación de captación de hierro por FIT mediada por ácido jasmónico (AJ) en *Arabidopsis*. En presencia de AJ, *MYC2* reprime la transcripción de FIT. La expresión de

los genes *bHLH18* y *bHLH25* (Controlados por *MYC2*) y *bHLH19* y *bHLH20* (Controlados por AJ) son regulados positivamente. Tomado y adaptado de Cui et al. (2018).57

Figura 17. Producción de sideróforos en agar CAS del cultivo de *Acinetobacter CBIO117* en el sistema Biolog Eco®. a). MM sin fuente de carbono (control) b). L-Fenilalanina, c). L-Asparagina d). putrescina e). tween 80 f). tween 40 g). ester metílico del ácido pirúvico h). L-treonina i). D-ácido málico j). control negativo (agar sin adición de cultivo celular).....61

Figura 18. Modelo teórico de la respuesta molecular de la planta de tomate tratada con *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117* e infectada con *Fo59* a las 48 hpi. A). La planta infectada con *Fo59* presenta una condición de estrés que activa las vías de señalización hormonal del ácido salicílico (*PR1*) y etileno (*ERF1*) en condiciones de disponibilidad de hierro en el suelo. B). Cuando las plantas son tratadas con los *SodSid*, estos son absorbidos por las raíces probablemente quelando el hierro presente en las paredes celulares e induciendo la activación de defensa por deficiencia en hierro, la cual aumenta la expresión de genes dependientes del ácido salicílico *PR1* y del etileno *ERF1*. Debido a la condición de estrés. *ERF1* permite la activación del factor de transcripción FIT (Fer-like iron deficiency-induced transcription factor), el cual regula la expresión de los genes involucrados en la captación de hierro para mantener la homeostasis del metal. Al presentarse en la planta condiciones de deficiencia de hierro, FIT se expresa y *MYC2* se mantiene reprimido. C). Posteriormente, cuando estas plantas previamente tratadas con *SodSid* son inoculadas con *Fo59*, la planta ya tiene una inducción previa en la expresión de los genes asociados con defensa de las vías del ácido salicílico (*PR1*) y del etileno (*ERF1*). No obstante, la planta puede reconocer al patógeno y activar la expresión de *MYC2*, el cual induce la transcripción de los genes asociados con la vía de defensa dependiente del ácido jásmonico para contrarrestar un estado necrótico del patógeno contribuyendo a la disminución de la enfermedad. En esta condición *MYC2* podría reprimir la expresión de la proteína FIT. *SodSid*: Sobrenadantes con sideróforos. *PR1*: Pathogenesis related protein 1. *ERF1*: Ethylene responsive transcription factor 1. *MYC2*: The basic helix loop helix transcription factor.66

Lista de tablas

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Genes y enzimas que se regulan ante la infección con <i>Fusarium</i> sp..... | 5 |
| Tabla 2. Patógenos controlados por bacterias productoras de sideróforos..... | 10 |
| Tabla 3. Zonas de muestreo de la expedición Cacao Colombia-Bio..... | 6 |
| Tabla 4. Soluciones stock de la prueba colorimétrica CAS..... | 8 |
| Tabla 5. Número de colonias bacterianas asociadas a rizosfera y filosfera de especies silvestres de cacao en la región amazónica de los departamentos de Caquetá y Putumayo..... | 13 |
| Tabla 6. Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y la producción de sideróforos de las 83 colonias bacterianas identificadas como candidatos potenciales..... | 15 |
| Tabla 7. Identificación molecular de los aislamientos bacterianos con potencial para producir sideróforos. | 19 |
| Tabla 8. Escala descriptiva de la severidad de la marchitez vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (modificada de Rongai et al., 2017)..... | 36 |
| Tabla 9. Iniciadores evaluados para la expresión diferencial de genes implicados en la ruta de señalización hormonal de las vías de defensa. | 40 |
| Tabla 10. Perfil de amplificación por qPCR para cada par de iniciadores utilizados en la evaluación de expresión génica. | 40 |
| Tabla 11. Efecto de la aplicación preventiva de <i>SodSid</i> de <i>Acinetobacter</i> sp. en el periodo de incubación de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (<i>Fol59</i>)..... | 44 |
| Tabla 12. Producción de sideróforos en relación con la fuente de carbono mediante el cultivo de del aislamiento <i>CBI0117</i> de <i>Acinetobacter</i> sp. en el sistema Biolog Eco®. | 58 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

| Símbolo | Término |
|---------|--------------------------------|
| °C | Grados centígrados |
| g | Gramo |
| L | Litro |
| Cm | Centímetro |
| mM | milimolar |
| mL | Coeficiente |
| nm | Nanómetro |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| UFC | Unidades formadoras de colonia |
| et al. | et alii (y otros) |

Símbolos con letras griegas

| Símbolo | Término |
|---------------|------------|
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| Δ | Delta |

Subíndices

| Subíndice | Término |
|-----------|----------------------|
| bm | Materia orgánica |
| DR | Dubinin-Radushkevich |
| E | Experimental |

Superíndices

| Superíndice | Término |
|-------------|------------------|
| ® | Marca registrada |

Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|--------------------|--|
| <i>Fol</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> |
| CAS | Chrome Azurol Sulfuro |
| AN | Agar nutritivo |
| MM | Medio mínimo |
| Min | Minutos |
| DFOM | Deferroxamina |
| MM | Medio mínimo |
| OD | Densidad óptica |
| ACM | Análisis de correspondencia múltiple |
| IDM | Medio deficiente en hierro |
| Sd | Sin determinar |
| <i>Sid</i> | Producción de sideróforos |
| QS | Quorum sensing |
| <i>SodSid</i> | Sobrenadantes con sideróforos |
| AS | Ácido salicílico |
| AJ | Ácido jasmónico |
| ET | Etileno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| IS | Índice de severidad |
| US | Unidad de sideróforo |

Introducción general

Esta investigación estuvo orientada a la búsqueda de bacterias cultivables de la Amazonia Colombiana (Caquetá y Putumayo) productoras de sideróforos y con actividad promisoría para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. El documento comprende dos capítulos y una discusión general. El capítulo 1 contempla el aislamiento, la caracterización morfológica y molecular e identificación de aislamientos bacterianos productores de sideróforos. El capítulo 2 aborda el uso de los sobrenadantes con alto contenido de estos quelantes de hierro, como estrategia biológica para el control del marchitamiento vascular del tomate y la posible inducción de resistencia en la planta. Por último, se incluye una discusión general que reúne los hallazgos de la investigación y los contrasta con los resultados obtenidos por otros autores.

Aspectos generales del cultivo de tomate en Colombia

El tomate es una de las hortalizas de la familia solanácea con mayor demanda a nivel mundial por su amplia gama de usos en la industria de alimentos, farmacéutica y por sus propiedades culinarias (Rehman et al., 2019). Es un cultivo que se siembra a lo largo de todo el año en condiciones de campo abierto y bajo cubierta entre los 500 - 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm). En el año 2021 la producción nacional en Colombia fue de 851.177 toneladas (t) con una superficie cultivada de 18.996 hectáreas (ha). El 70% de la producción se concentra en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Norte de Santander y Cundinamarca (EVA-MADR, 2021).

En el país la oferta de genotipos de tomate es amplia y versátil. Se siembra en un 80% variedades importadas tipo chonto y milano que se diferencian por sus características de adaptación, rendimiento y resistencia a patógenos(Cabrera, 1999; Jaramillo Noreña et al., 2006; Vallejo Bayer,2020). Esta última característica ha llevado a que se establezcan diferentes cultivares. Sin embargo, los problemas asociados a microorganismos fitopatógenos especialmente los que habitan en el suelo siguen considerándose una de las

Introducción

principales limitantes del cultivo por su persistencia en ausencia del hospedero (Nirmaladevi et al., 2016). En los últimos años como consecuencia de la tecnificación, la producción intensiva de tomate ha aumentado y con esto la incidencia de algunas enfermedades, en especial las causadas por *Ralstonia solanacearum*, *Verticillium dahliae* y *Fusarium oxysporum* (Dean et al., 2012). Igualmente, el uso excesivo de agroquímicos como medida de protección ha incrementado el riesgo fitosanitario y generado impactos nocivos en el ambiente y la salud humana. Esto se refleja con la aparición de nuevas razas de patógenos más virulentas, la pérdida de biodiversidad microbiana del suelo con potencial biocontrolador y la alta concentración y variación de trazas de plaguicidas en frutos de tomate (Ríos et al., 2017). Considerando lo anterior, se hace necesario desarrollar alternativas innovadoras de control para fitopatógenos, que mitiguen los efectos nocivos del uso de plaguicidas y contribuyan a la sostenibilidad ambiental.

Marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

El hongo *Fusarium oxysporum* (Fox) y sus más de 150 formas especiales puede causar en cultivos agrícolas *damping-off*, pudriciones y marchitamientos vasculares (Baysal et al., 2009; Bodah, 2017; Srinivas et al., 2019). El marchitamiento vascular del tomate causado por este patógeno es una de las enfermedades más limitantes del cultivo. Una alta incidencia de *Fusarium* puede ocasionar una disminución del rendimiento de hasta el 60% (Ascencio-Álvarez et al., 2008; R. Singh et al., 2015; Nirmaladevi et al., 2016). A nivel mundial se han reportado dos formas especiales que afectan el cultivo del tomate *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) (Sacc.) Snyder y Hansen (Agrios, 2004) del cual se han descrito tres razas patogénicas (Raza 1, Raza 2 y Raza 3) y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (Fol) (Hirano & Arie, 2006). Estas dos formas especiales difieren en sintomatología, especificidad del hospedante y presencia de genes *SIX* "Secreted in xylem" (J.g et al., 1990; Lievens et al., 2009; Nirmaladevi et al., 2016). En Colombia recientemente se ha identificado la raza 2 de *Fol* afectando cultivos de tomate (Carmona et al., 2020).

Introducción

Este patógeno se caracteriza por producir durante su ciclo biológico estructuras propagativas como: microconidios, macroconidios y clamidosporas, que le permiten el desarrollo de la enfermedad (Figura 1a). Tiene la habilidad de colonizar el suelo como microorganismo saprófito y de permanecer en él, en estado de latencia a través de las clamidosporas (Prihatna et al., 2018). El proceso de la enfermedad incluye la penetración de la raíz y la destrucción de las células apicales de la corteza por la formación de hifas (Figura 1b). Una vez el hongo atraviesa las barreras formadas por la hipodermis, invade las células del parénquima y del xilema extendiendo su crecimiento micelial en la zona basal del tallo. En los vasos xilemáticos el hongo produce microconidios que germinan y colonizan rápidamente partes superiores de la planta a través del flujo de savia (Figura 1c y 1d). En esta última fase de infección se produce el marchitamiento, a causa del taponamiento de los vasos conductores y la secreción de varias toxinas que desencadenan la muerte de la planta (Figura 1e) (Jones; et al 2014; Di et al., 2016; Srinivas et al., 2019).

Fol puede infectar plantas en cualquier estado fenológico. Sin embargo, los síntomas se hacen más notorios al inicio de la fructificación (Vásquez-Ramírez & Castaño-Zapata, 2017). En plántulas, algunos de los síntomas son la pérdida prematura de cotiledones junto con la presencia de lesiones corticales en el hipocótilo. Por su parte, las plantas adultas manifiestan clorosis en hojas basales, pérdida de turgencia y retraso en el crecimiento (Cardona-Piedrahita & Zapata, 2019). Internamente en el tejido se observan lesiones en forma de anillo, color marrón-rojizo que se acentúan en los puntos de crecimiento y que ascienden a lo largo del tallo (Fasio et al., 2003; Muñoz Macías, 2019). La incidencia de la enfermedad se ve favorecida por condiciones de alta humedad relativa y temperaturas que oscilan entre los 25 y 28 °C (González Marquetti et al., 2012). La diseminación de *Fol* puede ocurrir por semilla, por el suelo infestado con material de siembra, el agua de riego y los equipos agrícolas (Agrios, 2005).

Introducción

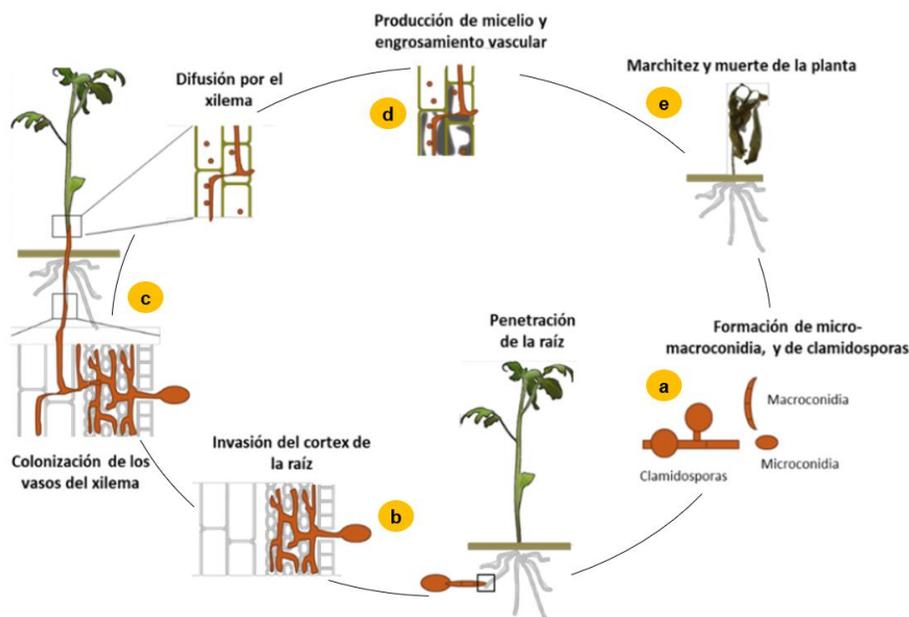


Figura 1. Ciclo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. a. Estructuras propagativas, b. penetración e invasión de la raíz, c. colonización del xilema, d. destrucción del tejido y, e. taponamiento de haces vasculares y marchitez. Modificado de López et al., 2019.

Factores de virulencia de *Fol*

La primera señal en la interacción *Fol* - *tomate* involucra el reconocimiento de la planta por los exudados radicales que activan rutas de transducción de señales del hongo dependientes de proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) y proteínas G (Guo et al., 2016). Estas vías de señalización originan la expresión de genes relacionados con la invasión y la patogénesis (López-Díaz, 2019). A partir del reconocimiento del hospedante, *Fol* secreta enzimas líticas (poligalacturonasas, pectinasas, xilanasas y proteasas) que le permiten penetrar y expandirse en los tejidos mediante la degradación de la pared celular vegetal (Pietro et al., 2009). Al mismo tiempo, como respuesta a los compuestos de defensa de la planta se ha demostrado que *Fol* incrementa la actividad quitinasa y detoxifica metabolitos secundarios como la α -*tomatina* (Martín-Urdíroz et al., 2008). Una vez que invade los vasos xilemáticos

Introducción

el proteoma celular cambia como resultado de la infección (de Lamo & Takken, 2020). En la savia del xilema infectado se secretan varios grupos de proteínas que alteran las células del hospedante, entre ellas, las proteínas *Six* (1-14), las oxidorreductasas, las arabinanasas y las serina proteasas (Houterman et al., 2009). Además de toxinas como el ácido fusárico y la fumonisina asociadas a la virulencia del patógeno (Wang & Ng, 1999; Nirmaladevi et al., 2016;). En tal sentido, una infección exitosa de *Fol* implica la activación y/o inactivación de una gama de genes para la síntesis de proteínas involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Ejemplo de ello, son los genes *Pacc*, *Fgb1*, *Fmk1*, *Frp1*, *chsV*, *Fnr1*, *Tom1*, *Pex* y efectores patogénicos *Six* (Tabla 1).

Tabla 1. Genes y enzimas que se regulan ante la infección con *Fusarium* sp.

| Gen/Enzima | Función | Etapas de infección | Referencia |
|-------------------|---|--------------------------------------|--|
| <i>Pacc</i> | Regula la adaptación al pH extracelular e interviene en la expresión de endo-poligalacturonasas (pg1 y pg5). | Reconocimiento | Caracuel et al., (2003) |
| <i>Fgb1</i> | Regula la formación de estructuras para la infección. Implicado en la cascada de señalización AMPc -PKA. | Penetración, invasión y colonización | Delgado-Jarana et al.,(2005) |
| <i>Fmk1</i> | Controla la penetración de raíces, colonización de la planta y la expresión de genes que codifican para enzimas pectinolíticas. Implicado en la cascada de señalización MAPK. | Penetración, invasión y colonización | Di Pietro et al., (2001) |
| <i>Frp1</i> | Obstruye la expresión de genes degradadores de la pared celular. Actúa junto con la secreción colectiva de varias enzimas involucradas en la colonización y penetración de la raíz. | Penetración invasión | Duyvesteijn et al., (2005) |
| <i>Ste12</i> | Controla el crecimiento invasivo del patógeno por la cascada Fmk1 MAPK. | Colonización | Rispail & Pietro, (2009) |
| <i>chsV</i> | Interviene en la colonización e invasión de patógeno | Colonización | Madrid et al., (2003) |
| <i>fnr1</i> | Activa la transcripción de genes de catabolismo de nitrógeno y actúa como represor de las funciones de virulencia reguladas por el nitrógeno. | Penetración | López-Berges et al.,(2010) |
| Poligalacturonasa | Interviene en la degradación de la pared celular del hospedante. | Penetración | Rispail & Pietro, (2009) |
| Pectatelasas | Interviene en la degradación de la pared celular del hospedante. | Penetración | Rispail & Pietro, (2009) |
| Xylananasas | Interviene en la degradación de la pared celular del hospedante. | Penetración | Rispail & Pietro, (2009) |
| <i>Tom1</i> | Anula el efecto antifúngico de la α -Tomatina. | Penetración | Lairini et al., (1996) |
| <i>Pex</i> | Captación de nutrientes del hospedante y taponamiento de poros septales. | Penetración, invasión | Essarioui et al., (2016) y Michielse & Rep, (2009) |
| <i>Six 1</i> | Proteína efectora <i>Avr3</i> reconoce el gen de resistencia <i>I3</i> . Presente en todas las cepas patogénicas. | Colonización | de Sain & Rep, (2015) y Houterman et al., (2009) |
| <i>Six 3</i> | Proteína efectora <i>Avr2</i> reconocida por el producto del gen de resistencia <i>I2</i> . Interactúa con <i>Six 5</i> | Colonización | de Sain & Rep, (2015) |

Introducción

| | | | |
|-------|---|--------------|------------------------|
| Six 4 | Proteína efectora <i>Avr1</i> , reconocida por el gen de resistencia <i>I</i> e <i>I1</i> . Suprime la resistencia mediada por <i>I2 I3</i> | Colonización | de Sain & Rep, (2015) |
| Six 5 | Interacciona con <i>Avr2</i> para desencadenar resistencia mediada por el gen <i>I2</i> | Colonización | Schmidt et al., (2013) |

Estrategias de control de la enfermedad

El control de la enfermedad de forma convencional se ha limitado al uso de fumigantes de suelo, fungicidas sistémicos y variedades resistentes a ciertas razas del patógeno. No obstante, estas medidas no han sido suficientes para mantener bajos niveles de la enfermedad. Estas dificultades en el control se han relacionado con la diversidad genética del patógeno y la resistencia a plaguicidas (Baysal et al., 2009). Desde hace varios años se han venido buscando alternativas de manejo para el control de la enfermedad con un enfoque ecológico a través del uso de hongos, rizobacterias, extractos vegetales, sustancias bioactivas fosfitos, silicios y biopolímeros con actividad biológica. A continuación, se mencionan algunos estudios y sus resultados en los que se demuestra la efectividad de estos agentes en el control de la marchitez vascular: a). La aplicación preventiva de *Bacillus subtilis* QST713, *Trichoderma* sp. TW2 y compost en plantas de tomate redujo en un 70% la marchitez por *Fol* (Cucu et al., 2020); b). El tratamiento de semillas de tomate con el ácido cítrico de *Trichoderma asperellum* suprimió la marchitez vascular causada por *Fol* (Al-Askar et al., 2021); c). La combinación de aislados de *Trichoderma* sp. inhibió el crecimiento de *Fol* en un 70% e indujo la resistencia por actividad de la fenilalanina amonioliasa responsable de la síntesis de polifenoles en las plantas (Aleaghaee et al., 2019); d). La rizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 aumentó la resistencia a *Fol* y a *Pseudomonas syringae* pv. tomato por actividad antifúngica y la inducción de resistencia sistémica mediante la activación de la vía de defensa dependiente del ácido jasmónico/etileno (Heo et al., 2022); e). Aislamientos *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* obtenidos de la rizosfera de *Solanum hindsianum* mostraron un efecto supresivo de *Fusarium* en tomate (Delgado-Ramírez et al., 2021); f). El extracto acuoso de neem y sauce aplicado a plantas de tomate disminuyeron la incidencia de *Fol* al nivel del 25.5% y 27.8% mediante el aumento de las enzimas defensivas antioxidantes y la disminución del nivel de peroxidación lipídica (Farang et al., 2011); g). Los compuestos eugenol y 1-Heptatriacotanol de la especie vegetal

Introducción

Syzygium aromaticum inhibieron en un 100% la germinación de esporas de *Fol* (Yeole et al., 2016); h). El tratamiento de plantas de tomate con silicio y fosfitos redujo en un 42% la severidad de la enfermedad causada por *Fol* (Carmona et al., 2021). Finalmente, estudios recientes demuestran que la aplicación de nanopartículas de plata cubiertas con quitosán ejerce un efecto sobre la evolución de los síntomas en plántulas de tomate infectadas con *Fol* (Alvarez-Carvajal et al., 2020).

Mecanismos de control biológico ejercidos por bacterias

El interés de los microorganismos benéficos como agentes de control biológico ha venido en aumento debido al bajo impacto ambiental y a las características que les permiten que puedan ser bioprospectados. Entre ellas, se encuentran su efectividad a bajas concentraciones, su genética estable, su efectiva colonización y adherencia a los hospederos y sus múltiples mecanismos antagonistas frente a fitopatógenos (Carmona-Hernandez et al., 2019). En el caso de las bacterias, se ha descrito su papel como promotoras de crecimiento vegetal y su actividad biocontroladora mediante antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, parasitismo, producción de compuestos volátiles, formación de biopelículas, síntesis de moléculas señalizadoras de *quorum sensing*, producción de sideróforos y la inducción de resistencia para la defensa de la planta (Karthika et al., 2020). A continuación, se describe brevemente cada mecanismo:

- *Competencia por espacio y nutrientes*: Este mecanismo se basa en agotar los nutrientes disponibles para el patógeno con el objetivo de acortar su supervivencia y multiplicación (Hernández-Montiel et al., 2018; Carmona-Hernández et al., 2019).
- *Parasitismo*: El parasitismo desencadena la lisis de las paredes celulares de los hongos debido a la participación de enzimas como la β -1,3-glucanasa, las quitinasas y las proteasas producidas por las bacterias para degradar la quitina y los glucanos producidos por hongos filamentosos (Safdarpour & Khodakaramian, 2019).
- *Antibiosis*: Es uno de los principales mecanismos utilizados por las bacterias para el control de los fitopatógenos el cual se hace mediante la producción de antibióticos y algunos compuestos volátiles que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos (Karthika et al., 2020).

Introducción

- *Quórum sensing y formación de biopelículas*: La capacidad de comunicación celular a través de la secreción de señales químicas que les permite a las células regular la expresión de compuestos que favorezcan su colonización, transferencia génica, virulencia y adaptación de acuerdo con la densidad celular. Entre los procesos regulados por *quórum sensing* está la formación de biopelículas. Las células en estado de biopelículas presentan una mayor resistencia a tipos de estrés biótico y abiótico y son más virulentas que las células en estado planctónico (Bourigault et al., 2021; Pena et al., 2019).
- *Producción de sideróforos*: Los sideróforos son moléculas que secretan las bacterias y otros microorganismos para adquirir hierro para su crecimiento y procesos celulares (Andrews et al., 2003). Estas moléculas permiten a las bacterias biocontroladoras competir eficazmente con los fitopatógenos por el hierro inhibiendo su crecimiento (R. Z. Sayyed & Patel, 2011). Además de su función nutricional se ha demostrado que algunos sideróforos tienen actividad antimicrobiana y pueden llegar a inducir la respuesta defensiva en hospederos eucariotas.
- *Inducción de resistencia*: La interacción entre las bacterias benéficas y las plantas puede estimular la defensa frente a varios patógenos a través de cambios estructurales o mediante la producción de proteínas asociadas con defensa (Carmona-Hernández et al., 2019). Existen dos tipos de resistencia, la resistencia sistémica inducida mediada por la vía del jasmonato/etileno y la resistencia sistémica adquirida donde participa la vía de señalización del ácido salicílico. Cualquiera de las dos puede ser inducida por estímulos bióticos o abióticos (Pieterse et al., 2014).

Sideróforos bacterianos

Los sideróforos bacterianos son moléculas de bajo peso molecular (< 10.000 Da), que tienen la función de mediar la captación de hierro por parte de las células con una alta afinidad por el óxido férrico (Fe³⁺) (Winkelmann, 2002). Sin embargo, también participa en la adquisición de hierro a partir del citrato férrico, el fosfato férrico, la transferrina férrica, hierro unido a pigmentos vegetales, azúcares y glucósidos (Khan et al., 2018). De acuerdo con su estructura química para unir el hierro, estos pueden dividirse en catecolato, hidroxamato, y carboxilato (Figura 2). Los hidroxamatos son sideróforos hidrofílicos, que

Introducción

en bacterias están formados por alquilaminas aciladas e hidroxiladas, cada hidroxamato es capaz de formar un complejo octaédrico hexadentado (Aguado-Santacruz et al., 2012). Los catecolatos son producidos únicamente por las bacterias, la lipofilia, la estabilidad de los complejos y la estabilidad al pH ambiental son sus propiedades únicas (Winkelmann, 2002). Estos, también forman un complejo octaédrico hexadentado al proporcionar dos átomos de oxígeno para la quelación de hierro (Khan et al., 2018). Los carboxilatos son sintetizados por bacterias del género *Rhizobium*, estos sideróforos tienen grupos carboxilo e hidroxilo para la adquisición de hierro. Algunos ejemplos de sideróforos tipo hidroxamatos son: acinetobactina, artrobactina, aerobactina, desferrioxamina, ferribactina, pseudobactina; catecol, enterobactina, piochelina, agrobactin, azotochelin; carboxilato, rizobactina y vibrioferrina.

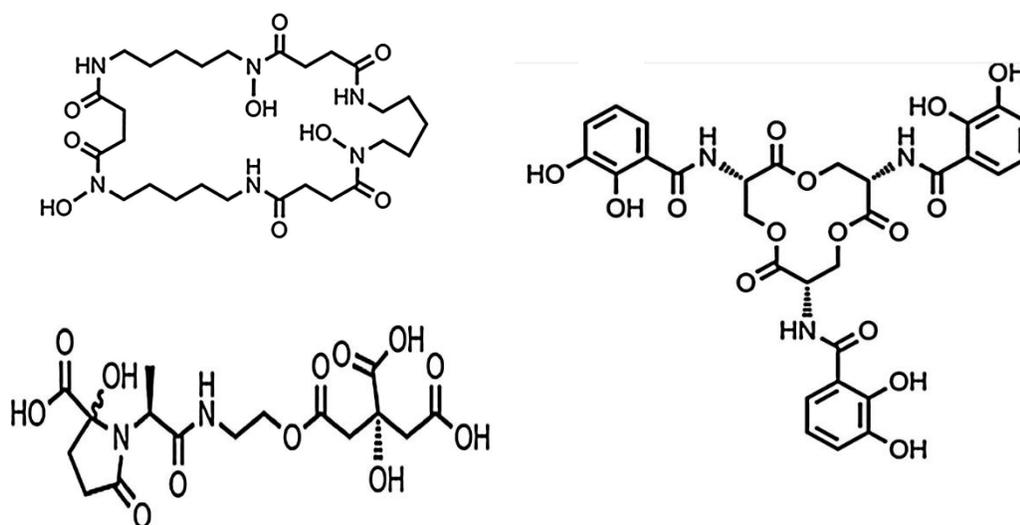


Figura 2. Estructura química de sideróforos. A. Hidroxamatos (desferrioxamina); B. Catecolatos (enterobactina); C. Carboxilato (vibrioferrina). Tomado de Khan et al., (2018)

Muchas bacterias promotoras de crecimiento vegetal tienen la capacidad de secretar estos quelantes principalmente bajo condiciones limitadas de hierro confiriéndole beneficios a las plantas. El nivel de umbral de hierro para para que este metabolito no se sintetice y la regulación de su producción depende de cada género bacteriano. La nutrición de las

Introducción

plantas se ve mejorada principalmente porque estas moléculas logran reducir el hierro a su estado soluble, lo cual facilita su adquisición (Sayyed et al., 2013). Por otra parte, se ha evidenciado que los sideróforos pueden suprimir enfermedades por competencia por el nutriente entre la bacteria y el fitopatógeno, actuando como compuestos antimicrobianos o induciendo la respuesta de defensa en la planta (Verbon et al., 2017). Se ha demostrado además que tienen actividad fitorremediadora ya que además del hierro pueden unirse a otros metales (González-Chávez, 2017). Son varios los estudios que confirman la ventaja competitiva de las rizobacterias productoras de sideróforos frente a patógenos, algunos ejemplos de control asociados a la producción de estas moléculas se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Patógenos controlados por bacterias productoras de sideróforos.

| Bacteria biocontroladora | Patógeno atacado | Referencia |
|------------------------------------|---|--|
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Phytophthora sojae</i> | Zhao et al. (2018) |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | Silva et al. (2021) |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | <i>Fusarium</i> sp. | Rongai et al. (2017) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | X. Yu et al. (2011) y Saha et al. (2016) |
| <i>Pseudomonas mediterranea</i> | <i>Phytophthora parasítica</i> var. <i>nicotianae</i> | Tian et al. (2008) |
| <i>Pseudomonas syringae</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | S. Yu, Teng, Liang, et al. (2017) |
| <i>Pseudomonas protegens</i> | <i>Xanthomonas citri</i> | Michavila et al. (2017) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Rhizoctonia solani</i> | Solanki et al. (2014) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Fusarium oxysporum</i> | Arya et al. (2018) |
| <i>Rhizobium</i> sp. | <i>Macrophomina phaseolina</i> | Arora et al. (2001) |
| <i>Serratia plymuthica</i> | <i>Phytophthora cinnamomi</i> | Restrepo et al. (2020) |

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de sobrenadantes bacterianos con sideróforos en el control de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Objetivos específicos

1. Aislar, caracterizar e identificar taxonómicamente cepas bacterianas productoras de sideróforos.
2. Evaluar la actividad biocontroladora de sobrenadantes bacterianos con sideróforos en plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
3. Comprobar si los sobrenadantes bacterianos con sideróforos actúan como elicitores en la respuesta de defensa de plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

1. Capítulo 1. Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de sideróforos procedentes del filoplano y rizosfera de cacao de la región amazónica de los departamentos de Caquetá y Putumayo

1.1 Resumen

El hierro es un elemento abundante en la naturaleza y de gran importancia biológica por su papel en las interacciones microorganismo hospedero. Además, su estado de oxidación poco soluble Fe^{3+} dificulta su adquisición por la mayoría de los seres vivos. Algunos microorganismos han desarrollado moléculas de alta afinidad por estos iones férricos conocidos como sideróforos, los cuales además de facilitar su solubilidad pueden actuar como biofertilizantes, biocontroladores y biorremediadores. Si bien es cierto que, la mayor diversidad biológica a nivel mundial se encuentra en la región Amazónica, son pocos los estudios en los que se han aislado y cultivado microorganismos productores de sideróforos de esta zona. Teniendo en cuenta, la importancia de los sideróforos, sus variados mecanismos de acción y la inexplorada diversidad microbiana en la Amazonía, este estudio tuvo como objetivo aislar, identificar y caracterizar aislamientos bacterianos con alta capacidad de secretar sideróforos como estrategia para el control de fitopatógenos. Los aislamientos fueron obtenidos a partir de muestras de rizosfera y filósfera de árboles silvestres de cacao procedentes de cinco zonas de la región amazónica de los departamentos del Caquetá y Putumayo. Haciendo uso del método de dilución a estimulación/extinción y simulando las condiciones ambientales de la Amazonía, 182 colonias fueron aisladas en medio deficiente en hierro. Mediante la prueba colorimétrica Chrome Azurol Sulfuro-CAS se evidenció que 83 de ellas eran productoras de sideróforos.

Quince aislamientos representativos de las zonas de muestreo y con actividad promisorias para producir el metabolito se identificaron molecularmente por secuenciación parcial del gen 16sADNr. El 60% de los aislamientos se clasificaron dentro del género *Acinetobacter* sp., el 13% dentro del género *Bacillus* sp. y el 26% dentro del género *Delftia* sp., *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Herbaspirillum* sp. Los aislamientos con mayor capacidad de quelar hierro fueron aquellos clasificados dentro del género *Acinetobacter* sp., e identificados con los códigos *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159*). La capacidad de estos aislados de secretar sideróforos en condiciones de deficiencia y suficiencia de hierro se evaluó en caldos de cultivo con diferentes concentraciones de cloruro férrico. Los resultados obtenidos indicaron que la ausencia de hierro lleva a la producción de sideróforos y que en la medida que aumente la disponibilidad de este compuesto, su producción decrece. Finalmente, este estudio nos permitió identificar un grupo de cinco bacterias promisorias para ser evaluadas en investigaciones enfocadas en potencializar este atributo biológico para el control de fitopatógenos.

1.2 Introducción

La selva de la Amazonía se ha catalogado como el área del planeta con mayor reserva biológica, existen registros de que alberga alrededor de 40.000 especies de plantas vasculares, 5.500 vertebrados y 100.000 invertebrados (Ranjan et al., 2015). La Amazonía Colombiana está conformada por los departamentos de Caquetá, Guainía, Guaviare, Putumayo, Amazonas y Vaupés (CEPAL, 2013). En relación con la diversidad microbiana los estudios a nivel mundial son escasos y los existentes se han centrado en estudiar la diversidad taxonómica y filogenética de las bacterias en relación con las actividades antrópicas (Nüsslein, 2012; Rodrigues et al., 2013; Schmitt et al., 2020). Los trabajos desarrollados en el país se restringen a bacterias microaeróbicas y aeróbicas potencialmente fijadoras de nitrógeno, actinomicetos y hongos formadores de micorrizas (Cardona et al., 2005; Mantilla-Paredes et al., 2009; Garzón, 2016).

Durante el año 2018, se realizó en el país la expedición Cacao Colombia-Bio financiada por el Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (convenio especial de cooperación FP44842-142-2018), la cual tuvo como finalidad determinar la diversidad de la especie

Theobroma cacao y sus parientes cercanos en la región Amazónica del departamento del Caquetá y Putumayo catalogadas como zonas endémicas inexploradas. Considerando la oportunidad que brindó esta expedición para explorar la agrobiodiversidad y en búsqueda de profundizar en el conocimiento de los atributos microbianos de bacterias adaptadas a estos hábitats se desarrolló este estudio, el cual tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de bacterias productoras de sideróforos.

El hierro abunda en la naturaleza principalmente bajo el estado de óxido de hierro (III), se considera un elemento esencial para los microorganismos, plantas y animales. Este elemento participa en varios procesos biológicos como la replicación del ADN, la fotosíntesis, la fijación de N₂, la respiración y la transferencia de electrones por su capacidad de asumir múltiples estados de oxidación (Sayyed & Patel, 2011). Su forma soluble Fe²⁺ debe ser regulada, ya que resulta tóxica para las células debido a su participación en la reacción de Fenton, mientras que su forma insoluble Fe³⁺ mayoritaria en la naturaleza no está biodisponible (Holden & Bachman, 2015). Bajo esta consideración, las bacterias pueden solubilizar los óxidos férricos mediante la regulación del pH externo, reduciendo el hierro férrico a la forma ferrosa o empleando quelantes de iones férricos como agentes solubilizadores a los que se les conoce como sideróforos (Guerinot, 1994). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular de alta especificidad por el hierro férrico que se producen principalmente como respuesta a la restricción del metal (Winkelmann, 2002). Según su estructura química pueden clasificarse en tres grupos funcionales, hidroxamatos, catecoles y carboxilatos (Hider & Kong, 2010). En las bacterias los sideróforos que más se han descrito son los sintetizados por bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacter* y del género *Pseudomonas* sp. (Ali & Vidhale, 2013). Algunas bacterias tienen la capacidad de producir uno o más sideróforos que pueden ser reconocidos por sus receptores de membrana o por los de otros microorganismos para la adquisición de Fe u otros metales como el Al, Zn, Cd, Cu, Pb, a estos se les denomina sideróforos heterólogos (Verbon et al., 2017). Sumado a esto, en algunos géneros bacterianos estas moléculas regulan la producción de factores de patogenicidad, ejemplo de ello es el sideróforo pioverdina sintetizado por *Pseudomonas aeruginosa*, el cual regula la producción de tres factores de patogenicidad necesarios para una virulencia completa en seres humanos (Lamont et al., 2002). De igual manera, la biosíntesis de este sideróforo por el fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tabaco* es requerida para la virulencia en

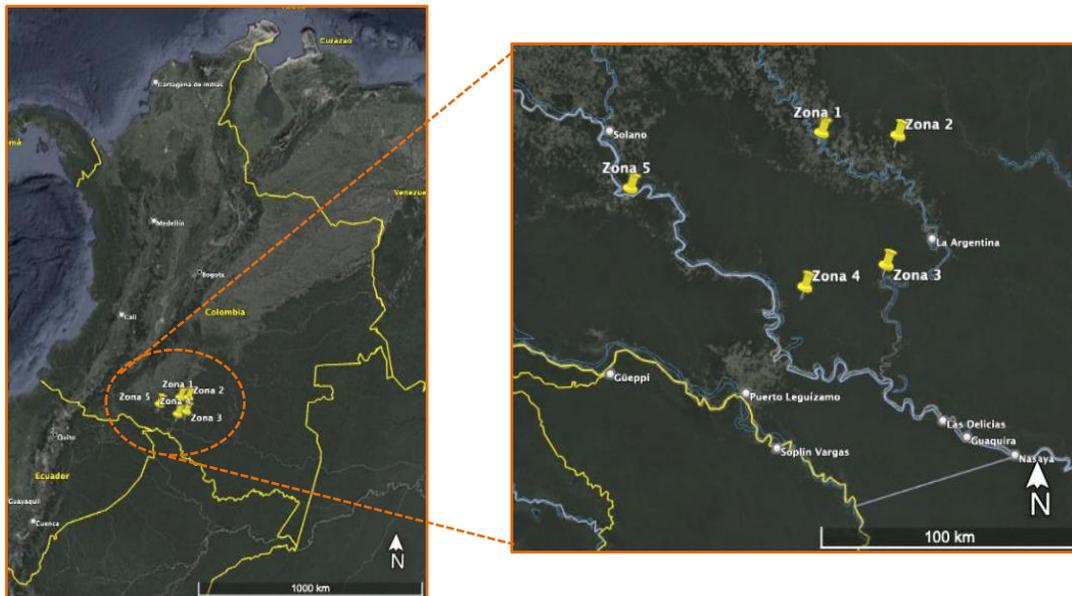
plantas de tabaco (Taguchi et al., 2010). No obstante, el papel de estas moléculas en la interacción planta-microorganismo ha estado asociada principalmente a la actividad biocontroladora de las rizobacterias. Estos son empleados para contrarrestar el ataque de fitopatógenos por mecanismos como la competencia por el micronutriente y la inducción de respuestas de defensa en la planta (Verbon et al., 2017; Karthika et al., 2020). Otras propiedades que incrementan el interés en estas moléculas, es su capacidad para mejorar la fertilidad del suelo y su aplicación ambiental al reducir los niveles de contaminación del agua y suelo con metales pesados (Vélez et al., 2019). Dada las variadas funciones benéficas que proporcionan los microorganismos mediante la síntesis de estas moléculas, el objetivo de este estudio fue identificar bacterias con alto potencial para producir sideróforos que puedan usarse para el desarrollo de investigaciones que amplíen el conocimiento de este atributo biológico.

1.3 Materiales y métodos

Muestras de rizosfera y filosfera de árboles silvestres de cacao recolectadas previamente en la región amazónica de los departamentos de Caquetá y Putumayo durante la expedición Cacao Colombia-Bio (convenio especial de cooperación FP44842-142-2018 Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación) fueron utilizadas para el aislamiento de bacterias (Figura 3). El muestreo estuvo a cargo del grupo de investigadores que participó en la expedición. Este se realizó en 3 zonas del departamento del Caquetá y 2 zonas del departamento del Putumayo. La selección de los puntos de muestreo se llevó a cabo basados en registros históricos de las especies de cacao en Colombia (*Theobroma cacao*, *Theobroma* sp. y *Herrania*), junto con la colaboración de la comunidad en talleres participativos (González, 2018). En el transecto de cada zona se hizo un muestreo dirigido de los árboles silvestres de cacao hallados y de cada uno de ellos se tomó una muestra compuesta de rizosfera y filosfera (hojas maduras del estrato inferior) (tabla 3).

Tabla 3. Zonas de muestreo de la expedición Cacao Colombia-Bio

| Zona | Departamento | Municipio | Coordenadas | |
|--------------------|--------------|----------------------|-----------------|------------------|
| | | | Latitud | Longitud |
| 1. Palmichales | Caquetá | Cartagena del Chaira | 0° 38' 58.80" N | 74° 31' 20.47" W |
| 2. El Jordán | Caquetá | Cartagena del Chaira | 0° 38' 26.57" N | 74° 15' 28.28" W |
| 3. El Guamo | Caquetá | Cartagena del Chaira | 0° 12' 8.26" N | 74° 17' 51.47" W |
| 4. Las Vegas | Putumayo | Puerto Leguizamo | 0° 7' 44.219" S | 74° 34' 43.99" W |
| 5. La Cocha e Isla | Putumayo | Puerto Leguizamo | 0° 27' 45.90" N | 75° 10' 50.76" W |

**Figura 3.** Ubicación espacial de las zonas de muestreo de la expedición Cacao Colombia-Bio. Zona 1, 2 y 3: Departamento de Caquetá, municipio Cartagena del Chaira; Zona 4 y 5: Departamento Putumayo, municipio Puerto Leguizamo. Fuente: Google Earth 2022.

1.3.1 Aislamientos bacterianos

Sesenta muestras de rizosfera y filosfera obtenidas de los puntos de muestreo fueron preservadas en agar agua inclinado enriquecido con extracto de hojas y raíces de cacao (13 g/L de agar - agar, 100 mL/L de extracto de raíz y hojas de cacao suplementado con cicloheximida y cloranfenicol) durante el tiempo de la expedición (22 días). Posteriormente,

estas muestras fueron sometidas a un proceso de sonicación para desprender la biomasa celular de los microorganismos. Para este fin, 30 mL de solución tampón ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, ácido 4-Morfolino etanosulfónico monohidrato (MES, 1.95 g/L; pH 5.5) se adicionaron a cada muestra. La suspensión se sonicó por 6 minutos por períodos de 2 min, con pausas de 1 min, utilizando el sonicador marca Elmasonic. Posteriormente, con ayuda de un asa redonda, las colonias microbianas se desprendieron del agar y la suspensión celular obtenida fue centrifugada en un nuevo tubo a 6000 rpm por 15 min. El pellet formado se resuspendió en 5 mL de tampón fosfato salino (0.02 g/L de KH_2PO_4 , 0.09 g/L de NaCl, 3.83 g/L de Na_2HPO_4 ; pH 7.2) y a partir de 100 μL de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 1×10^{-10} en caldo de cultivo sin adición de hierro (IDM, K_2SO_4 (0.2%), K_2HPO_4 (0.3%), NaCl (0.1%), NH_4Cl (0.5%), suplementado con una solución de tiamina (0.1 %), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2%), CaSO_4 (0.05%), MnSO_4 (3.5%), biotina (0.002 g/mL), ácido pantoténico (0.001 g/mL), CaCl_2 (1%), extracto de levadura (0.5%), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (44%) y MgSO_4 (10%)) (Müller et al., 1984). Con el propósito de simular las condiciones ambientales de la Amazonía y promover el crecimiento de las comunidades de microorganismos presentes, estos cultivos diluidos fueron incubados en cámara húmeda durante 5 días, en agitación constante a 164 rpm, con una temperatura que varió entre 17 °C y 24 °C y una humedad cercana al 80%. Para llevar a cabo los aislamientos se usó el método de dilución a estimulación/extinción (Díaz-García et al., 2021). Por ello, 100 μL de las diluciones más altas (10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10}) se sembraron por extensión en placas de agar IDM y se incubaron en oscuridad por 72 horas a 28°C. Las colonias bacterianas con características macroscópicas distintas como color, borde y superficie fueron aisladas y purificadas en medio de cultivo IDM. Los aislamientos obtenidos se conservaron a -80 °C en medio de cultivo suplementado con glicerol al 20% y al 50% en el Laboratorio de Microbiología Agrícola del C.I La Libertad de AGROSAVIA.

1.3.2 Tamizaje de la producción de sideróforos a partir de aislamientos bacterianos

Mediante la prueba colorimétrica Chrome Azurol Sulfuro – CAS (Schwyn & Neilands, 1987a). Las colonias aisladas fueron evaluadas por su capacidad de producir sideróforos en medio mínimo sin hierro utilizando como fuente de carbono glucosa en lugar de sacarosa y la adición de las vitaminas biotina, clorhidrato de tiamina y pantotenato de sodio (MM, 2.42 g/L de $\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$, 10 g/L de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ suplementado con 10 mL/L de soluciones

stock de K_2HPO_4 (0.3 g), KH_2PO_4 (0.3 g), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.05 g), NaCl (0.05 g), $MgSO_4$, (0.15 g), pH 7.0) modificado de Robertsen et al. (1981).

Prueba colorimétrica Chrome Azurol Sulfuro - CAS: El procedimiento para preparar esta reacción química consistió en mezclar cada una de las soluciones stock descritas en la tabla 4 con MES hidratado, cómo se indica a continuación:

- En un matraz de 50 mL, mezclar 1.5 mL del stock 1 con 7.5 mL del stock 2. A esta mezcla añadir los 25 mL del stock 3 y agitar lentamente (solución 1). Paralelamente preparar una solución tampón disolviendo 9.76 g de MES en 50 mL de agua Milli-Q® y ajustar el pH a 5.6 con KOH al 50%. Luego, añadir la solución 1 y aforar a 100 mL con agua Milli-Q®. Esta solución fue almacenada bajo oscuridad a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla 4. Soluciones stock de la prueba colorimétrica CAS

| Stock | Composición |
|-------|---|
| 1 | 50 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1mM en una solución 10 mM de HCl (37%). |
| 2 | 50 mL de solución de Chrome Azurol S 2 mM. |
| 3 | Diluir 21.9 mg de bromuro de hexadeciltrimetilamonio en 25 mL de agua Milli-Q®. |

Para inducir la producción de sideróforos, cultivos bacterianos de 24 horas crecidos en agar nutritivo (AN) marca Oxoid fueron inoculados en tubos con 5 mL de medio MM sin hierro. Cada aislamiento fue incubado a 28°C en agitación a 117 rpm por 72 horas, centrifugado a 4°C por 15 minutos a 10000 rpm y luego evaluado a través del ensayo cuantitativo CAS.

Para determinar la presencia de sideróforos, 500 μ L del sobrenadante bacteriano fueron mezclados con 500 μ L de la solución CAS e incubados por 1 hora en oscuridad. Se consideraron cepas productoras de sideróforos aquellas en las que la reacción colorimétrica cambió de coloración azul (complejo férrico) a naranja (eliminación del hierro del complejo férrico). La actividad quelante del sobrenadante con sideróforos se midió mediante espectrofotometría a 630 nm y se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%US = \frac{(Ar - As)}{Ar} \times 100$$

Ar: Absorbancia del control (Solución CAS con MM)

As: Absorbancia de la muestra

Los resultados presentados para este primer tamizaje corresponden a la lectura de una sola réplica biológica con tres réplicas técnicas por cada colonia bacteriana aislada.

1.3.3 Caracterización morfológica de los aislamientos

La caracterización morfológica se realizó para todas las colonias bacterianas que evidenciaron la producción de sideróforos. Cada aislamiento fue crecido en AN durante 48 horas a 28 °C. Posteriormente, las colonias fueron caracterizadas macroscópicamente de acuerdo con las características de forma, color, y superficie; y el tipo de pared celular por tinción de Gram.

1.3.4 Identificación molecular de los aislamientos bacterianos

La caracterización molecular se realizó únicamente para el grupo de 15 aislamientos seleccionados por su alta producción de sideróforos, ser representativos de cada zona de muestreo y por proceder de la rizosfera o la filosfera de las plantas de cacao.

A partir de cultivos puros de 24 horas de edad y crecidos en caldo nutritivo se realizó la extracción del ADN genómico de los 15 aislamientos utilizando el kit de extracción MoBio PowerLyzer® UltraClean® Microbial Kit (Carlsbad, CA), siguiendo las especificaciones del fabricante. La pureza y concentración del ADN se calculó mediante espectrofotometría en Nanodrop One (Thermo Scientific). La identidad taxonómica de los aislamientos se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa-PCR, por amplificación de la

región V4 del gen 16s ADNr usando los primers 515F (5' GTGYCAGCMGCCGCGGTAA 3') y 806R (5' GGACTACNVGGGTWTCTAAT 3') (Aprill et al., 2015; Parada et al., 2016). La mezcla de cada reacción de PCR estuvo constituida por 50 ng de ADN molde, 0.4 μ M de cada primer, 0.8X de Go Taq® Green Master Mix (Promega) y agua grado molecular en un volumen final de 25 μ L. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización por 45 s a 94°C, 1 min de hibridación a 50°C, 90 s de extensión a 72°C y una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto amplificado (>395 pb) se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y fue secuenciado por Corpogen (Bogotá). Las secuencias obtenidas para cada taxón se alinearon con el software Geneious prime versión 2021.0.03 (Biomatters Ltd), estas fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante BLASTn. Se construyeron árboles filogenéticos con el software Geneious prime versión 2021.0.03 (Biomatters Ltd), usando el alineamiento *Muscle* de las secuencias con mayor homología obtenidas de NCBI y el algoritmo neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987). Finalmente, un análisis de Bootstrap se realizó basados en 1000 interacciones para evaluar la robustez del árbol filogenético (Felsenstein, 1985).

1.3.5 Evaluación de la producción de sideróforos

La capacidad de producción de sideróforos de los 15 aislamientos identificados molecularmente fue corroborada realizando tres réplicas biológicas como se describe a continuación. A partir de cultivos bacterianos de 24 horas crecidos en AN se preparó un pre-inóculo que fue ajustado a una densidad óptica (OD) de 0.6 a 600 nm. Una alícuota de 1 mL del pre-inóculo bacteriano en fase exponencial fue inoculada en tubos Falcon con 2 mL de medio MM sin hierro y ajustada a una OD de 0.2 a 600 nm. Los cultivos se incubaron a 28°C en agitación a 117 rpm por 72 horas. El crecimiento celular fue medido por espectrofotometría a 600 nm y recuento en placa de unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Completado el tiempo de incubación, el caldo fermentado de cada cultivo bacteriano se centrifugó a 10000 rpm por 15 min. La síntesis de sideróforos en los sobrenadantes bacterianos se comprobó mediante la prueba colorimétrica CAS como se describe en el apartado 1.3.2. La concentración del quelante férrico fue determinada para cada aislamiento bacteriano usando una curva de calibración estándar con mesitato de

deferoxamina (DFOM) que se preparó siguiendo la metodología descrita por Mehnert et al., 2017 y Radzki et al., 2013. La concentración se expresó en μM equivalentes de DFOM (1 mmol de DFOM es capaz de capturar 56 mg Fe^{3+}) (Radzki et al., 2013). Este experimento se estableció en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones, tres veces en el tiempo. La unidad experimental estuvo representada por un tubo con cultivo bacteriano.

Con los cinco aislamientos que mostraron los contenidos más altos de sideróforos (concentración sideróforos $> 90 \mu\text{M}$ equivalentes de DFOM) se desarrollaron experimentos enfocados en; i) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de hierro en la producción de sideróforos; ii) evaluar la capacidad biocontroladora de sobrenadantes bacterianos con sideróforos frente a plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Capítulo 2).

1.3.6 Producción de sideróforos en diferentes concentraciones de hierro

Se determinó el efecto de la concentración de hierro sobre la producción de sideróforos y su relación con el crecimiento celular bacteriano. Las concentraciones de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ evaluadas fueron: 0 μM , 22 μM y 220 μM de acuerdo con estudios previos desarrollados por el grupo de investigación que demostraron que, a 0 μM se induce la producción del sideróforo rizobactina en *Sinorhizobium meliloti*, mientras que, a 220 μM esta producción se ve restringida (Nogales et al., 2010; Amaya-Gómez et al., 2015).

Las células de los aislados bacterianos *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159* cultivadas por 24 horas en AN, se lavaron dos veces con solución salina al 0.85%. En cada lavado la suspensión se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm eliminando el sobrenadante. El pellet resultante se resuspendió en medio MM hasta obtener un inóculo con una OD de 2.0 a 600 nm. A continuación, 4.5 mL de MM suplementado con cada una de las concentraciones de hierro y servido en erlenmeyer fueron inoculados con 0.5 mL de cada inóculo bacteriano. Posteriormente, se incubaron a 28°C a 117 rpm durante 72 horas. La síntesis de sideróforos en los sobrenadantes bacterianos se determinó mediante la prueba colorimétrica CAS como se describe en el apartado 1.3.2. Este experimento se estableció con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 5×3 para un total de

15 tratamientos, con 4 repeticiones. Se desarrollaron tres repeticiones en el tiempo. La unidad experimental estuvo representada por un erlenmeyer de 50 mL con cultivo bacteriano.

1.3.7 Análisis estadístico

Para las variables de carácter cualitativo (caracterización morfológica de las colonias bacterianas) se realizó un análisis estadístico mediante técnicas multivariantes como el análisis de correspondencia múltiple (ACM) y el análisis de clúster con el método Kmeans para agrupar los aislamientos por características homogéneas. Para la variable cuantitativa producción de sideróforos se validaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad y se realizó un ANOVA ($p < 0.05$) seguido de la prueba de comparación de medias Tukey. Todos los análisis fueron realizados con el software R versión 4.1.2.

1.4 Resultados y discusión

1.4.1 Caracterización de aislamientos bacterianos productores de sideróforos

Colonias bacterianas aisladas

Se aisló un total de 162 colonias bacterianas con aspecto morfológico distintivo por muestra de rizosfera y filosfera de árboles silvestres de cacao, el 48.1% proceden de la región del Caquetá y el 51.7% de la región del Putumayo. El 35% de colonias se obtuvo a partir de muestras de filosfera de los árboles de cacao muestreados en las zonas del Putumayo, mientras que en las muestras del Caquetá predominaron las colonias bacterianas de la rizosfera (33%) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de colonias bacterianas asociadas a rizosfera y filosfera de especies silvestres de cacao en la región amazónica de los departamentos de Caquetá y Putumayo

| Región | Ubicación | Número de colonias bacterianas | | Total |
|----------|-----------|--------------------------------|-----------|-------|
| | | Filosfera | Rizosfera | |
| Caquetá | Zona 1 | 7 | 24 | 31 |
| | Zona 2 | 8 | 21 | 29 |
| | Zona 3 | 9 | 9 | 18 |
| Putumayo | Zona 4 | 23 | 10 | 33 |
| | Zona 5 | 35 | 16 | 51 |

Esta diferencia entre regiones dada por el tipo de muestra pudo estar asociada con las características de las zonas muestreadas que se describen a continuación de manera general para efectos de la presente investigación. Sin embargo, estos resultados hacen parte de la expedición Cacao Colombia-Bio y se encuentran en proceso de publicación por Gonzalez et al., (2022). Las zonas muestreadas de la región del Caquetá (Zona 1, 2 y 3) aledañas al municipio de Cartagena del Chaira, se caracterizan por ser áreas de bosques inundables y de tierra firme, formadas por una abundante capa de mantillo. Estas zonas presentan mayor radiación solar, menor precipitación y humedad relativa. Las zonas 4 y 5 de la región del Putumayo se encuentran cerca al municipio de Puerto Leguizamo, son zonas de bosques de tierra firme, bien drenadas y de planicie inundable, formadas por una delgada capa de mantillo. Las zonas se caracterizan por presentar menor radiación solar, mayor precipitación y humedad relativa. Algunos rasgos morfológicos de las hojas de las especies de cacao colectadas tanto en la región del Caquetá como en el Putumayo difieren en tamaño, consistencia, textura y color.

Considerando lo anterior, surge la hipótesis de que las condiciones climáticas y geográficas pueden estar determinando la carga de inóculo microbiano de la rizosfera y filosfera de cacao de cada región. Según Arnold & Herre, (2003), las diferencias en la abundancia de propágulos epifitos y endófitos en las hojas de cacao pueden variar de acuerdo con las condiciones de humedad y radiación. Así mismo, se ha demostrado que parámetros como la precipitación pueden afectar la población de bacterias del filoplano de esta especie vegetal debido a la humedad constante de las hojas en comparación con las que habitan la rizosfera, en donde las condiciones de temperatura y humedad son menos variables (Alves-Júnior et al., 2021). Así mismo, factores abióticos como la edad de la hoja, la luz

ultravioleta y la humedad relativa se reportan como los principales impulsores de la diversidad y abundancia del microbioma de la filosfera (Thapa & Prasanna, 2018).

Por otro lado, la forma como se preservaron las muestras durante la expedición (condiciones oligotróficas) junto con las condiciones de cultivo (condiciones ambientales de la región simuladas) permitieron que se asilaran colonias bacterianas poco exigentes en nutrientes, de crecimiento lento y presentes en una baja densidad, lo que también pudo influir en el número de colonias obtenidas.

Caracterización morfológica de colonias bacterianas productoras de sideróforos

Las 162 colonias bacterianas fueron evaluadas por su capacidad de producir sideróforos bajo restricción de hierro (0 μM), con el fin de seleccionar colonias candidatas con alto potencial en la producción de estos metabolitos. Los resultados obtenidos, indican que 83 colonias pueden sintetizar sideróforos en un rango de 40 -100% US. Durante la reacción química el cambio de coloración de azul a naranja no fue homogéneo entre colonias y este influyó en el índice de US calculado. Por ello la producción del quelante férrico en este estudio fue clasificada en tres categorías en función de la cantidad de metabolito sintetizado: baja, media y alta. Las colonias bacterianas que presentaron valores de US superiores al 80% (color amarillo-naranja-rojo) se consideraron con alta producción; valores entre 60 - 80% de US producción media (color marrón y verde amarillo); y baja producción aquellas con US de 40- 60% (color gris plata). Porcentajes de US menores a 40 se consideraron como cepas no productoras (coloración azul-verde). Esta variación en la coloración ha sido atribuida principalmente a la concentración de sideróforos y a la presencia de moléculas quelantes de diferente naturaleza química que determinan el cambio entre naranja, rojo y amarillo (Chaiharn et al., 2009). Otros autores han señalado que el pH de la solución CAS interfiere en la coloración de los grupos químicos hidroxamatos (naranja rojizo) y catecol (purpura rojizo) (Milagres et al., 1999; Payne, 1994).

Las 83 colonias bacterianas con actividad promisorio para quelar hierro mediante la producción de sideróforos se caracterizaron morfológicamente. En la tabla 6 se describen

las características macroscópicas, microscópicas y la producción de sideróforos obtenida para las 83 colonias bacterianas.

Los rasgos de forma color y superficie de la colonia permitieron identificar 13 morfotipos bacterianos, siendo las colonias redondas cremosas con superficie brillante el morfotipo más abundante (28.9%) seguido de colonias blancas de forma irregular y superficie rugosa (13.2%). Microscópicamente el 40% de las colonias se identificaron como bacilos y cocobacilos Gram negativos; el 48% como cocos y bacilos Gram positivos; y un grupo de ocho aislamientos (9.6%) sin determinar por la ausencia de tinción. En este estudio, las colonias productoras de sideróforos en su mayoría fueron bacterias Gram positivas. Contrario a esto, Milagres et al., (1999) y Tian et al., (2009) señalan detectar con mayor frecuencia sideróforos en bacterias Gram negativas, debido a que las bacterias Gram positivas inhiben su crecimiento por la toxicidad del compuesto bromuro de hexadeciltrimetilamonio necesario en la reacción colorimétrica CAS (Schwyn & Neilands, 1987b). En este estudio la prevalencia de bacterias grampositivas productoras de sideróforos puede ser explicada por el método de detección utilizado (método cuantitativo Chrome Azurol Sulfuro) el cual no requiere que el microorganismo crezca en presencia del compuesto bromuro de hexadeciltrimetilamonio que es el compuesto tóxico reportado que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas (Chaiharn et al., 2009).

Tabla 6. Descripción de las características macroscópicas, microscópicas y la producción de sideróforos de las 83 colonias bacterianas identificadas como candidatos potenciales.

| ID Colonias | Zona de muestreo | Tipo muestra | Características macroscópicas | | | Características microscópicas | | Sid* |
|-------------|------------------|--------------|-------------------------------|----------|------------|-------------------------------|------|-------|
| | | | Forma | Color | Superficie | Morfología | Gram | |
| CBIO02 | 1 | Rizosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO03 | 1 | Rizosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocos | + | Baja |
| CBIO04 | 1 | Rizosfera | Rizoide | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO09 | 1 | Rizosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Cocos | + | Media |
| CBIO010 | 1 | Rizosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO013 | 1 | Rizosfera | Redonda | Amarillo | Brillante | Cocobacilos | - | Baja |
| CBIO016 | 1 | Rizosfera | Rizoide | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO017 | 1 | Rizosfera | Redonda | Crema | Seca | Bacilos | + | Baja |
| CBIO021 | 2 | Rizosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO023 | 5 | Rizosfera | Redonda | Blanco | Seca | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO024 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |

| | | | | | | | | |
|---------|---|-----------|-------------|----------|------------|-------------|------|-------|
| CBIO025 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Brillante | Cocos | + | Baja |
| CBIO026 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocobacilos | - | Baja |
| CBIO027 | 5 | Rizosfera | Redonda | Blanco | Seca | Bacilos | + | Alta |
| CBIO031 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocos | + | Media |
| CBIO032 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocos | + | Media |
| CBIO034 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Traslúcida | Cocos | + | Alta |
| CBIO035 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocos | + | Media |
| CBIO037 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Rugosa | Cocos | + | Alta |
| CBIO038 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Rugosa | Cocos | + | Baja |
| CBIO043 | 5 | Rizosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Baja |
| CBIO049 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Traslúcida | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO063 | 2 | Rizosfera | Redonda | Amarillo | Brillante | Sd** | Sd** | Media |
| CBIO064 | 2 | Rizosfera | Redonda | Amarillo | Brillante | Sd** | Sd** | Media |
| CBIO068 | 1 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO069 | 3 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO070 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Seca | Cocos | + | Baja |
| CBIO075 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Sd** | Sd** | Media |
| CBIO076 | 1 | Filosfera | Irregular | Crema | Seca | Bacilos | - | Media |
| CBIO079 | 2 | Filosfera | Irregular | Crema | Rugosa | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO085 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Traslúcida | Bacilos | + | Media |
| CBIO086 | 3 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO089 | 2 | Filosfera | Redonda | Blanco | Rugosa | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO090 | 3 | Filosfera | Redonda | Crema | Seca | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO091 | 3 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO096 | 4 | Filosfera | Redonda | Amarillo | Brillante | Sd** | Sd** | Baja |
| CBIO098 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Sd** | Sd** | Baja |
| CBIO101 | 3 | Rizosfera | Irregular | Crema | Traslúcida | Bacilos | - | Alta |
| CBIO104 | 5 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Alta |
| CBIO105 | 5 | Filosfera | Redonda | Amarillo | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO106 | 2 | Rizosfera | Irregular | Crema | Brillante | Cocos | + | Media |
| CBIO107 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO108 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO109 | 1 | Rizosfera | Redonda | Crema | Seca | Bacilos | - | Media |
| CBIO110 | 4 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Alta |
| CBIO112 | 5 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Alta |
| CBIO113 | 2 | Rizosfera | Irregular | Blanco | Brillante | Cocos | + | Baja |
| CBIO114 | 5 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Alta |
| CBIO116 | 1 | Rizosfera | Concéntrica | Crema | Seca | Bacilos | - | Alta |
| CBIO117 | 5 | Rizosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO118 | 2 | Rizosfera | Redonda | Crema | Seca | Bacilos | - | Alta |
| CBIO120 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | - | Alta |
| CBIO121 | 4 | Filosfera | Concéntrica | Crema | Seca | Bacilos | + | Alta |
| CBIO122 | 5 | Rizosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocos | + | Alta |
| CBIO123 | 5 | Rizosfera | Redonda | Blanco | Traslúcida | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO124 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Sd** | Sd** | Alta |

| | | | | | | | | |
|---------|---|-----------|-----------|--------|------------|-------------|------|-------|
| CBIO126 | 5 | Filosfera | Redonda | Blanco | Seca | Cocos | + | Alta |
| CBIO127 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO128 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | - | Media |
| CBIO129 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO130 | 4 | Filosfera | Irregular | Blanco | Rugosa | Bacilos | + | Media |
| CBIO131 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO132 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO133 | 5 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO134 | 5 | Filosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocos | + | Alta |
| CBIO135 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Sd** | Sd** | Alta |
| CBIO136 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO137 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | + | Media |
| CBIO138 | 4 | Filosfera | Irregular | Crema | Traslúcida | Cocos | + | Alta |
| CBIO139 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | - | Alta |
| CBIO140 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Traslúcida | Sd** | Sd** | Media |
| CBIO141 | 5 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO142 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | - | Media |
| CBIO143 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | + | Media |
| CBIO144 | 4 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Cocobacilos | - | Media |
| CBIO145 | 5 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Bacilos | - | Alta |
| CBIO148 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO149 | 4 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO150 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | + | Alta |
| CBIO153 | 4 | Filosfera | Irregular | Crema | Seca | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO154 | 5 | Filosfera | Redonda | Blanco | Brillante | Cocos | + | Alta |
| CBIO159 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Rugosa | Cocobacilos | - | Alta |
| CBIO161 | 5 | Filosfera | Redonda | Crema | Brillante | Bacilos | + | Alta |

*Sid: Producción de sideróforos; **Sd: Sin determinar

Debido al amplio número de morfotipos y a que las colonias bacterianas que registraron una alta producción del metabolito compartían varias características morfológicas, se evaluó si el nivel de producción de sideróforos se encontraba asociado a una zona de muestreo en particular o tipo de muestra (rizosfera, filosfera). Para ello, se realizó un ACM, el cual permitió identificar que la categoría de producción de sideróforos se asociaba con algunas zonas de muestreo. Este análisis permitió explicar con 3 dimensiones el 60.2% de la varianza total, cada una con un porcentaje de contribución de 25.8, 18.9 y 15.5 respectivamente. La primera dimensión definida por la zona 1 y 5 de muestreo con alta producción de sideróforos; la segunda dimensión determinada por la zona 4 y 5 con producción media del metabolito y la tercera dimensión por la zona 1, 2, 3, y 4 con baja producción de sideróforos.

Basados en estos resultados y en búsqueda de conformar grupos heterogéneos que agruparan colonias con características semejantes se realizó un análisis de clúster, el cual clasificó las colonias bacterianas en cuatro grupos. El clúster 1 representado en su mayoría por colonias de la rizosfera de la zona 1 con una producción de sideróforos baja-media; el clúster 2 conformado principalmente por colonias de la rizosfera de la zona 5 que tienen una alta producción de sideróforos; el clúster 3 considerado un grupo heterogéneo por reunir colonias de la filosfera de la zona 2, 3 y 5 que tienen la capacidad de sintetizar sideróforos en todos los niveles y por último el clúster 4 que agrupó las colonias de la filosfera de la zona 5 con alta producción de sideróforos (Figura 4).

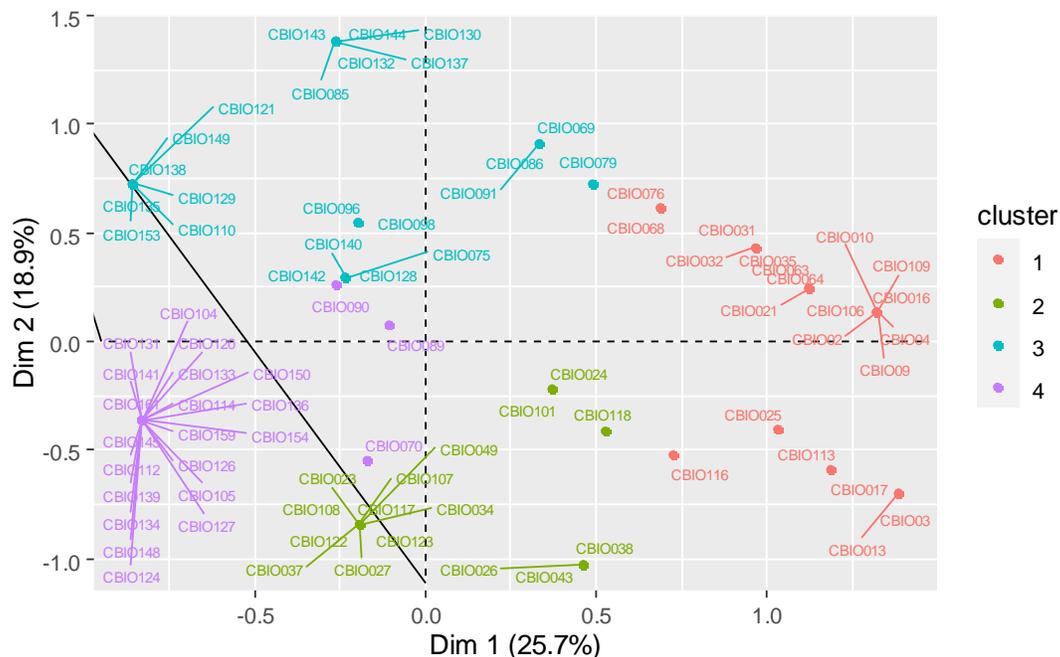


Figura 4. Análisis de clúster algoritmo K-means. Colonias bacterianas productoras de sideróforos. Clúster 1 (21 colonias bacterianas), clúster 2 (16 colonias bacterianas), clúster 3 (23 colonias bacterianas) y clúster 4 (23 colonias bacterianas).

De los cuatro clústeres se eligió un total de 15 aislamientos bacterianos que representaran las cinco zonas de muestreo, el tipo de muestra (rizosfera y filosfera) y que tuvieran una producción de sideróforos mayor a 60% US. Los aislamientos seleccionados fueron los siguientes: clúster 1 (*CBIO021* y *CBIO116*); clúster 2 (*CBIO024*, *CBIO101*, *CBIO117*,

CBIO118 y CBIO123); clúster 3 (CBIO086, CBIO121, CBIO142 y CBIO149); y clúster 4 (CBIO120, CBIO127, CBIO133 y CBIO159).

Identificación molecular de aislamientos bacterianos

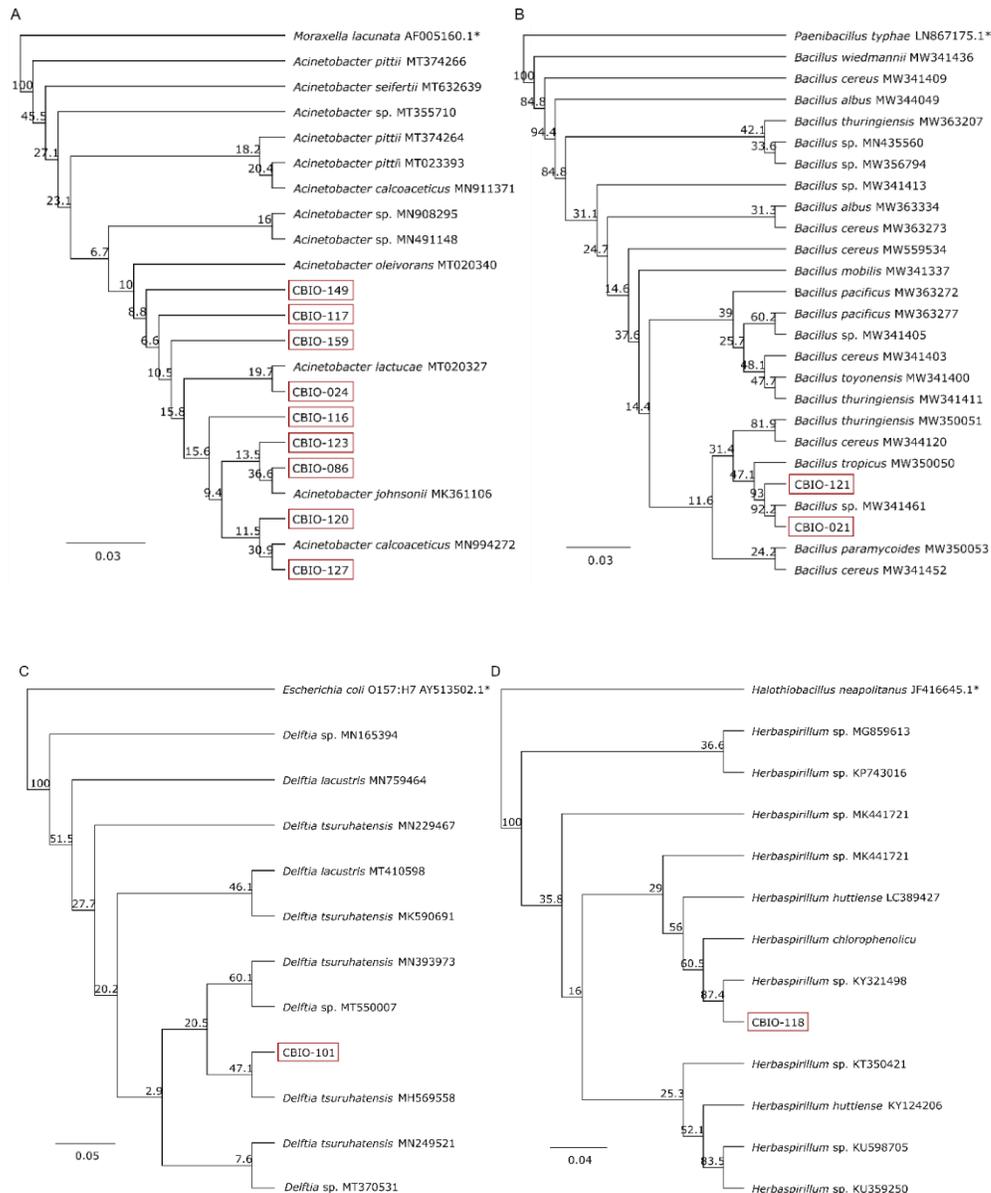
En la tabla 7 se muestran los resultados de la identificación molecular de los aislamientos. La accesión que se registra corresponde a la primera accesión con la que se alinea la secuencia en el Blast, ya que existen varias accesiones reportadas en la base de datos con igual % de identidad y de cobertura. Lo anterior confirma que la secuencia parcial del gen ribosomal 16S no es suficiente para distinguir entre especies. Por lo tanto, a pesar de indicar una accesión en la tabla, la identidad taxonómica del aislamiento se muestra solamente a nivel de género.

Tabla 7. Identificación molecular de los aislamientos bacterianos con potencial para producir sideróforos.

| Id aislamiento | Accesión | % de cobertura | % de identidad | E-value | Género |
|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|---------|---------------------------|
| CBIO021 | NR_157736 | 100 | 100 | 2e-48 | <i>Bacillus</i> sp. |
| CBIO024 | NR_152004.1 | 100 | 100 | 9e-69 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO086 | NR_152004.1 | 100 | 100 | 9e-64 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO101 | NR_113870.1 | 100 | 100 | 3e-42 | <i>Delftia</i> sp. |
| CBIO116 | NR_152004.1 | 100 | 100 | 6e-76 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO117 | NR_102814.1 | 100 | 100 | 9e-64 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO118 | NR_163661.1 | 100 | 100 | 7e-54 | <i>Herbaspirillum</i> sp. |
| CBIO120 | NR_152004.1 | 100 | 98.9 | 9e-147 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO121 | NR_157736.1 | 100 | 100 | 5e-66 | <i>Bacillus</i> sp. |
| CBIO123 | NR_152004.1 | 100 | 100 | 2e-76 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO127 | NR_117619.1 | 100 | 100 | 2e-60 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO133 | NR_157762.1 | 100 | 100 | 1e-62 | <i>Serratia</i> sp. |
| CBIO142 | NR_145562.1 | 100 | 100 | 7e-54 | <i>Pseudomonas</i> sp. |
| CBIO149 | NR_102814.1 | 100 | 100 | 3e-63 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| CBIO159 | NR_102814.1 | 100 | 100 | 1e-45 | <i>Acinetobacter</i> sp. |

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA para los 15 aislamientos seleccionados permitió identificar un total de seis géneros bacterianos. Nueve aislamientos se ubicaron por homología de las secuencias en el género *Acinetobacter* Brisou & Prevot, 1954 (Figura

5A), dos en el género *Bacillus* Cohn 1872 (Figura 5B) y un único aislamiento en los géneros *Delftia* Wen et al. 1999 (Figura 5C), *Herbaspirillum* Baldani et al. 1986 (Figura 5D), *Pseudomonas* Migula 1894 (Figura 5E) y *Serratia* Bizio 1823 (Figura 5F).



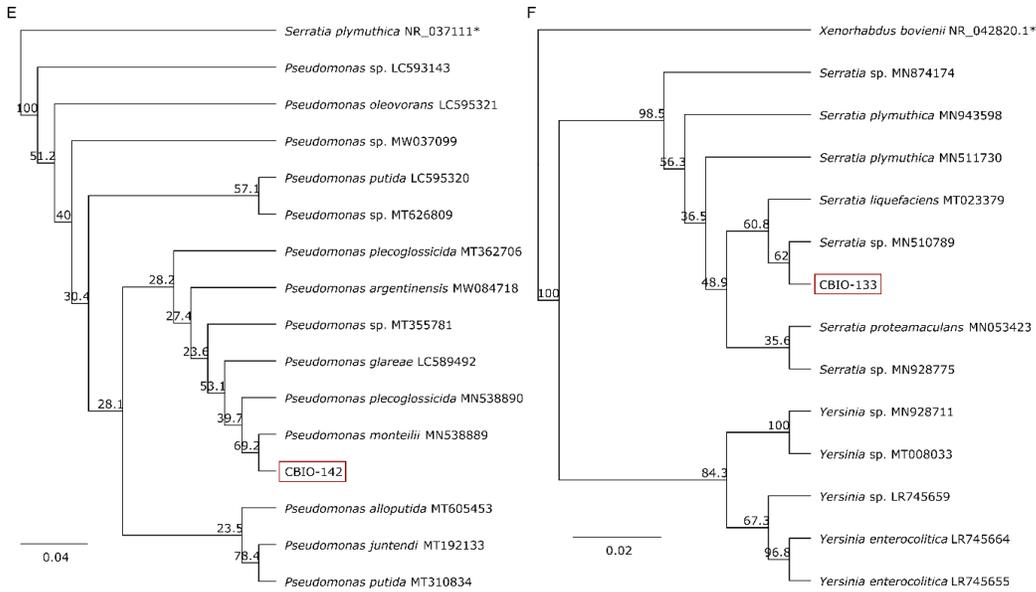


Figura 5. Árboles filogenéticos usando el algoritmo neighbor-joining basados en la secuencia parcial del gen 16S rRNA. A. árbol filogenético del género *Acinetobacter*, B. árbol filogenético género *Bacillus*, C. árbol filogenético género *Delftia*, D. árbol filogenético género *Herbaspirillum*, E. árbol filogenético género *Pseudomonas*, F. árbol filogenético género *Serratia*. Las barras indican sustituciones por posición de nucleótido. Cada aislamiento se visualiza en un recuadro rojo.

La mayoría de las bacterias identificadas pertenecieron al grupo de las proteobacterias en donde el género predominante fue *Acinetobacter* sp. Es de importancia mencionar que todos los géneros bacterianos identificados a excepción de *Delftia* sp. se han reportado como microorganismos asociados al cacao. Taxones como *Acinetobacter*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* y *Pseudomonas* se han encontrado como microorganismos endófitos de cacao (Leite et al., 2013; Leiva et al., 2013; Argüello-Navarro & Moreno-Rozo, 2014; García, 2019 Cáceres et al., 2021;) con actividad promotora del crecimiento vegetal por rasgos fisiológicos como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas, la producción de quitinasas y la producción de sideróforos (Hipólito-Romero et al., 2017; Kang et al., 2012; Purkayastha et al., 2018). Además, a algunos géneros como *Serratia* y *Acinetobacter* se les ha atribuido propiedades como microorganismos fermentadores del cacao y biorremediadores de cadmio (Binh et al., (2017). Recientemente, se confirmó la capacidad de aislamientos de *Serratia* obtenidos en la rizosfera de cacao de tolerar altas concentraciones de cadmio (Cáceres et al., 2021).

Finalmente, no se encontraron reportes del género *Delftia* sp. asociado a la rizosfera o filosfera de cacao, siendo este el primer reporte de esta bacteria en la rizosfera de cacao.

En varios de los géneros aislados se ha demostrado la producción de más de un sideróforo, ejemplo de ello, son los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia*. *Acinetobacter* se destaca por secretar una extensa gama de quelantes férricos del grupo hidroxamato, catecol y mixto. Algunos de ellos son: baumannoferrin A y B; acinetoferrina, preacinetobactina, acinetobactina, acromobactina y fimsbactinas A-F (Penwell et al., 2015; Sheldon & Skaar, 2020). *Pseudomonas* también produce un grupo variado de sideróforos ampliamente estudiados como la pioverdina, ferrioxamina, pioquelina y ferribactina (Aguilar et al., 2021). En el género *Serratia* se han detectado los sideróforos serratiochelin, crisobactina, aerobactina y enterobactina (Ehlert et al., 1994; Weakland et al., 2020). En *Bacillus* por el contrario solo se han descrito dos sideróforos la bacilibactina y petrobactina (Wilson et al., 2006). A diferencia de los anteriores taxones, en los géneros *Herbaspirillum* y *Delftia* solo se ha evidenciado un único quelante férrico la serobactina A B C y la delfibactina A respectivamente (Rosconi et al., 2013; Tejman-Yarden et al., 2019).

1.4.2 Evaluación de la producción de sideróforos

La concentración de sideróforos producida por los 15 aislamientos bacterianos varió entre $2.7 \mu\text{M} \pm 0.3$ (*Delftia* sp., CBIO101) y $129.9 \mu\text{M} \pm 19.1$ (*Acinetobacter lactucae*, CBIO123). La máxima producción se encontró en los aislamientos CBIO024, CBIO086, CBIO123 (*Acinetobacter lactucae*), CBIO117 y CBIO 159 (*Acinetobacter oleivorans*), con una concentración de $99 \mu\text{M} \pm 6.2$, $91 \mu\text{M} \pm 7.6$, $129 \mu\text{M} \pm 19.1$, $107 \mu\text{M} \pm 5.8$ y $114 \mu\text{M} \pm 11.1$ equivalentes de DFOM, respectivamente (Figura 5A). En los aislados identificados como *Delftia* y *Pseudomonas* (CBIO101 CBIO142) la concentración del metabolito no superó los $4.6 \mu\text{M}$, esta baja concentración aunque no significa la ausencia del metabolito se clasificó como insuficiente producción (Figura 6A). En la figura 6B se observa que el crecimiento celular alcanzado por cada aislamiento (UFC. mL^{-1}) no tuvo una relación proporcional con la cantidad de metabolito secretado.

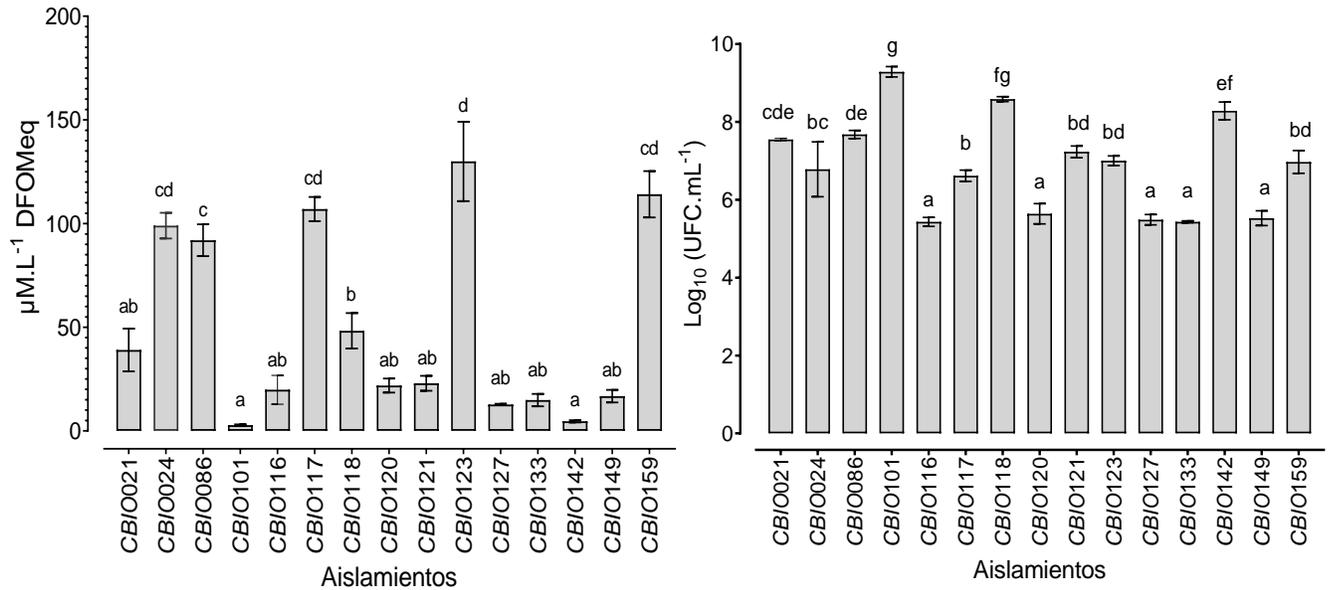


Figura 6. Aislamientos bacterianos productores de sideróforos. A. Concentración de sideróforos expresada en $\mu\text{M.L}^{-1}$ equivalentes de DFOM B. Concentración celular (UFC.mL $^{-1}$) 72 horas después de la incubación. Barras con la misma letra indican que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, P<0.05), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un n=3.

Aunque la carencia de hierro es el principal factor para que los microorganismos secreten sideróforos, otros factores como la fuente de carbono, el pH, la temperatura y el tiempo de incubación influyen en la actividad metabólica de las bacterias para producirlos (Sayyed et al., 2005; Yu et al., 2017). Sin embargo, estudios realizados por Modarresi et al., (2015) demostraron que la temperatura entre 30 y 40 °C y el pH entre 5 y 9 no tuvo un efecto significativo en la cantidad de sideróforos secretada por aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. En el caso de *Delftia sp.*, la temperatura regula la secreción de estos metabolitos encontrándose una producción óptima a 30 °C (Tejman-Yarden et al., 2019).

Por otro lado, se ha descrito que la producción de sideróforos suele estar regulada por la detección de moléculas *quorum sensing* (QS) que cuando se acumulan pueden reprimir o

estimular la síntesis de sideróforos, originando un aumento o disminución en la tasa de producción a una alta densidad celular (Wen et al., 2012; McRose et al., 2018). Algunas hipótesis han surgido al respecto, entre ellas que las moléculas QS reprimen la producción de sideróforos una vez el microorganismo ha captado el hierro para el crecimiento y dispersión, mientras que estimulan la producción para la expresión de factores de virulencia (McRose et al., 2018).

En la bacteria identificada como *A. baumannii* se ha demostrado que la limitación de hierro (Fe^{3+}) regula la formación de biopelículas por la inducción de señales de QS dependientes de la N-acil homoserina lactona que le permiten a las células su supervivencia en ambientes con micronutrientes limitados (Tiwari et al., 2019). Este mismo autor señala que las cepas de *A. baumannii* con resistencia al antibiótico carbapenem secretan más sideróforos en condiciones limitadas de hierro. Goel et al., (1998), describió que *A. baumannii* retarda su crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro, secreta extracelularmente sideróforos tipo catecol que actúan como quelantes de hierro en los sobrenadantes y desarrolla cuatro proteínas de membrana externa reguladas por hierro. En *Pseudomonas aeruginosa* se ha comprobado que la señal de quinolona, además de desempeñar un papel como molécula de QS, tiene una alta afinidad por el hierro, el cual pueden secuestrar para luego inducir la expresión de genes para la síntesis de sideróforos como pioverdina y piochelina (Popat et al., 2017; Lin et al., 2018;). Además, mutantes nulos en el gen *LasR* de *Pseudomonas aeruginosa* exhibieron una disminución en la producción del sideróforo pioverdina durante el crecimiento en condiciones limitantes de hierro (Stintzi et al., 1998). El sistema QS de *Serratia* gobierna la secreción de factores de virulencia entre ellos los sideróforos (Srinivasan et al., 2017). En los otros géneros bacterianos objeto estudio como *Delftia* sp., *Bacillus* sp., y *Herbaspirillum* sp. no se encontraron reportes sobre la regulación de la producción de sideróforos mediante moléculas QS.

También se ha informado la participación de los sideróforos como factores de virulencia. Por ejemplo, el sideróforo acinetobactina sintetizado por *Acinetobacter baumannii* es un factor de virulencia necesario para el secuestro de hierro durante la infección en seres humanos (Shapiro & Wencewicz, 2016; Sheldon & Skaar, 2020). En *Pseudomonas* sp., los sideróforos pueden actuar como moléculas señalizadoras para la producción de factores de virulencia como la exotoxina A y la endoproteína PrpL (Bonneau et al., 2020).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, los aislamientos de *Acinetobacter lactucaae* (CBIO024, CBIO086 y CBIO123) y *Acinetobacter oleivorans* (CBIO117 y CBIO159) fueron seleccionados por mostrar la mayor producción de la molécula.

1.4.3 Relación de la concentración de hierro con la producción de sideróforos de *Acinetobacter* sp.

Los resultados obtenidos demuestran que la síntesis de sideróforos se ve afectada por la concentración de hierro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) disponible en el medio de cultivo. En la figura 7 se observa que la mayor concentración del quelante se obtuvo cuando las cepas bacterianas crecieron en ausencia de hierro ($0 \mu\text{M}$) con una concentración promedio de $43 \mu\text{M}$ equivalentes de DFMO. A pesar de que no se observan diferencias significativas entre aislamientos, la concentración cuantificada fue más alta en los aislamientos CBIO159 ($46.91 \pm 2.7 \mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$) y CBIO117 ($45.46 \pm 2.1 \mu\text{M} \cdot \text{L}^{-1}$) clasificados taxonómicamente dentro del género *Acinetobacter* sp. El análisis también mostró que la concentración de sideróforos se reduce a medida que aumenta la concentración de hierro hasta el punto de no detectarse por medio del ensayo CAS, la producción del metabolito con concentraciones de $220 \mu\text{M}$ de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Figura 7).

Con relación a la concentración celular bacteriana, se evidenció que la adición de hierro al medio de cultivo incrementa el número de UFC. mL^{-1} de los aislamientos CBIO024 (6 UFC. mL^{-1}), CBIO117 (7 UFC. mL^{-1}) y CBIO123 (7 UFC. mL^{-1}) (Figura 8). Resultados similares fueron registrados por Goel et al., (1998) en donde la adición de FeSO_4 como fuente de hierro al medio de cultivo con inóculo de *Acinetobacter* incrementó el crecimiento a 7 UFC. mL^{-1} . En contraste, se observó una disminución en el número de UFC. mL^{-1} del aislamiento CBIO159 en concentraciones de $22 \mu\text{M}$ (3 UFC. mL^{-1}) y $220 \mu\text{M}$ (0 UFC. mL^{-1}), esto pudo deberse posiblemente a que el elemento estuvo altamente disponible para la bacteria favoreciendo su multiplicación y alcanzando la fase estacionaria más rápido con respecto a los otros aislamientos de *Acinetobacter* sp. Se descarta la posibilidad que a concentraciones de $22 \mu\text{M}$ y $220 \mu\text{M}$ se generara un efecto tóxico en el aislamiento CBIO159, ya que se evidenció crecimiento en el medio de cultivo y la producción de sideróforos no fue significativamente diferente respecto a los otros aislados. (Figura 8).

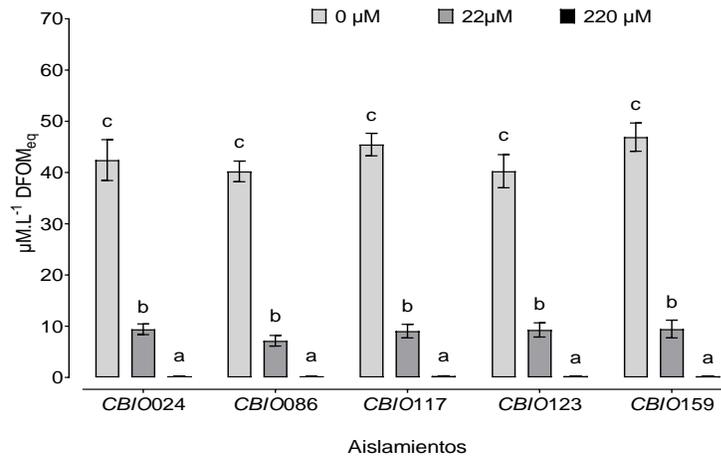


Figura 7. Producción de sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en medio mínimo sin hierro y suplementado con una concentración de 22 μM y 220 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Barras con la misma letra significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $P < 0.05$), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=4$.

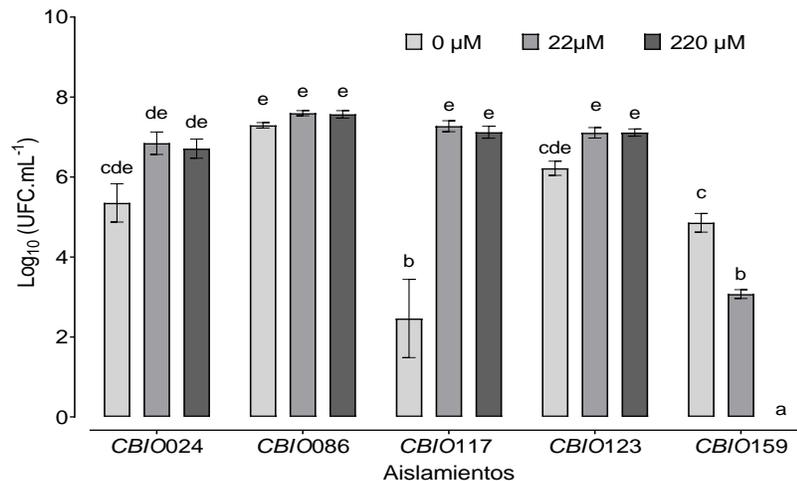


Figura 8. Concentración celular (UFC.mL⁻¹) de aislamientos de *Acinetobacter* sp. después de 72 horas de inducirse la producción de sideróforos en medio mínimo sin hierro y suplementado con una concentración de 22 μM y 220 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Barras con la misma letra significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $P < 0.05$), los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=4$.

El género *Acinetobacter* Brisou & Prevot, (1954), ha sido ampliamente documentado por su metabolismo versátil (Radó et al., 2019). Investigaciones desarrolladas por Khan et al. (2018); Sridevi & Mallaiah (2008); y Villegas et al. (2002), demuestran que la concentración

de hierro influye en la síntesis del quelante. Resultados similares fueron encontrados por Maindard et al. (2014), quienes demostraron que la cepa de *Acinetobacter* HIRFA32 en deficiencia de hierro secreta altas concentraciones de sideróforos que decrecen en presencia del metal y estimulan el crecimiento celular. Modarresi et al. (2015), evaluaron la capacidad de *A. baumannii* de producir sideróforos en 20, 50 y 80 μM de FeCl_3 encontrando una producción del 70% de US a 20 μM , la cual disminuyó a mayores concentraciones de hierro. Así mismo, observaron que la producción de moléculas N-acil homoserina lactonas y la formación de biopelículas fueron reguladas negativamente a medida que aumentaba la concentración de hierro. Sayyed et al. (2005), indican que la represión en la síntesis del metabolito se debe a la disponibilidad de hierro requerida para llevar a cabo los procesos celulares. Estudios con cepas de *Bacillus*, y especies de *Pseudomonas* confirman que el estrés por deficiencia de hierro genera una mayor producción de sideróforos (Yu et al., 2017; S. Yu et al., 2017). Por otra parte, al ser *Acinetobacter* un género que puede excretar más de un sideróforo es posible que la concentración de hierro disponible condicione el tipo de sideróforo que se sintetiza ya que la producción de sideróforos puede ser ajustada en función de la disponibilidad de hierro. En *P. aeruginosa*, si la condición de hierro es limitada se produce pioverdina y si es más accesible pioquelina (Dumas et al., 2013).

Conclusiones

- Se identificaron bacterias de los géneros *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. como microorganismos productores de sideróforos asociados a la rizosfera y filosfera de árboles silvestres de cacao.
- Los aislamientos del género *Acinetobacter* sp. *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159* presentaron la mayor eficiencia en la producción de sideróforos en condiciones de deficiencia de hierro.
- En este estudio se demuestra que la producción de sideróforos es regulada por la cantidad de hierro disponible, a mayor concentración de hierro menor producción de sideróforos.

2. Capítulo 2. Respuesta de defensa relacionada con la aplicación de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. en el patosistema Tomate-*Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*

2.1 Resumen

La marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* (*Fo*), es una de las principales enfermedades que limitan la producción de tomate en Colombia. Su manejo se ha limitado al uso de agroquímicos, al uso de variedades resistentes y a prácticas en el cultivo evitando el ingreso a áreas sanas posterior a la visita a un cultivo afectado por la enfermedad. Dada la naturaleza del patógeno estas medidas no son suficientes y ha sido necesario considerar otras estrategias. El control biológico ofrece una alternativa prometedora para el manejo de la marchitez vascular, debido a su naturaleza ecológica y a sus variados mecanismos de acción. Entre estas se encuentran el uso de microorganismos o de metabolitos como los sideróforos, los cuales pueden actuar en el control de fitopatógenos al secuestrar y reducir las cantidades de Fe^{3+} disponibles para los patógenos, como moléculas antimicrobianas o a través de la inducción de respuestas de defensa en las plantas. En este estudio, se evaluó el efecto de la aplicación de sobrenadantes bacterianos con sideróforos (*SodSid*) de cinco aislamientos de *Acinetobacter* sp. (*CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159*) en el control de *Fo*/59 y su relación con la inducción de respuestas de defensa en la planta. Además, se determinó el efecto de la aplicación de estos metabolitos en parámetros de crecimiento de las plantas. Los resultados obtenidos demostraron que la aplicación de los *SodSid* de todos los aislamientos de *Acinetobacter* sp. evaluados generaron el control de la enfermedad,

logrando aumentar el periodo de incubación y disminuyendo la severidad de la enfermedad. El mayor control se obtuvo con los *SodSid* de *Acinetobacter* CBIO117 que lograron disminuir en un 45% el AUDPC de la severidad de la enfermedad y aumentar el contenido de biomasa seca (g) en un 64% en plantas infectadas. De igual manera, el tratamiento de las raíces de tomate con *SodSid* de *Acinetobacter* CBIO117, logró inducir la expresión de los genes *PR1* y *ERF1* tanto en las plantas infectadas como no infectadas con *Fo59*, mientras que, el gen *MYC2* solo se expresó en las plantas infectadas con *Fo59* tratadas y sin tratar con *SodSid*. Estos resultados demuestran el potencial biocontrolador que tienen los sobrenadantes con sideróforos de aislamientos del género *Acinetobacter* sp. en la disminución del marchitamiento vascular del tomate, actuando como posibles elicitores de la respuesta de defensa de la planta.

2.2 Introducción

El marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*FoI*) es una de las enfermedades de origen fúngico más limitante del cultivo, debido a que afecta el sistema vascular de la planta al obstruir el flujo de agua y nutrientes provocando así su muerte (Vásquez-Ramírez & Castaño-Zapata, 2017). Se estima que una alta incidencia de *FoI* disminuye los rendimientos del cultivo hasta en un 60% (Srinivas et al., 2019). Las alternativas de control tradicionales para el manejo de la enfermedad se restringen al uso de agroquímicos de amplio espectro, los cuales son altamente tóxicos y han dado lugar a la aparición de cepas de patógenos resistentes dificultando cada vez más su control (Villa Martínez et al., 2014). Otras alternativas, como el uso de variedades resistentes aunque han resultado ser exitosas para disminuir la incidencia de *FoI*, no han evitado la aparición de nuevas razas o biotipos del hongo que quiebran la resistencia, planteando un desafío para controlar la enfermedad (Báez-Valdez et al., 2010). Por el contrario, el uso de microorganismos benéficos ha revelado a través de diferentes mecanismos de acción un efecto supresivo sobre el desarrollo de los fitopatógenos; sin aún confirmarse el desarrollo de resistencia a estos agentes de biocontrol y/o sus derivados (Bardin et al., 2015; Bardin & Nicot, 2018; Köhl et al., 2019). El uso de bacterias en el control biológico, ha sido de gran interés ya que además de su capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos mediante la producción de compuestos antimicrobianos, enzimas líticas, sideróforos entre otros, también pueden inducir resistencia en la planta y actuar como promotoras del crecimiento vegetal al mejorar la disponibilidad de nutrientes y sintetizar fitohormonas (Moreno Reséndez et al., 2018; Karthika et al., 2020). Un aspecto importante que potencializa el uso de las bacterias como agentes de biocontrol es que estos microorganismos pueden hacer uso de uno o varios de sus mecanismos de acción de forma directa o indirecta para controlar los fitopatógenos. Tal es el caso de los sideróforos, producidos por las bacterias para competir de manera directa por el hierro, actuar como antimicrobianos o inducir la activación de respuestas de defensa en las plantas (Dellagi et al. 2009; Santoyo et al. 2010).

El papel del hierro en la inmunidad de la planta se ha asociado con la homeostasis de este elemento. El hierro, participa en la transferencia de electrones lo que lo hace imprescindible para varios procesos metabólicos. Sin embargo, puede catalizar la formación de especies

reactivas de oxígeno (ROS) produciendo toxicidad celular dependiendo de su estado de oxidación (Dixon & Stockwell, 2014). Durante la interacción planta-patógeno, el hierro desempeña un papel en la formación de ROS. Las ROS pueden mediar la infección por fitopatógenos al actuar como compuestos antimicrobianos directos que refuerzan las paredes celulares, o acumulando hierro en los lugares de infección (Torres, 2009; Kieu et al. 2012; Aznar et al. 2015). La ausencia de hierro en las plantas impide la producción de ROS, pero puede generar la acumulación de compuestos fenilpropanoides y contribuir a la inmunidad (Aznar et al., 2015a).

Por su parte, las plantas poseen un sistema inmune que les permite evadir o atenuar el ataque de microorganismos patógenos, ya sea por medio de barreras constitutivas o mecanismos de defensa inducibles que son activados por la percepción de moléculas señal asociadas a microbios, patógenos o daños denominadas MAMPs, PAMPs o DAMPs (Microbial, Pathogens o Damage associated Molecular Patterns) (Jones & Dangl, 2006; Saijo et al., 2018). El reconocimiento de estas moléculas por receptores de membrana PRRs (Patern Recognition Receptors) permite la detección temprana de patógenos desencadenando una respuesta de defensa basal llamada inmunidad por patrones moleculares (PTI). La PTI conduce a una serie de eventos de señalización como los son el incremento de los iones de calcio, la acumulación de ROS, la cascada de fosforilación de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), las alteraciones de la pared celular, y la expresión de genes de defensa (De Lorenzo et al., 2018; Gao et al., 2021). Algunos ejemplos de MAMPs presentes en los microorganismos incluyen las flagelinas bacterianas, el factor de elongación, la quitina fúngica, los lipopolisacáridos y los sideróforos (Höfte & Bakker, 2007; Köhl et al., 2019; Nishad et al., 2020). Sin embargo, esta primera línea de defensa no suele ser suficiente para algunos patógenos que tienen la habilidad de evadir o suprimir la PTI, a través de la secreción de proteínas efectoras en la célula hospedera originando la susceptibilidad mediada por efectores (ETS). A su vez los efectores pueden ser reconocidos de manera directa o indirecta por proteínas con dominios de unión de nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR), codificadas por genes de resistencia, induciendo la inmunidad activada por efectores (ETI) (Burbano-Figueroa, 2020; Nishad et al., 2020).

Diversos estudios confirman la actividad biocontroladora de los sideróforos bacterianos y su papel en la respuesta de defensa de la planta. La producción de sideróforos por la cepa

ZUM80 de *Pseudomonas fluorescens* logró inhibir el crecimiento de *Colletorichum* sp. y *Phytophthora* sp. en condiciones *in vitro* (Santoyo et al., 2010). La actividad biocontroladora fue demostrada al inocular el mutante Sid ZUM80 incapaz de producir sideróforos y no observar control. Meziane et al. (2005), destacan el efecto que tiene el sideróforo pseudobactina WCS358 de *Pseudomonas putida* para inducir resistencia sistémica frente a *Botrytis cinerea* en tomate y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol. El tratamiento foliar de hojas de *Arabidopsis* con el sideróforo deferrioxamina protegió la planta contra *Pseudomonas syringae* a través de la inducción de las respuestas de defensa y la homeostasis de metales pesados (Aznar et al., 2014). Sin embargo, no solamente los sideróforos producidos por bacterias Gram negativas han mostrado controlar enfermedades en plantas, por ejemplo, los sideróforos de *Bacillus subtilis* CAS15 han demostrado tener un control en la marchitez causada por *Fusarium* sp. en pimiento (Yu et al., 2011).

La acción biocontroladora de *Acinetobacter* sp. mediante sideróforos contra fitopatógenos ha sido poco estudiada, pese a que se ha demostrado que es un género capaz de producir una amplia gama de estas moléculas. Prashant et al. (2009), evidenciaron que los sideróforos de *Acinetobacter* SCW1 presentes en sobrenadantes libres de células inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum capsicum*. De igual manera, Sayyed & Reddy (2011), demostraron la actividad antifúngica de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* SH-94B frente a los patógenos *A. niger*, *A. flavus*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cercospora arachichola* y *Ralstonia solanacearum*. Por otro lado, se ha informado la capacidad de la fimsbactina sideróforo análogo de *Acinetobacter* de inducir resistencia sistémica en plantas de *Arabidopsis thaliana* contra el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Betoudji, Abd El Rahman, et al., 2020). Considerando el potencial de estos quelantes férricos en el control de enfermedades y que *Acinetobacter* sp. puede producir un número variado de sideróforos, este capítulo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. en el control de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Efecto de sobrenadantes bacterianos con sideróforos en la disminución de la marchitez vascular del tomate causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Para conocer el efecto de la aplicación preventiva de sobrenadantes bacterianos con sideróforos frente a la marchitez vascular del tomate ocasionada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*FoI*) fueron conducidos experimentos *in vivo* en plantas de tomate infectadas con el patógeno.

Los experimentos fueron establecidos bajo condiciones controladas en cuarto de crecimiento vegetal acondicionado con una temperatura de 28°C, humedad relativa de 60% y fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad. Semillas de tomate de la variedad Santa Cruz Kada (Impulse semillas®) previamente desinfectadas con NaClO al 1%, fueron sembradas en bandejas de germinación usando como sustrato turba con 5% de perlita (Mikskaar®). La humedad del sustrato se mantuvo en 30% y las plantas permanecieron en los semilleros hasta los 30 días de edad.

Se utilizó la cepa patogénica identificada como *FoI59* raza 2 provista por el Dr. Mauricio Soto Suárez del centro de investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. En total se evaluaron 5 sobrenadantes bacterianos correspondientes a los aislamientos seleccionados en el capítulo 1 por presentar el mayor potencial para la producción de sideróforos. Estos fueron identificados como *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159* y todos se clasificaron dentro del género *Acinetobacter* sp.

Producción de sobrenadantes bacterianos con sideróforos

Los sobrenadantes con sideróforos de los aislamientos de *Acinetobacter sp.* fueron producidos siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1, numeral 1.3.5. Un total de 800 mL de caldo bacteriano de cada aislamiento fueron centrifugados durante 30 min a 6000 rpm. Las células bacterianas se eliminaron de los sobrenadantes por medio de filtración al vacío usando una membrana Millipore de 0.20 μm y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. En cada uno de ellos, se confirmó la presencia de sideróforos después del almacenamiento mediante la prueba colorimétrica CAS tal como se describió en el numeral 1.3.2.

Producción de inóculo de *Fo/59*

El inóculo de *Fo/59* para la infección de plantas fue preparado a partir de colonias del hongo crecidas en agar papa dextrosa (PDA) durante 14 días, a 28°C. La suspensión de microconidias se obtuvo realizando un raspado superficial de las colonias esporuladas con agua destilada estéril (ADE) y posterior filtrado con muselina. La concentración de microconidias fue ajustada a 1×10^5 microconidios. mL^{-1} mediante conteo en cámara de Neubauer.

Aplicación de sobrenadantes con sideróforos e inoculación de plantas de tomate con *Fo/59*

Las plantas de tomate de 28 días después de la siembra (dds), dispuestas en bandejas de germinación, fueron tratadas con 10 mL de cada sobrenadante bacteriano. La aplicación se hizo por drench 48 horas antes de la inoculación con *Fo/59*. Para la inoculación con el patógeno, las plantas fueron removidas del sustrato e infectadas con una suspensión de 1×10^5 microconidios. mL^{-1} de *Fo/59* por inmersión de la raíz durante 15 min (Carmona et al., 2020). Posteriormente, las plantas fueron trasplantadas a un sustrato estéril compuesto por suelo y arena en una proporción 2:1, en recipientes de 16 onzas. Plantas sin aplicación de sobrenadantes sin infectar con *Fo/59* (testigo absoluto) y plantas sólo inoculadas con *Fo/59* (testigo patógeno), se utilizaron como testigos. La fertilización de las plantas se realizó conforme a los resultados del análisis de suelo (anexo 1). En el momento del

trasplante se hizo una aplicación de una fuente de fertilización compuesta (N-P-K) para evitar que los síntomas de la enfermedad fueran enmascarados con deficiencias nutricionales. El riego se suministró manualmente, manteniendo el suelo a capacidad de campo.

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 5 × 2, para un total de 10 tratamientos más dos testigos. El primer factor correspondió a los 5 sobrenadantes bacterianos con sideróforos (*SodSid*) y el segundo factor a la inoculación con y sin patógeno. Cada tratamiento estuvo conformado por 3 repeticiones, cada una con 11 plantas de tomate. Los experimentos fueron replicados tres veces en el tiempo.

Evaluación de la incidencia y severidad en plantas de tomate

Para evaluar el efecto de los sobrenadantes sobre la marchitez vascular generada por *Fo159*, se midió la Incidencia de la enfermedad, la cual se expresó como el porcentaje de plantas con síntomas de la enfermedad, en relación con el total de plantas evaluadas. Así mismo, se evaluó la severidad usando la escala descriptiva propuesta por Rongai et al. (2017), modificada en este estudio tal como se indica en la Tabla 8. Se calculó el índice de severidad (IS) y el área bajo la curva de la enfermedad (AUDPC) usando la ecuación 2 y 3 descritas por Chiang et al. (2017) y Pedroza-Sandoval & Gaxiola, (2009). La eficacia de los tratamientos se determinó mediante la ecuación 4 (Elshahawy et al., 2018). Las variables se registraron a los 5, 7, 9, 11, 14, 16, 18 y 21 días posteriores a la inoculación (dpi) de *Fo159*.

Tabla 8. Escala descriptiva de la severidad de la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (modificada de Rongai et al., 2017).

| Grado | Síntomas |
|-------|---|
| 0 | Ausencia de síntomas |
| 1 | Clorosis ligera en una o 2 hojas basales |
| 2 | Necrosis en la parte inferior a media del tallo, con o sin clorosis de las hojas basales y del tercio medio |

| | |
|---|--|
| 3 | Clorosis total de hojas basales con algunas hojas marchitas. La necrosis del tallo se extiende hacia la parte superior |
| 4 | Perdida de turgencia, epinastia y marchitez de la planta |
| 5 | Planta muerta |

Ecuación 2: Índice de severidad (IS)

$$IS \% = \frac{\sum (\text{Frecuencia de cada grado de enfermedad} \times \text{grado de enfermedad})}{(\text{No. total de observaciones}) \times (\text{nivel máximo de la enfermedad})} \times 100$$

Ecuación 3: AUDPC

$$AUDPC = \sum_i \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i)$$

Donde y es la incidencia o índice de severidad de la enfermedad y t es el tiempo transcurrido.

Ecuación 4: Eficacia de los tratamientos

$$\text{Eficacia \%} = \frac{(\text{Tratamiento testigo patógeno} - \text{Tratamiento})}{\text{Tratamiento testigo patógeno}} \times 100$$

Evaluación del contenido de clorofila en plantas de tomate

El contenido relativo de clorofila se determinó utilizando el medidor de clorofila SPAD 502 plus (Konica Minolta). Tres mediciones fueron realizadas en el haz del foliolo terminal de la hoja más joven totalmente desplegada (Hurtado et al., 2017) en los mismos tiempos de evaluación en los que se estimó el progreso de la enfermedad (7, 9, 11, 14 y 16 dpi). Se considero la medición de la variable en esta hoja, ya que es la que muestra la mayor actividad fotosintética y dado el caso que los *SodSid* generarán una clorosis férrica esta hoja manifestaría los síntomas.

Evaluación de la altura de la planta y acumulación de biomasa seca de plantas de tomate

La altura de planta fue registrada a los 16 dpi desde la base del tallo, hasta la emisión del último trifolio, usando una cinta métrica. Para medir la acumulación de biomasa seca, a los 16 dpi cuando el 50% de las plantas control inoculadas con *Fol59* se encontraban en un grado de severidad 3, se realizó un muestreo destructivo de 6 plantas por tratamiento. Cada planta completa fue pesada en una balanza analítica y llevada a una estufa de secado por 72 horas a 65 °C. Luego, se registró el peso seco.

2.3.2 Evaluación del potencial elicitor de un sobrenadante de *Acinetobacter* sp. en la respuesta de defensa de plantas de tomate infectadas con *Fol59*

Para determinar si la aplicación de sobrenadantes con sideróforos bacterianos promueve en la planta una disminución de la enfermedad asociada con la activación de vías de señalización de defensa, se evaluó la expresión diferencial de genes marcadores de la vía del ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) en plantas tratadas con *SodSid* e infectadas con *Fol59*. El análisis se realizó solo para el aislamiento de *Acinetobacter* sp. que mayor eficacia mostró en la reducción de la severidad de la enfermedad (*CBIO117*). Los tratamientos para evaluar la respuesta molecular fueron: i). Plantas tratadas con *SodSid CBIO117* e infectadas con *Fol59*; ii). Plantas únicamente tratadas con *SodSidCBIO117*; iii). Plantas únicamente infectadas con *Fol59* (testigo patógeno) y iv) plantas sin tratar con *SodSid CBIO117* e infectar con *Fol59* (testigo absoluto).

Las muestras del material vegetal de tomate fueron tomadas a partir del experimento de plantas mencionado anteriormente. Para evaluar la respuesta molecular consideramos tiempos tempranos post-infección., Se efectuaron muestreos destructivos a las 24 hpi (72 horas después de la aplicación de los tratamientos con *SodSid*) y a las 48 hpi (96 horas después de la aplicación de los tratamientos con *SodSid*). Un total de seis plantas por tratamiento, por tiempo evaluado, fueron muestreadas. Las plantas fueron removidas del

sustrato, lavadas con suficiente agua destilada y almacenadas en nitrógeno líquido a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN se llevó a cabo usando el protocolo descrito por Yockteng et al. (2013). Para ello, el tejido vegetal de seis plantas de tomate (hojas y tallos) fue macerado con nitrógeno líquido. En un tubo de 1.5 mL, 100 mg del tejido pulverizado, se mezclaron con 500 µL de Plant RNA Reagent (Invitrogen®) y se incubaron por 5 min a 4°C. Luego, la mezcla fue centrifugada durante 15 min a 13.000 rpm y el sobrenadante recuperado. Posteriormente, 100 µL de NaCl a una concentración de 5M y 300 µL de cloroformo – alcohol - isoamílico en una proporción de 24:1 se agregaron al sobrenadante, el cual fue mezclado por inversión y centrifugado por 15 min a 15000 rpm a 4°C. De este modo la fase acuosa de aproximadamente 300 µL se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 300 µL de LiCl a una concentración de 4 M junto con 100 mL de alcohol isopropílico al 99.6%. La muestra se dejó precipitar durante toda la noche a -20 °C y después se centrifugó a 13000 rpm por 45 minutos. El sobrenadante se descartó y el botón fue lavado con 1 mL de etanol al 75% v/v y centrifugado a 15000 rpm por 10 min. Finalmente, el botón se dejó secar por 1 hora a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µL de agua DEPC. La calidad del ARN se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v, la pureza (relación OD 260/280) y concentración se determinó mediante espectrofotometría en Nanodrop One (Thermo Scientific). A partir del ARN total se sintetizó el ADNc usando el kit comercial ProtoScript® II First Strand cDNA de BioLabs siguiendo el protocolo estándar del fabricante.

Análisis de expresión génica por qRT-PCR

Los niveles de expresión relativa de algunos genes que participan en la activación de defensa de la planta por vías de señalización hormonal fueron analizados por transcripción reversa y amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los genes estudiados correspondieron a *PR1*, *ERF1* y *MYC2* involucrados en la ruta de señalización del AS, AJ y ET, respectivamente. El gen Factor de elongación 1 (*EF1*) se utilizó como gen

de referencia debido a su expresión constitutiva y estable (Tabla 9). La temperatura de alineamiento de cada par de iniciadores fue estandarizada para cada gen por PCR de punto final y se determinó la eficiencia de éstos por qPCR (CFX96™ Real time PCR Bio-rad®) mediante diluciones seriadas 1:10 de ADN genómico de plantas de tomate, partiendo de una concentración inicial de 50 ng/μL, con las cuales se generó una curva estándar. El perfil de amplificación para los genes evaluados por qPCR se describe en la tabla 10.

Tabla 9. Iniciadores evaluados para la expresión diferencial de genes implicados en la ruta de señalización hormonal de las vías de defensa.

| Ruta de señalización | Primer | Secuencia (5'-3') | Referencia |
|---------------------------|----------|-------------------------|-------------------------------|
| Ácido salicílico | LePR1aqF | GTGGGATCGGATTGATATCCT | Martínez-Medina et al. (2013) |
| | LePR1aqR | CCTAAGCCACGATACCATGAA | |
| Ácido jasmónico y etileno | LeERF1qF | GAGGGGTCCTTGGTCTCTACTC | Huang et al. (2004) |
| | LeERF1qR | ACAGCAGCTGGAGATAATCCAT | |
| Ácido jasmónico | LeMYC2qF | AGCAGGAGCATCGGAAGAA | Martínez-Medina et al. (2013) |
| | LeMYC2qR | CCAAATCGGGCTGGA ACTA | |
| Gen constitutivo | LeEF1aqF | GATTGGTGGTATTGGA ACTGTC | Martínez-Medina et al. (2013) |
| | LeEF1aqR | AGCTTCGTGGTGCATCTC | |

Tabla 10. Perfil de amplificación por qPCR para cada par de iniciadores utilizados en la evaluación de expresión génica.

| Primers | Desnaturalización inicial 1x | Ciclos consecutivos de PCR 40 x | | Curva de Melting |
|----------------|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| | | Hibridación | Anillamiento y extensión | |
| LePR1 y LeMYC2 | 95 °C 3 min | 95 °C 10 s | 55 °C 60 s | 55 °C – 95 °C |
| LeEF1 y LeERF1 | 95 °C 3 min | 95 °C 10 s | 57 °C 60 s | Se incrementa 0.5 °C cada 5 s |

A partir del ADNc de cada muestra se realizaron las reacciones de qPCR utilizando el kit Iq™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad®) a un volumen final de 10 μL por reacción. La mezcla de la reacción estuvo constituida por 2 μL de ADNc, 0.4 μM de cada primer, 2X de

IQ SYBR Green Supermix y 2.2 µL de agua grado molecular. Cada reacción se realizó por duplicado para cada tiempo de expresión y tratamiento y se evaluaron dos réplicas biológicas. La expresión diferencial se analizó mediante el método de base común propuesto por Ganger et al. (2017) (ecuación 5), basado en los valores de Ct y en la eficiencia de las reacciones. Este método permite analizar los datos en una escala logarítmica e incorporar los valores de eficiencias en el cálculo, indistintamente de que estos provengan de eficiencias individuales o valores promedio.

Ecuación 5:

$$\Delta Ct = (\text{Log}_{10}E_{ref} * Ct_{ref}) - (\text{Log}_{10}E_{Goi} * Ct_{Goi})$$

En donde:

E_{ref} : Eficiencia del gen constitutivo

Ct_{ref} : Valor Ct del gen constitutivo

E_{Goi} : Eficiencia del gen de interés

Ct_{Goi} : Valor Ct del gen de interés

2.3.3 Perfil metabólico del aislamiento bacteriano con mayor actividad biocontroladora frente a *Fol*

El perfil metabólico se efectuó solo para el aislamiento de *Acinetobacter* sp. (CBIO117) que mayor eficacia mostró en la reducción de la severidad de la enfermedad mediante el sistema de microplacas Biolog Eco®. Este sistema evalúa por medio de la reducción del tetrazolium la capacidad de un microorganismo de metabolizar 31 fuentes diferentes de carbono. La solución se torna color púrpura evidenciando la capacidad del microorganismo de consumir la fuente de carbono. Con base en esto, esta prueba, se realizó con el propósito de probar una metodología rápida para la detección de sideróforos que permita identificar el mejor sustrato para la síntesis del metabolito y optimizar las condiciones de cultivo para su producción. Para ello, se tomó un cultivo de 18 horas de crecimiento en placas de AN. A continuación, la biomasa celular se lavó dos veces con solución salina al

0.85% v/v, para separar los residuos de medio de cultivo por centrifugación durante 5 min a 6000 rpm. El pellet formado se resuspendió en medio MM sin adición de fuente de carbono (glucosa) y se ajustó un inóculo a una OD de 0.1 a 600 nm (5×10^8 UFC.mL⁻¹). Las placas Biolog incluyendo el control (MM sin fuente de carbono) se inocularon con 100 µL de esta suspensión e incubaron a 28°C por 24 horas en un lector de placas multipocillo (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate). La medición de la densidad celular (OD a 600 nm) alcanzada por la bacteria en cada sustrato después de 24 horas de incubación, se realizó por triplicado de acuerdo con la conformación de la placa. Posteriormente, 100 µL de cada pocillo fueron transferidos a tubos de 1.5 mL y centrifugados por 10 min a 10.000 rpm. A continuación, se evaluó la producción de sideróforos en cada sustrato mediante la prueba colorimétrica Chrome Azurol S en placas de medio CAS-Agar (0.06 g/L CAS, 0.04 g/L FeCl₃.6H₂O, 0.07 g/L C₁₆H₃₃N(CH₃)₃Br, 30.2 g/L C₈H₁₈N₂O₆S₂, 10 mL/L HO₃SC₆H₃-2-(OH) CO₂H.2H₂O y 6 g/L de agar) (Schwyn & Neilands, 1987a) conservando el arreglo experimental de la placa Biolog. Para ello, 50 µL del sobrenadante bacteriano fueron depositados en la superficie del medio y mantenidos en oscuridad por 12 horas. La formación de un halo color naranja alrededor de la gota indicó la producción de sideróforos. El área de los halos se midió mediante el software ImageJ. El experimento se estableció tres veces en el tiempo.

2.3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el software R (versión 4.1.2). Los resultados obtenidos para cada variable evaluada fueron sometidos a un análisis descriptivo, con el objetivo de validar los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia.

El efecto de la aplicación preventiva de los diferentes *Sod/Sid* bacterianos en el desarrollo de la marchitez vascular del tomate se analizó con base en el periodo de incubación, el IS y los cálculos del AUDPC de la severidad. Para el periodo de incubación, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$), mientras que, para detectar el efecto de los tratamientos en la severidad de la enfermedad, se efectuó un análisis de modelos lineales con efectos mixtos. Se consideró como efectos fijos el tratamiento, el día de muestreo, la

réplica biológica y la interacción. Como efecto aleatorio se incluyó la unidad experimental (planta) (Schandry, 2017), debido a que la severidad de la enfermedad en cada una de las plantas que conforman un tratamiento no es la misma al inicio de la infección y a través del tiempo. Los modelos fueron comparados teniendo en cuenta el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC). Posteriormente, se realizó una prueba de comparación de medias Tukey, por medio de la cual se identificó el mejor tratamiento.

Para determinar, el efecto de los diferentes *SodSid* bacterianos sobre los parámetros vegetativos de plantas de tomate se realizó un análisis de modelos mixtos para la variable contenido relativo de clorofila como se describió anteriormente. Las variables altura de planta y biomasa seca se analizaron mediante ANOVA de dos vías; cuando se observaron diferencias se realizó una prueba de comparación de medias con un nivel de significancia del 5% (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

Los niveles de expresión relativa fueron analizados utilizando los valores Ct calculados mediante análisis univariados en cada tiempo post-inoculación (Popovic et al., 2021). Se realizaron pruebas de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 *Acinetobacter* sp. y su potencial para el control del marchitamiento vascular del tomate mediante sideróforos presentes en sobrenadantes.

La aplicación preventiva de *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* sp. redujo la incidencia de la enfermedad en plantas infectadas con *Fo159* en un 31% (*CBIO024*), 11% (*CBIO086*), 33% (*CBIO117*), 24% (*CBIO123*) y 20% (*CBIO159*) con respecto a las plantas únicamente infectadas con el patógeno, en donde se alcanzó una incidencia del 100%. El periodo medio de incubación del patógeno fue de 7.7 días (Tabla 11). Los resultados obtenidos, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el periodo de incubación de la enfermedad entre tratamientos. Las plantas infectadas que fueron previamente tratadas con *SodSid* de los aislamientos *CBIO024*, *CBIO086* y *CBIO117* retrasaron 2 días, 2.1 días y 2.3 días la aparición de síntomas con un periodo de incubación de 9.4, 9.7 y 9.9 días

respectivamente. Las plantas sin infectar tratadas con los *SodSid* bacterianos y el control sin tratar e infectar permanecieron sanas hasta el final del experimento (testigo absoluto).

Tabla 11. Efecto de la aplicación preventiva de *SodSid* de *Acinetobacter* sp. en el periodo de incubación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (*FoI59*).

| Tratamientos | Media \pm ES | DM | LMI | LMS | p-valor |
|---------------------------------|----------------|-----|-----|-----|---------|
| <i>CBIO024</i> + <i>FoI59</i> * | 9.4 \pm 0.4 | 2 | 0.6 | 3.4 | 0.00064 |
| <i>CBIO086</i> + <i>FoI59</i> * | 9.7 \pm 0.3 | 2.1 | 0.8 | 3.4 | 0.00008 |
| <i>CBIO117</i> + <i>FoI59</i> * | 9.9 \pm 0.4 | 2.3 | 0.9 | 3.7 | 0.00005 |
| <i>CBIO123</i> + <i>FoI59</i> | 8.2 \pm 0.4 | 0.5 | 0 | 1.9 | 0.86733 |
| <i>CBIO159</i> + <i>FoI59</i> | 8.7 \pm 0.3 | 1.1 | 0 | 2.4 | 0.18807 |
| <i>FoI59</i> | 7.7 \pm 0.3 | | | | |

*Tratamientos con diferencias estadísticas mediante la prueba de Tukey. Los valores corresponden a la media \pm ES de tres réplicas biológicas con un tamaño de muestra $n = 15$. DM: Diferencia de medias; LMI: Límite inferior; LMS: Límite superior.

El IS de la enfermedad en las plantas tratadas con *SodSid* fue menor en comparación con las plantas sin tratar e infectar con el patógeno. Se observó una tendencia similar en el comportamiento de la enfermedad para grupos de tratamientos, en donde las plantas tratadas con *CBIO123* y *CBIO159* mostraron un IS cercano de 70.2% y 69.7%, mientras que, los tratamientos con *CBIO024* y *CBIO117* mostraron el menor IS a los 21 dpi con 60.4% y 60% respectivamente (Figura 9A).

Los análisis para el AUDPC de la severidad mostraron una interacción significativa entre el tiempo y el tratamiento ($p < 0.05$). La varianza del modelo explicada por los efectos fijos fue de 0.906 (R^2 marginal). A los 21 dpi todos los tratamientos con *SodSid* de *Acinetobacter* sp. mostraron un efecto significativo en el control de la enfermedad respecto a las plantas únicamente infectadas con *FoI59* (Figura 9B). No obstante, el tratamiento con *SodSid* de *CBIO117* previo a la infección mostró un menor valor de AUDPC, logrando reducir hasta en un 45% la severidad de la enfermedad. En la figura 9C, se observa la evolución de los síntomas en plantas tratadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117* e infectadas con *FoI59* a los 21 dpi.

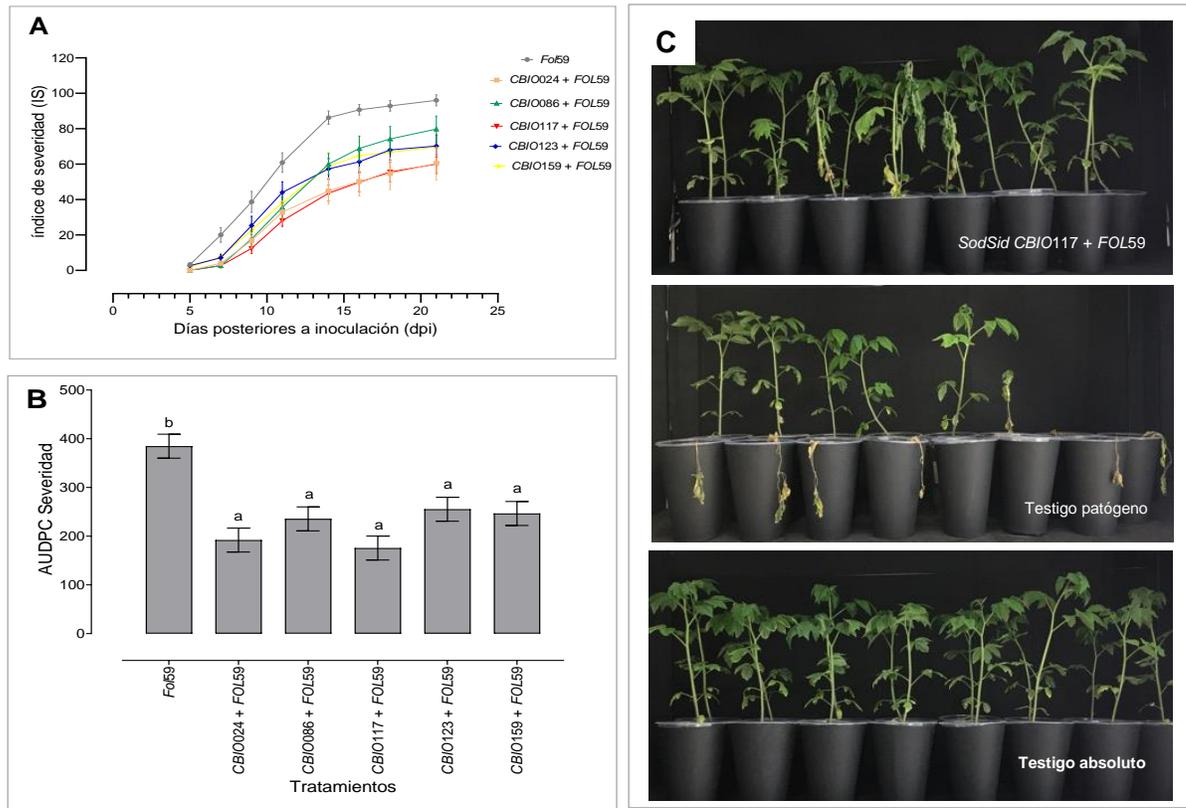


Figura 9. Efecto de la aplicación preventiva de *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* en el progreso del marchitamiento vascular del tomate. A. Índice de severidad de la enfermedad B. Eficacia de los *SodSid* de cinco aislamientos de *Acinetobacter* sp. en el AUDPC de la severidad 21 dpi. C. Aspecto visual de la enfermedad en plantas tratadas con *CBI0117* e infectadas con *Fo59*, plantas únicamente infectadas con *Fo59* y plantas sin tartar en infectar. Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas con un n=15. Medias con una letra en común significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $p < 0.05$)

Los resultados obtenidos indican que los *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* sp. pueden disminuir la incidencia y la severidad del marchitamiento vascular del tomate causado por *Fo59*. Estos resultados son consistentes con los de otras investigaciones en donde se ha demostrado la capacidad de este género bacteriano para controlar fitopatógenos asociados a esta especie vegetal. Foughalia et al. (2022), comprobaron que la cepa de *Acinetobacter* SJ19 tiene una eficacia del 72.1% para controlar la podredumbre gris del tomate ocasionada por *Botrytis cinerea*. De igual manera, estudios desarrollados por Khalil et al. (2021), reportaron que la aplicación al suelo de células de *Acinetobacter*

AcDB3 disminuyen hasta en un 40% la podredumbre del cuello y raíces causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Por su parte, Safdarpour & Khodakaramian, (2019), observaron la capacidad del aislado de *Acinetobacter* FS339 de reducir en un 50% la marchitez por *Verticillium dahliae* en plantas de tomate. Además, se ha confirmado su efecto biocontrolador por rizocompetencia frente a la marchitez bacteriana del tomate ocasionada por *Ralstonia solanacearum* (Xue et al., 2009). No obstante, a pesar de que son varios los estudios que demuestran su capacidad de biocontrol, la evaluación de sobrenadantes con alto contenido de sideróforos sólo ha sido realizada en condiciones *in vitro*. Prashant et al. (2009) y R. Sayyed & Reddy. (2011), demostraron la capacidad antifúngica de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. frente a los fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *F. oxysporum*, *Colletotrichum capsicum*, *Alternaria alternata*, *Cercospora arachichola* y *Ralstonia solanacearum*. Otros estudios informan, sobre la capacidad de *Acinetobacter* de inhibir el crecimiento de fitopatógenos por producción de sideróforos en medios de cultivo selectivos restrictivos en hierro. Maindard et al. (2014), reportaron en el medio de cultivo succinato, un 46.8% de inhibición del crecimiento del micelio de *F. oxysporum* proveniente del trigo por el aislado de *Acinetobacter* HIRFA32 y su sideróforo purificado. Rokhbakhsh-Zamin et al. (2011) comprobaron el efecto de *Acinetobacter* sp. para inhibir el crecimiento miceliar de *F. oxysporum* hasta en un 62% en medio King B deficiente en hierro.

Este estudio confirma el efecto biocontrolador de aislamientos de *Acinetobacter* sp. frente a *Fo/59*, por la aplicación exógena de sobrenadantes con sideróforos a las raíces de tomate previo a la infección.

2.4.2 Efectos de sobrenadantes de *Acinetobacter* sp. con sideróforos sobre parámetros vegetativos de plantas de tomate infectadas y no infectadas con *Fo/59*

Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación preventiva de *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* sp. tiene un efecto en las variables de crecimiento, que pueden ser modificados por la infección con *Fo/59*.

A los 16 dpi se observaron diferencias ($p < 0.05$) en la interacción inoculación y tratamiento para la variable biomasa seca. La aplicación de *SodSid* de *Acinetobacter* sp. *CBIO117* en plantas sin infectar con *Fo/59* mostraron un efecto significativo en la variable biomasa seca (0.22 g) en comparación con los otros tratamientos y el testigo absoluto (Figura 10).

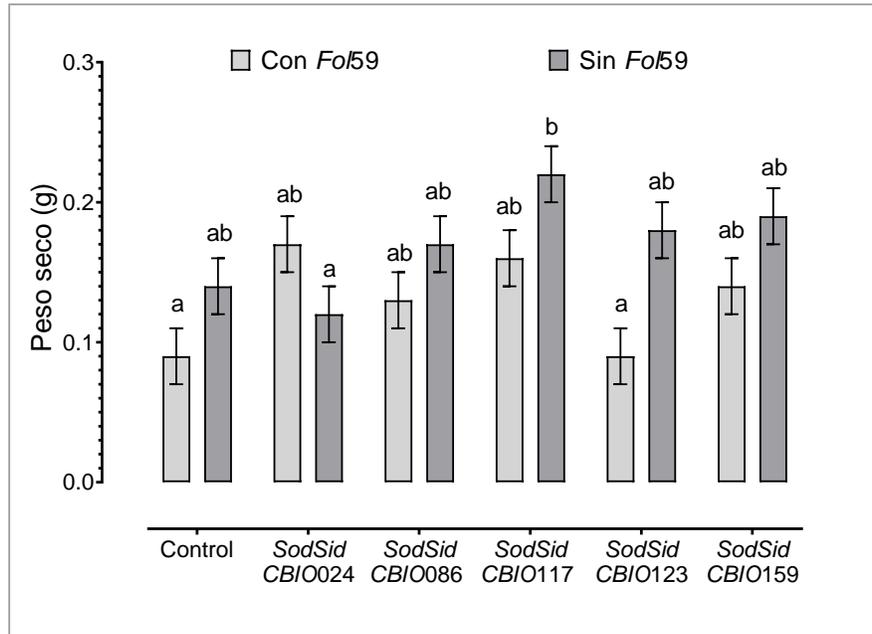


Figura 10. Gramos de biomasa seca en plantas de tomate tratadas con sobrenadantes con sideróforos con y sin infección por *Fo/59* a los 16 dpi. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=6$. Medias con una letra en común significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

La infección por *Fo/59* en las plantas de tomate, retrasó significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento de las plantas a los 16 dpi con una altura media de 18.6 cm, en comparación con las que crecieron en ausencia del patógeno, las cuales tuvieron una altura promedio de 21.5 cm (Figura 11A). En plantas sin infectar, la aplicación de *SodSid* solo generó diferencias significativas para el tratamiento con *SodSid* de *CBIO117*, con una altura media de 21.5 cm respecto al control sin tratar e infectar, que mostró una altura de 19.7 cm (Figura 11B).

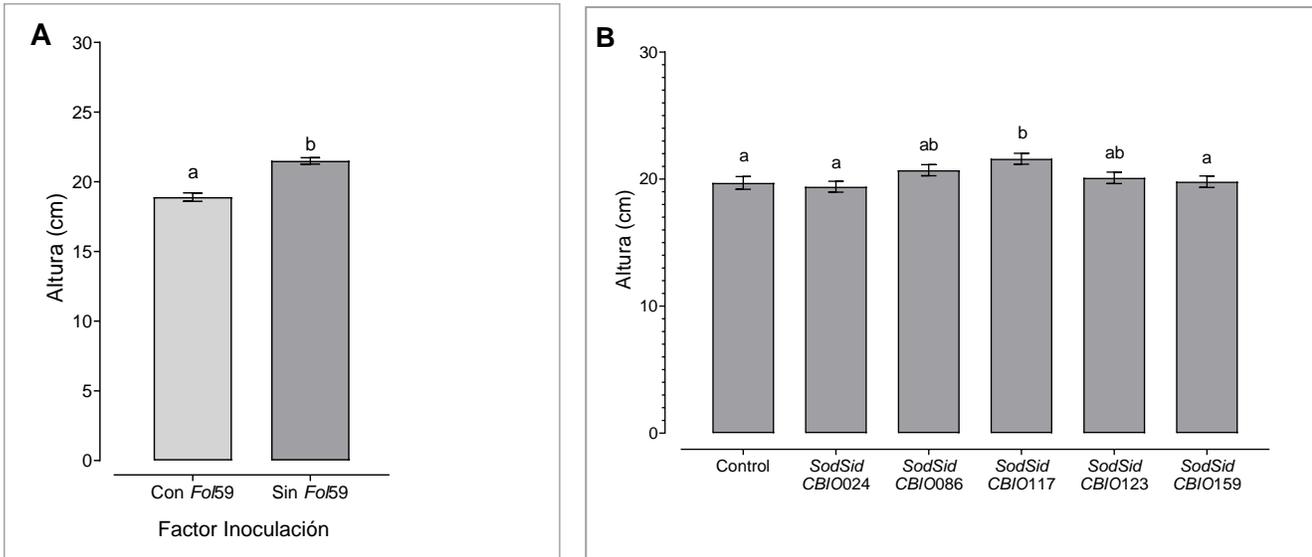


Figura 11. Altura de plantas de tomate (cm). A. Efecto de la inoculación de *Fo*59 en la altura de plantas de tomate. B. Efecto de sobrenadantes con sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en la altura de plantas de tomate sin inocular con *Fo*59. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=15$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p<0.05$).

El contenido relativo de clorofila fue evaluado periódicamente durante los primeros 16 dpi con el fin de observar el efecto de la infección por *Fo*59 en la pérdida de pigmento fotosintético que se manifiesta en la clorosis de las hojas. El análisis indicó que la infección por *Fo*59 disminuyó el contenido relativo de clorofila en las plantas de tomate con un valor de 24.5 unidades SPAD, frente a las plantas no infectadas en las que se registró un valor de 26.4 unidades SPAD (Figura 12A). Las plantas sin infectar que fueron tratadas con los *SodSid* de *Acinetobacter* sp. indistintamente del aislamiento empleado aumentaron entre 6-10% los valores SPAD en relación con el tratamiento control (Figura 12B).

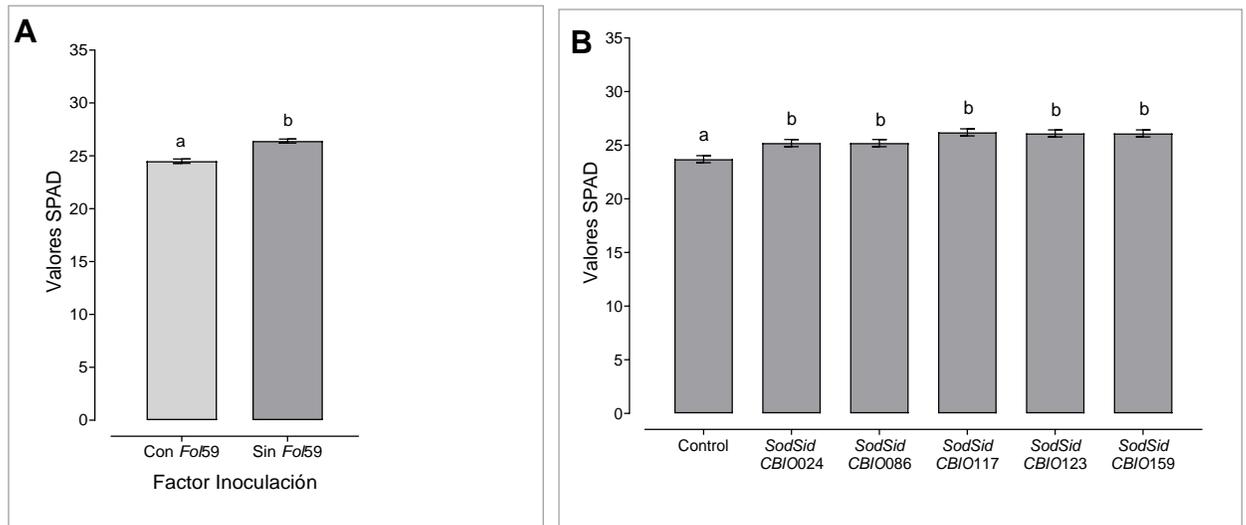


Figura 12. Valores de unidades SPAD en plantas de tomate. Efecto de la inoculación de *Fo159* en los valores de unidades SPAD de plantas de tomate. B. Efecto de sobrenadantes con sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en los valores de unidades SPAD de plantas sin infectar. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de tres réplicas biológicas con un $n=15$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p<0.05$).

Los resultados obtenidos demuestran que los parámetros de crecimiento altura de la planta, contenido de biomasa y contenido relativo de clorofila en plantas tratadas con *SodSid* disminuyen por efecto de la colonización de los tejidos vasculares por *Fo159*, mientras que las plantas sin infectar tratadas con *SodSid* muestran una leve tendencia al aumento en estos parámetros de crecimiento. Ejemplo de ello es el tratamiento con *SodSid* de *Acinetobacter* CBI0117. Se ha demostrado que el estrés biótico generado por *Fusarium* afecta los procesos fisiológicos de las plantas, alterando su crecimiento y desarrollo por el taponamiento de los vasos conductores y la secreción de toxinas en el xilema que obstruyen el flujo de agua y nutrientes (Constantin et al., 2019; P. Singh et al., 2020). No obstante, el efecto de algunas bacterias productoras de sideróforos para estimular el crecimiento se ha asociado con la entrega de hierro soluble a las plantas y la producción de fitohormonas (Radzki et al., 2013). La capacidad de sobrenadantes de cultivos bacterianos con sideróforos para promover el crecimiento, se ha comprobado en la bacteria *Streptomyces* sp. en donde se observó que, la aplicación de filtrados con sideróforos a un suelo con alto contenido de metales pesados, aumentó el peso seco y la longitud de brotes de plantas de caupí (Dimkpa et al., 2009).

El papel de *Acinetobacter* como microorganismo promotor de crecimiento vegetal se ha descrito en varias especies cultivadas (Indiragandhi et al., 2008; Gulati et al., 2009; Shi et al., 2011). Por ejemplo, en remolacha azucarera, el aislado de *Acinetobacter* 3-1 aumentó la altura de la planta y el peso seco en un 19% y 69%, respectivamente, en comparación con los controles no tratados (Shi et al., 2011). En *Lactuca sativa* bajo condiciones de hidroponía, *Acinetobacter* P-23 aumentó el contenido de clorofila (Suzuki et al., 2014) y en plántulas de *Brassica napus*, *Acinetobacter* S44 promovió el crecimiento aumentando la longitud de las raíces en un 92%, de los brotes en un 31% y el peso fresco en un 41% (Fang et al., 2016). En plantas de tomate, estudios desarrollados por Foughalia et al. (2022), demuestran el efecto promotor del crecimiento conferido por *Acinetobacter* sp. cuando es aplicado a la semilla y al suelo con un incremento en la longitud de tallos, raíces, peso fresco y contenido de clorofila. Por su parte, Kwon & Song, (2014) asociaron la capacidad de la cepa de *Acinetobacter* SW5 de estimular el crecimiento de plantas de tomate de 3 meses de edad. Este resultado se asoció a la presencia de altas concentraciones de ácido indol acético (AIA) en los cultivos celulares con los que fueron tratadas las plantas.

Dado los resultados obtenidos, es de importancia mencionar que la habilidad de aislamientos de *Acinetobacter* sp. para estimular el crecimiento de las plantas, sólo se ha evaluado bajo condiciones que involucran una interacción entre la bacteria, el patógeno y la planta, pero no se han descrito estudios que confirmen la capacidad de extractos bacterianos con sideróforos libres de células para promover el crecimiento. Por lo tanto, se considera relevante que se realicen estudios que permitan evaluar la capacidad de estos aislamientos para promover el crecimiento vegetal mediante este mecanismo de biocontrol.

2.4.3 Expresión relativa de los genes *PR1*, *ERF1* y *MYC2* en plantas de tomate tratadas con *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117* e infectadas con *FoI59*

Con el propósito de determinar si la reducción del marchitamiento vascular generado por *FoI59* estaba asociado con la inducción de genes de defensa de la planta por la aplicación de *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117*, se evaluó la expresión relativa del gen *PR1* y de los genes que codifican para los factores de transcripción *ERF1* y *MYC2* a las 24 y 48 hpi. Estos tiempos corresponden a las 72 y 96 horas posteriores a la elicitación de las plantas con *SodSid* de *CBIO117* antes de ser inoculadas con *FoI59*.

Con respecto a la expresión del gen *PR1*, a las 24 hpi no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, a las 48 hpi, todos los tratamientos mostraron una variación significativa ($p < 0.05$) en los niveles de expresión de este gen, con relación al control no tratado e infectado (Figura 13).

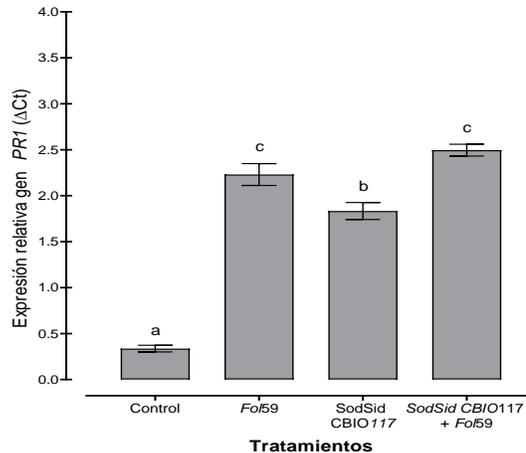


Figura 13. Expresión relativa del gen *PR1* en plantas de tomate a las 48 hpi de *FoI59* en plantas de tomate elicidadas con sideróforos presentes en sobrenadantes de *Acinetobacter CBIO117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p < 0.05$).

Los resultados obtenidos indican que tanto el estrés biótico generado por *FoI59* como la elicitación de las plantas con *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117* aumentaron los niveles de expresión del gen *PR1*. (Figura 13). EL gen *PR1* generalmente se expresa en etapas

tempranas de la infección, ya sea por el reconocimiento de PAMPs (PTI) del patógeno o de sus efectores (ETI), sin embargo, estamos evaluando la expresión de los genes en un hospedante susceptible en donde no habría reconocimiento de efectores. Por otro lado, *PR1* también es un marcador de resistencia sistémica asociado con la vía del ácido Salicílico, y la expresión de este gen previa estimulación de un inductor (sobrenadantes con sideróforos) se evalúa en tiempos cercanos a la infección con el patógeno. La expresión de *PR1* con agentes quelantes de hierro en plantas no sometidas a un estrés biótico ha sido reportada en *Arabidopsis thaliana* con el quelante EDDHA (ácido N,N'-etilendiamino-bis (2-hidroxifenil) acético) 24 horas posteriores al tratamiento, demostrando la capacidad de estas moléculas para inducir la expresión de genes relacionados con defensa (Aznar et al., 2014). No obstante, estudios realizados por Betoudji, et al. (2020) demuestran que a las 32 horas posteriores a la elicitación, *PR1* vio incrementada su expresión cuando las raíces de *A. thaliana* fueron tratadas previamente con el sideróforo e infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, pero no cuando las raíces se trataron con el análogo del sideróforo fimsbactina de *Acinetobacter* sp. Esta respuesta fue asociada con un efecto de inducción de defensa de tipo "priming". En nuestro caso, las plantas elicidadas con *SodSid* e infectadas con *Fo159* presentaron niveles de expresión de *PR1* similares a los producidos por *Fo159*, indicando que este gen se activa tanto por acción de los *SodSid* como por el reconocimiento de posibles patrones moleculares asociados al patógeno, favoreciendo una condición de defensa de tipo PTI. Aunque *PR1* también puede ser inducido por un tipo de defensa ETI, en este estudio no es posible que haya ocurrido el reconocimiento de proteínas efectoras ya que la infección del patógeno se realizó en un hospedante susceptible.

Por otro lado, se ha reportado que la expresión de *PR1* en plantas elicidadas con sideróforos está relacionada con la homeostasis del hierro. Herlihy et al. (2020), señalan que a activación de la respuesta inmune por patógenos y la deficiencia en hierro, desencadenan respuestas de defensa reguladas por las mismas vías de señalización hormonal. Por su parte, Aznar et al. (2014) evidenciaron que plantas de *A. thaliana* tratadas con el sideróforo defirroxamina y que expresan el gen *PR1*, activan genes de captación de hierro como *IRT1*. Por lo tanto, sería interesante incluir en estudios posteriores la

evaluación de la expresión de este gen, para confirmar si hubo un estrés de deficiencia en hierro y relacionarlo con la activación de defensa.

Los niveles de expresión del factor de transcripción *ERF1* demuestran que en los dos tiempos evaluados (24 y 48 hpi), el estrés biótico causado por *Fo59* y el tratamiento preventivo de las raíces de tomate con *SodSid* de *Acinetobacter CBIO117*, también aumentaron significativamente la expresión de *ERF1*, con respecto al control no tratado e infectado (Figura 14). Como, no se observaron diferencias significativas entre las plantas infectadas con *Fo59*, las plantas elicitadas con *SodSid* de *CBIO117*, y las plantas elicitadas e infectadas, los resultados indican que tanto el patógeno, como los *SodSid* inducen de manera independiente la expresión del gen. Por lo tanto, la expresión de *ERF1* previamente estimulada con *SodSid* puede no verse modificada tras la inoculación con el patógeno bajo los tiempos analizados. Sin embargo, es posible que los niveles de expresión de este gen puedan verse modificados en otros tiempos de medición post-infección del patógeno.

En estudios desarrollados por Hsiao et al. (2017), se demostró que en plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan la proteína defensina AtPDF1.1, involucrada en la quelación de hierro, hubo un aumento en la expresión de los genes asociados con la homeostasis de este elemento al ser infectadas con *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Se comprobó, la inducción de la respuesta de defensa en la planta por la vía de señalización del ET, con una mayor expresión del gen *ERF1*. Los resultados obtenidos en este trabajo no logran demostrar una activación diferencial de *ERF1* en plantas elicitadas con *SodSid* de *CBIO117* e infectadas con *Fo59*, sin embargo, al igual que para el caso de la expresión de *PR1*, la inducción de *ERF1* en este tratamiento pudo verse enmascarada por la inducción que genera la inoculación con únicamente *SodSid* de *CBIO117*. Con el propósito de descartar la elicitación de la respuesta de defensa en la planta por la vía de señalización del ET, se requiere la evaluación de la expresión de otros genes implicados en esta vía como *EIN3* y *PDF 1.2*.

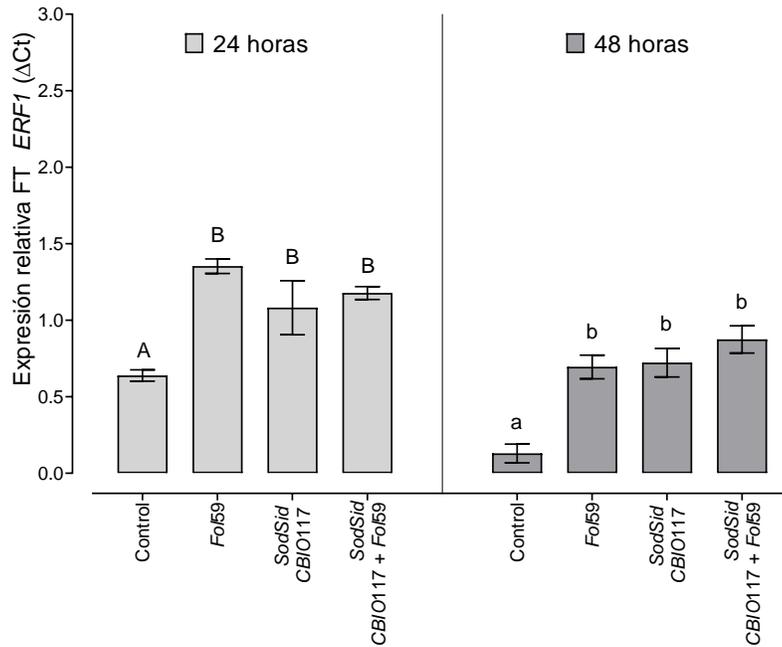


Figura 14. Expresión relativa del gen *ERF1* 24 y 48 hpi de *Fo/59* en plantas de tomate elicitadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *C/BI0117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p<0.05$). Letras mayúsculas y minúsculas corresponden a análisis de varianza de una vía independientes

El gen *ERF1* es un factor de transcripción que puede ser inducido tanto por la vía de señalización del Etileno o por la del Jasmonato. Por lo tanto, evaluar la expresión de los genes precursores de *ERF1* en la cascada de señalización hormonal, nos permitiría descifrar cual vía hormonal indujo su expresión. El gen *EIN3* es una proteína nuclear que en presencia de Etileno activa al factor de transcripción *ERF1* (evaluado en este trabajo) que a su vez conduce a la transcripción de los genes de defensa dependientes de esta hormona. Por lo tanto, indicaría que la activación de la defensa es por la vía del Etileno y no por la del Jasmonato.

Por otra parte, el gen *MYC2* (evaluado en este trabajo) es un factor de transcripción dependiente exclusivamente de la vía del Jasmonato, vía en donde *ERF1* también puede ser activado. Sin embargo, ambos factores de transcripción no se expresan de manera simultánea, son antagónicos. Cuando en la planta se activa la vía dependiente del

Jasmonato y el Etileno el factor de transcripción *ERF1* activa la transcripción de genes de defensa, pero cuando se activa solamente la vía de defensa dependiente de Jasmónico el único factor de transcripción que se activa es *MYC2*.

MYC2 induce la transcripción de genes como *VSP2* y *ERF1* induce *PDF1.2*. De allí que hay que evaluar genes que están corriente arriba y corriente abajo de la cascada transcripcional para descifrar la vía de activación hormonal.

En este estudio los niveles de expresión del gen *ERF1* aumentaron en plantas elicidadas con *SodSid* de *CBIO117* con o sin *FoI59*. Por lo tanto, lo que esperaríamos al incluir en la evaluación los genes *EIN3* y *PDF1.2* es que el gen *EIN3* se reprima, esto indicaría que este gen no es el precursor de la expresión del gen *ERF1* y que posiblemente la activación de *ERF1* este siendo regulada por la vía de señalización del ácido jasmónico.

En la Figura 15 se observó que la expresión del factor de transcripción *MYC2* no fue inducida por la aplicación en la planta de los *SodSid* de *CBIO117*. El mayor nivel de expresión se presentó a las 24 hpi en plantas únicamente infectadas con *FoI59*, seguido de las plantas previamente tratadas con *SodSid* de *CBIO117* e inoculadas con el patógeno. Sin embargo, a las 48 hpi hubo una disminución en la expresión del gen en las plantas infectadas con *FoI59*, mientras que en las plantas previamente estimuladas con los *SodSid* e infectadas con el patógeno se mantuvo la expresión del gen.

La ausencia de expresión de *MYC2* por efecto de los *SodSid* puede ser explicada por la actividad de este gen en la homeostasis del hierro. Se ha confirmado que plantas en condiciones de deficiencia de hierro activan el factor de transcripción FIT (Fer-like iron deficiency-induced transcription factor) el cual es requerido para la inducción de genes involucrados en la captación de hierro. No obstante, la cantidad de hierro que es captado en la planta debe ser regulado para no generar toxicidad celular y en esa homeostasis el gen *MYC2* participa como regulador negativo induciendo la expresión de proteínas bHLH (basic helix-loop-helix) que degradan FIT (Wu & Ling, 2019) (Figura 16).

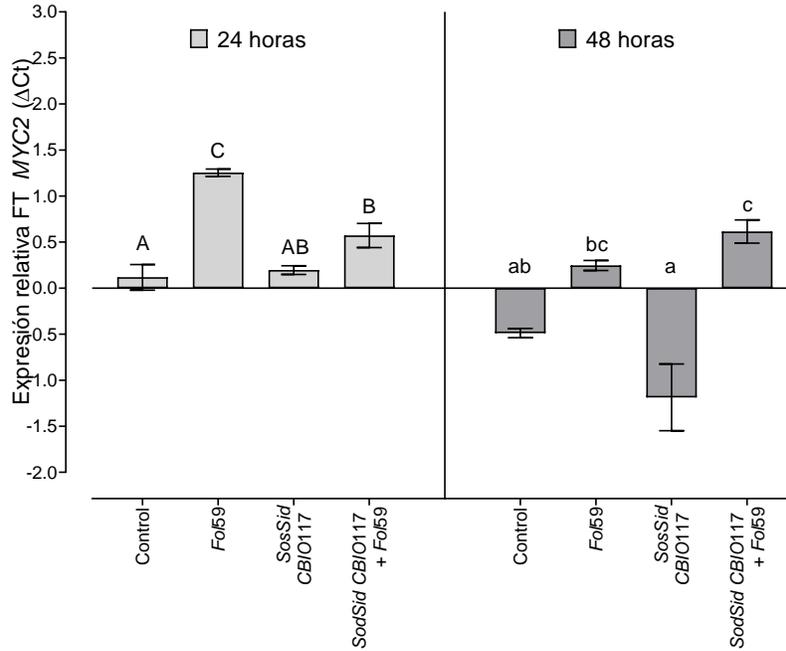


Figura 15. Expresión relativa de del gen *MYC2* 24 y 48 hpi de *Fo59* en plantas de tomate elicitadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117*. Los valores corresponden a la media (\pm ES) de dos réplicas biológicas con un $n=2$. Medias con una letra en común no difieren estadísticamente (Prueba Tukey, $p<0.05$). Letras mayúsculas y minúsculas corresponden a análisis de varianza de una vía independientes.

Por lo tanto, es posible que al no evidenciar la expresión de *MYC2* en las plantas tratadas con los *SodSid* de *CBIO117*, estas se encuentren en el proceso de captación de hierro disponible en el suelo (374.98 mg/kg) y, el factor de transcripción FIT no requiere ser degradado. No obstante, al infectar las plantas con *Fo59* la expresión de *MYC2* aumentó generando en la planta la activación de vías de defensa reguladas por el AJ y posiblemente una represión de la captación de hierro por degradación de FIT, condiciones que favorecen a la planta para generar una respuesta de defensa contra un patógeno vascular. Esta hipótesis debe ser confirmada mediante la medición de la expresión de genes de regulación de captación de hierro en plantas estimuladas con sobrenadantes con sideróforos bacterianos y de otros genes marcadores de la vía de ácido jasmónico.

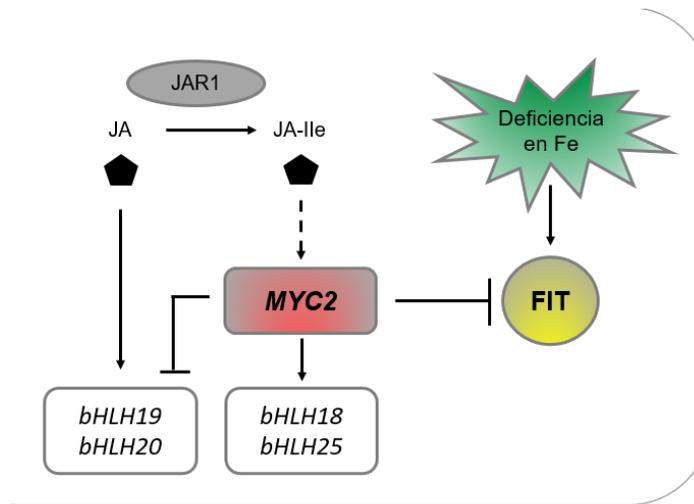


Figura 16. Participación de *MYC2* (The basic helix loop helix transcription factor) en la regulación de captación de hierro por FIT mediada por ácido jasmónico (AJ) en *Arabidopsis*. En presencia de AJ, *MYC2* reprime la transcripción de FIT. La expresión de los genes *bHLH18* y *bHLH25* (Controlados por *MYC2*) y *bHLH19* y *bHLH20* (Controlados por AJ) son regulados positivamente. Tomado y adaptado de Cui et al. (2018).

2.4.4 Perfil metabólico del aislamiento de *Acinetobacter CBIO117*

El cultivo bacteriano de *Acinetobacter CBIO117* con el sistema Biolog Eco®, permitió caracterizar la respuesta metabólica de la bacteria en las distintas fuentes de carbono y su relación con la actividad quelante por producción de sideróforos en agar CAS (formación de halo amarillo-naranja). Para poder comparar la producción de sideróforos, el control usado en este estudio fue la misma suspensión bacteriana en medio MM evaluada en las 31 fuentes. En la tabla 12, se describe la densidad celular (OD 600 nm) alcanzada por la bacteria después de 24 horas de incubación y la producción de sideróforos en cada sustrato.

Tabla 12. Producción de sideróforos en relación con la fuente de carbono mediante el cultivo de del aislamiento *CBO117* de *Acinetobacter* sp. en el sistema Biolog Eco®.

| Tipo de fuente | Fuente de carbono | OD 600 nm | Sideróforos halo (mm) |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Control | Agua | 1.87 ± 0.14 ^{bceg} | 1.07 ± 0.2 ^{bcd} |
| Amidas/aminas | Feniletilamina | 1.41 ± 0.26 ^{bc} | 0.93 ± 0.25 ^{bcd} |
| Amidas/aminas | Putrescina | 1.76 ± 0.41 ^{bcdf} | *2.80 ± 0.52 ^{ij} |
| Aminoácidos | L-Arginina | 2.04 ± 0.05 ^{dhei} | 1.04 ± 0.17 ^{bcd} |
| Aminoácidos | L-Asparagina | 2.52 ± 0.09 ^{ij} | *2.86 ± 0.97 ^{ij} |
| Aminoácidos | L-Fenilalanina | 2.60 ± 0.06 ^j | *3.32 ± 0.92 ^j |
| Aminoácidos | L-Serina | 2.35 ± 0.3 ^{ghj} | *1.41 ± 0.58 ^{cef} |
| Aminoácidos | L-Treonina | 1.36 ± 0.43 ^b | 0 ± 0 ^a |
| Aminoácidos | L-Ácido glicilo glutámico | 1.55 ± 0.11 ^{be} | 0.90 ± 0.18 ^{bcd} |
| Ácido carboxílico | Ester metílico del ácido pirúvico | 2.44 ± 0.14 ^{hj} | *2.13 ± 0.83 ^{fghi} |
| Ácido carboxílico | D- Ácido Galacturónico | 1.75 ± 0.19 ^{bcdf} | *0.78 ± 0.09 ^{bc} |
| Ácido carboxílico | γ-Ácido hidroxibutírico | 2.10 ± 0.63 ^{efhj} | *1.19 ± 0.55 ^{bce} |
| Ácido carboxílico | D-Ácido glucosaminico | 1.65 ± 0.21 ^{be} | *1.25 ± 0.51 ^{bce} |
| Ácido carboxílico | Ácido Itacónico | 1.58 ± 0.17 ^{be} | *0.79 ± 0.22 ^{bc} |
| Ácido carboxílico | α-Ácido Cetobutírico | 1.41 ± 0.42 ^{bc} | *0.58 ± 0.26 ^{ab} |
| Ácido carboxílico | D-Ácido Málico | 1.60 ± 0.32 ^{be} | 0 ± 0 ^a |
| Carbohidratos | β-Metill -D-Glucósido | 1.84 ± 0.1 ^{bceg} | *0.73 ± 0.12 ^{ac} |
| Carbohidratos | D- Ácido Galactónico γ-Lactona | 1.66 ± 0.28 ^{be} | *0.69 ± 0.15 ^{ac} |
| Carbohidratos | D-Xilosa | 1.63 ± 0.25 ^{be} | 0.93 ± 0.19 ^{bcd} |
| Carbohidratos | i-Eritritol | 1.62 ± 0.27 ^{be} | 0.88 ± 0.2 ^{bcd} |
| Carbohidratos | D-Manitol | 2.25 ± 0.49 ^{fghj} | 1.10 ± 0.3 ^{bcd} |
| Carbohidratos | N-Acetil -D-Glucosamina | 1.70 ± 0.13 ^{bcdf} | 1.03 ± 0.56 ^{bcd} |
| Carbohidratos | D-Ceobiosa | 1.43 ± 0.36 ^{bc} | 0.99 ± 0.27 ^{bcd} |
| Carbohidratos | Glucosa-1- Fosfato | 1.50 ± 0.33 ^{bd} | 1.01 ± 0.46 ^{bcd} |
| Carbohidratos | α-D-Lactosa | 1.98 ± 0.6 ^{dghi} | 1.00 ± 0.26 ^{bcd} |
| Carbohidratos | D,L-α-Fosfato de Glicerina | 1.50 ± 0.28 ^{bd} | 1.01 ± 0.17 ^{bcd} |
| Compuestos fenólicos | 2-Ácido hidroxibenzoico | 0.28 ± 0.52 ^a | 0 ± 0 ^a |

| | | | |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Compuestos fenólicos | 4-Ácido hidroxibenzoico | 1.94 ± 0.52 ^{cdeh} | *1.91 ± 0.74 ^{eh} |
| Polímeros | Tween 40 | 2.05 ± 0.13 ^{efhi} | *2.32 ± 0.52 ^{ghi} |
| Polímeros | Tween 80 | 2.37 ± 0.2 ^{ghj} | *2.59 ± 0.34 ^{hj} |
| Polímeros | α-Ciclodextrina | 1.57 ± 0.19 ^{be} | *1.59 ± 0.25 ^{deg} |
| Polímeros | Glucógeno | 1.44 ± 0.21 ^{bc} | 1.05 ± 0.18 ^{bcd} |

Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas ± ES con un n=3. Medias con una letra en común significa que no existen diferencias significativas (Prueba Tukey p<0.05). * Diferencias significativas en la síntesis de sideróforos respecto al control

De acuerdo con los resultados obtenidos el aislamiento *CBIO117* puede aumentar su densidad celular en presencia de bajas concentraciones de sales, sulfuros y fosfatos (componentes del medio de cultivo) sin metabolizar una fuente de carbono (control MM sin fuente de carbono). Se observaron diferencias significativas en la producción de sideróforos en 16 sustratos, de los cuales aquellos del grupo de aminoácidos (L-Fenilalanina y L-Asparagina); amidas/aminas (putrescina); polímeros (tween 80 y tween 40); y ácido carboxílico (éster metílico del ácido pirúvico) mostraron la mayor producción del metabolito produciendo en el CAS-agar un halo de 3.32 ± 0.9 mm; 2.86 ± 0.9 mm; 2.80 ± 0.5 mm; 2.59 ± 0.3 mm; 2.32 ± 0.5 mm; 2.13 ± 0.8 mm, respectivamente. Aunque, *CBIO117* metabolizó los sustratos L-treonina y D- ácido málico, alcanzado una densidad celular de 1.36 ± 0.4 y 1.6 ± 0.3 la producción de sideróforos en estos dos sustratos fue ineficaz. Por el contrario, en el género bacteriano *Pseudomonas* se observó que la mayor producción de sideróforos de las especies *P. fluorescens* y *P. putida* se obtuvo cuando se usó como fuente de carbono el aminoácido treonina con un índice de 88.8% y 88.6% respectivamente.

Además, se observó que *CBIO117* suprime su crecimiento en presencia del compuesto fenólico ácido 2- hidroxibenzoico razón por la cual no se observa producción de sideróforos. Resultados similares fueron hallados por Shin et al. (2018), quienes reportan que la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 no es capaz de utilizar el compuesto fenólico ácido 2-hidroxibenzoico como fuente de carbono para su crecimiento. Por el contrario, demostraron la capacidad de *A. calcoaceticus* 11 de utilizar como fuente de carbono una mezcla fenólica de PHBA, ácido 2-hidroxibenzoico y ácido 3-hidroxibenzoico (Prathibha & Sumathi, 2008).

De manera general, no hubo una relación de la densidad celular alcanzada en cada fuente de carbono, con el tamaño de halo observado en las placas de agar CAS por los sideróforos producidos con cada fuente de carbono; es decir una mayor OD no significó un mayor tamaño de halo de producción. A manera de ejemplo, en la figura 17 se muestra la fotografía de algunos de los halos de color amarillo- naranja observados con las seis fuentes de carbono donde se presentó la mayor producción de sideróforos (L-Fenilalanina, L-Asparagina, putrescina, tween 80, tween 40 y ester metílico del ácido pirúvico); y la fotografía del halo observado cuando hubo ausencia de la producción de sideróforos (L-treonina y D-ácido málico).

Numerosos estudios señalan la importancia de los factores ambientales en la producción de sideróforos. Además de la concentración de hierro, la fuente de carbono se encuentra entre los factores de mayor importancia que regulan su producción. Santos et al. (2014), evaluaron el efecto del glicerol y de algunos mono- y disacáridos en la producción de sideróforos de *Bacillus megaterium*. En este microorganismo, la producción de quelantes de hierro fue tres veces mayor en presencia de glicerol, en comparación con los sideróforos obtenidos con manosa. En la cepa CHA0 de *P. fluorescens*. Duffy & Défago, (1999), evidenciaron que la producción de pioquelina y de su precursor ácido salicílico se ve inducida por diferentes fuentes de carbono. Mientras que la producción de pioquelina incrementó en presencia de fructosa, manitol y glucosa, la producción de ácido salicílico se vio favorecida por el glicerol y la glucosa. Desde nuestro conocimiento, no existen estudios similares que evidencien el efecto de las fuentes de carbono en la producción de sideróforos en aislamientos de *Acinetobacter*. Los resultados de este estudio se utilizarán como base para el desarrollo del medio de cultivo en el que *CBIO117* será crecido para la continuación de su uso en estudios de bioprospección. Por otra parte, estos resultados demuestran la versatilidad de microorganismos de este género para colonizar diversos ambientes como los hospitalarios y agropecuarios (Rada Cuentas, 2016).

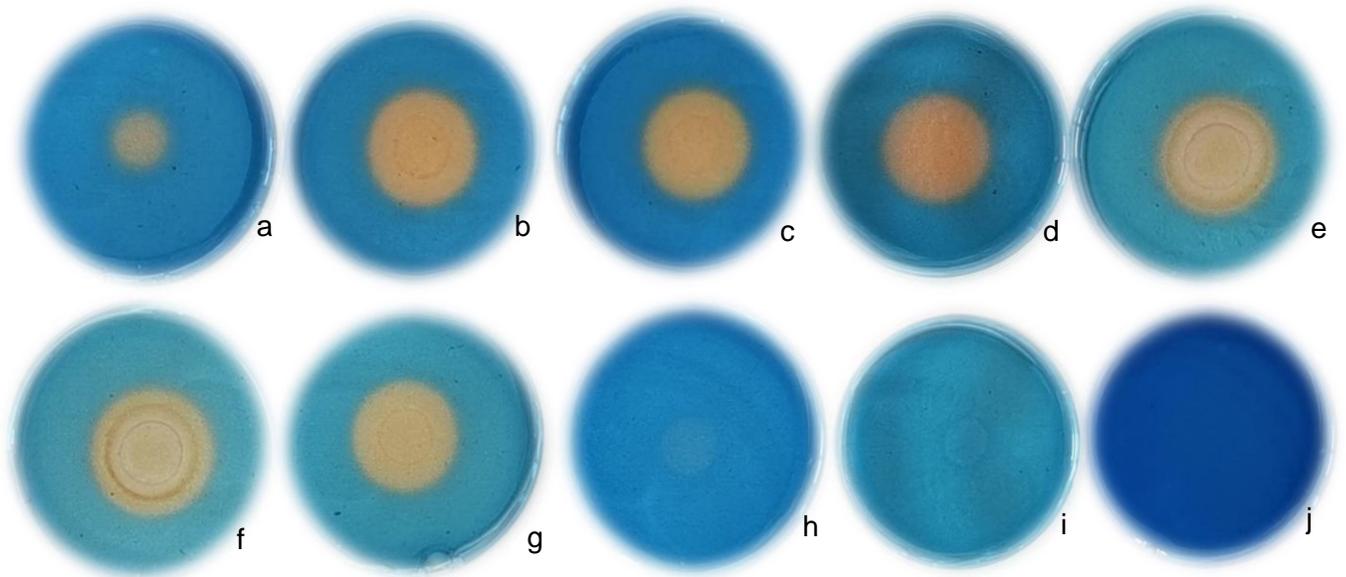


Figura 17. Producción de sideróforos en agar CAS del cultivo de *Acinetobacter CBIO117* en el sistema Biolog Eco®. a). MM sin fuente de carbono (control) b). L-Fenilalanina, c). L-Asparagina d). putrescina e). tween 80 f). tween 40 g). ester metílico del ácido pirúvico h). L-treonina i). D-ácido málico j). control negativo (agar sin adición de cultivo celular).

Conclusiones

- En este estudio se demostró que la aplicación preventiva de sobrenadantes con sideróforos de los aislamientos de *Acinetobacter* sp. *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159* reducen la incidencia y severidad del marchitamiento vascular de tomate causado por *Fo159*.
- Se confirmó que la aplicación de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. no generan un efecto fitotóxico en las plantas.
- Se determinó que las fuentes de carbono L-Fenilalanina, L-Asparagina, putrescina, tween 80, tween 40 y ester metílico del ácido pirúvico son los mejores sustratos para inducir una alta producción de sideróforos de *Acinetobacter* *CBIO117*.
- El tratamiento de las raíces con sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. *CBIO117* induce la expresión de los genes *PR1* y *ERF1* relacionados con la vía de señalización hormonal del ácido salicílico y etileno.
- La aplicación preventiva de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. *CBIO117* en plantas infectadas con *Fo159* aumenta la expresión del gen *MYC2* involucrado en la defensa de la planta por la vía del ácido jasmónico.

3. Discusión general

El control de fitopatógenos mediante el uso de inductores biológicos que activen la respuesta de defensa de las plantas reviste importancia como alternativa ecológica para el manejo de enfermedades (Nishad et al., 2020). En este sentido, se ha demostrado que los sideróforos producidos por los microorganismos pueden ejercer un efecto biocontrolador al desencadenar respuestas de defensa de las plantas o actuar como compuestos antimicrobianos (Karthika et al., 2020; Verbon et al., 2017). Considerando, que el cultivo de tomate es uno de los sistemas productivos del país, que más aplicaciones de agroquímicos registra para el control de enfermedades, este estudio se enfocó en la búsqueda y evaluación de aislamientos bacterianos altamente productores de sideróforos con potencial para el control del marchitamiento vascular del tomate causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*,

En primer lugar, mediante el tamizaje por producción de sideróforos se identificaron 15 aislamientos bacterianos con alta capacidad de sintetizar esta molécula en cultivos deficientes en hierro. Entre los géneros microbianos identificados se encontraron *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. El género *Acinetobacter* sp. con un grupo mayoritario de aislamientos, fue el que mayor eficiencia presentó en la síntesis de sideróforos. Se ha descrito que la adquisición de hierro dependiente de sideróforos por parte de esta bacteria es la estrategia más eficiente para asegurar su supervivencia y patogenicidad (Tiwari et al., 2019). Esta razón, podría explicar por qué *Acinetobacter* sp. fue el género más predominante y eficiente para producir quelantes férricos bajo la carencia del micronutriente. Otra razón puede ser la capacidad de *Acinetobacter* sp. de codificar múltiples sideróforos con redundancia funcional, pero diversidad estructural. Se desconoce el papel de la redundancia de estas moléculas en

ambientes agrícolas, sin embargo, en seres humanos se ha señalado que este atributo es usado como mecanismo para evadir la respuesta inmunitaria del hospedero (Holden & Bachman, 2015; Sheldon & Skaar, 2020). Aunque en este estudio, no se purificaron ni identificaron los sideróforos presentes en los sobrenadantes, sería interesante realizar estudios que permitan aclarar si su papel en plantas es similar al observado en humanos y dilucidar si la capacidad de este género de secretar diversos sideróforos varía de acuerdo con el nicho ecológico de donde procede el aislamiento.

Acinetobacter sp., es un género ubicuo en la naturaleza que puede hallarse colonizando entornos ambientales como plantas, animales y seres humanos (Al Atrouni et al., 2016). A pesar de que algunas especies de *Acinetobacter* sp. (*A. calcoaceticus* y *A. johnsonii*) se han considerado de importancia clínica por su potencial infectivo y multiresistencia a antibióticos, otras solo se han encontrado en entornos ambientales (*A. oleivorans* en cultivos de arroz y *A. lactucae* en cultivos de lechuga) (Kang et al., 2011; Rooney et al., 2016) generando la promoción del crecimiento vegetal y el antagonismo de algunos microorganismos fitopatógenos (Heo et al., 2022), atributo de *Acinetobacter* que fue comprobado en el desarrollo de esta investigación.

Los experimentos en planta para evaluar el potencial biocontrolador de sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* sp. en el control del marchitamiento vascular causado por *Fol*, demostraron que la aplicación de los *SodSid* de *Acinetobacter* CBIO024, CBIO086, CBIO117, CBIO123 y CBIO159 previo a la infección por *Fol59* reducen la incidencia y severidad de la enfermedad, siendo mayor el efecto de estos quelantes férricos en las plantas tratadas con los *SodSid* de *Acinetobacter* CBIO117. La actividad biocontroladora de aislamientos de *Acinetobacter* sp. ha sido confirmada en condiciones *in vitro* e *in vivo* en plantas de tomate frente a los patógenos *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinerea*, *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Xue et al., 2009; Safdarpour & Khodakaramian, 2019; Foughalia et al., 2022; Khalil et al., 2021). Su eficacia en el biocontrol se ha atribuido a la producción de compuestos volátiles, quitinasas, proteasas, ácido indol acético, ácido giberélico y sideróforos. En este estudio el efecto positivo de los *SodSid* de aislamientos de *Acinetobacter* sp. en el control de *Fo59* no pudo atribuirse a un mecanismo de competencia por nutrientes. Los *SodSid* fueron aplicados en un único momento, en plantas en condiciones de semillero y en una fase previa a la infección con *Fo59*, la cual al haberse realizado por el método de inmersión de raíces en esporas

infectivas del patógeno no permitió que se presentará un evento de competencia por el micronutriente. Por otra parte, en experimentos en donde se evaluó la actividad antagónica *in vitro* de estos aislamientos por enfrentamiento dual con *Fol* o por medio de la inoculación de los sobrenadantes, no se observó inhibición del crecimiento del patógeno (datos no mostrados). Dado estos resultados, se consideró que el posible mecanismo por el cual los *SodSid* de *Acinetobacter* participan en el control de la enfermedad está relacionado con un evento de inducción de defensa en las plantas. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son: i). La inducción de los genes *PR1* y *ERF1* ocasionada tras la aplicación de los *SodSid* en plantas no infectadas con *Fo59* ii). La inducción en la expresión del gen *MYC2* en las plantas de tomate previamente tratadas con *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117* e infectadas con *Fo59* iii). La disminución en la severidad de la enfermedad en las plantas tratadas los *SodSid* e infectadas con *Fo59*. No obstante, aunque se observó una inducción en la expresión de estos genes en las plantas infectadas únicamente con *Fo59*, es posible que los máximos niveles de expresión de *PR1*, *ERF1* y *MYC2* como respuesta al tratamiento con *SodSid* y a la infección con *Fol* hayan ocurrido en otros tiempos no evaluados en este estudio. De acuerdo con lo anterior y apoyados en los estudios de Cui et al. (2018); Filiz & Kurt, (2019); Wu & Ling, (2019) se sugiere el siguiente modelo que puede explicar el efecto de los *SodSid* de *CBIO117* de *Acinetobacter* en el control de la marchitez vascular generada por *Fo59* en plantas de tomate (Figura 18).

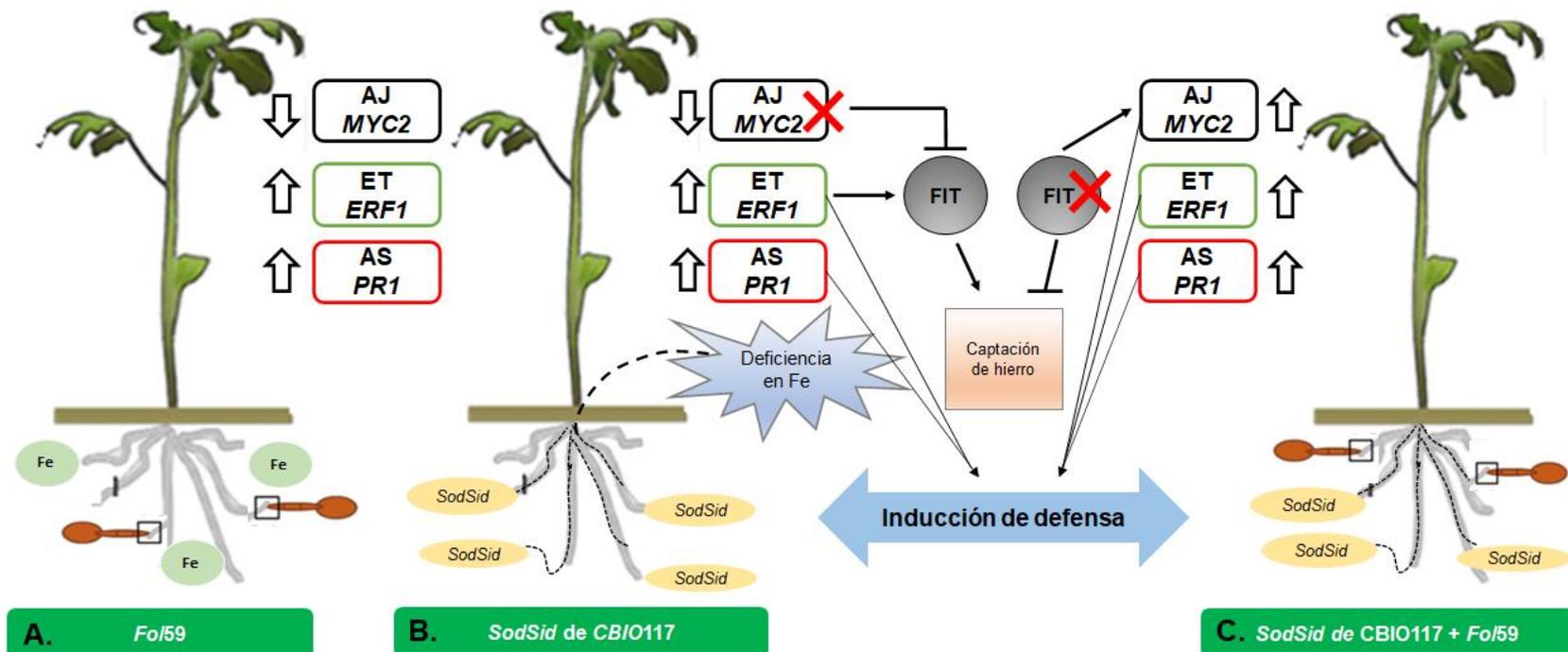


Figura 18. Modelo teórico de la respuesta molecular de la planta de tomate tratada con *SodSid* de *Acinetobacter* CBIO117 e infectada con *Fo59* a las 48 hpi. A). La planta infectada con *Fo59* presenta una condición de estrés que activa las vías de señalización hormonal del ácido salicílico (*PR1*) y etileno (*ERF1*) en condiciones de disponibilidad de hierro en el suelo. B). Cuando las plantas son tratadas con los *SodSid*, estos son absorbidos por las raíces probablemente quelando el hierro presente en las paredes celulares e induciendo la activación de defensa por deficiencia en hierro, la cual aumenta la expresión de genes dependientes del ácido salicílico *PR1* y del etileno *ERF1*. Debido a la condición de estrés, *ERF1* permite la activación del factor de transcripción FIT (Fer-like iron deficiency-induced transcription factor), el cual regula la expresión de los genes involucrados en la captación de hierro para mantener la homeostasis del metal. Al presentarse en la planta condiciones de deficiencia de hierro, FIT se expresa y *MYC2* se mantiene reprimido. C). Posteriormente, cuando estas plantas previamente tratadas con *SodSid* son inoculadas con *Fo59*, la planta ya tiene una inducción previa en la expresión de los genes asociados con defensa de las vías del ácido salicílico (*PR1*) y del etileno (*ERF1*). No obstante, la planta puede reconocer al patógeno y activar la expresión de *MYC2*, el cual induce la transcripción de los genes asociados con la vía de defensa dependiente del ácido jásmonico para contrarrestar el patógeno contribuyendo a la disminución de la enfermedad. En esta condición *MYC2* podría reprimir la expresión de la proteína FIT. *SodSid*: Sobrenadantes con sideróforos. *PR1*: Pathogenesis related protein 1. *ERF1*: Ethylene responsive transcription factor 1. *MYC2*: The basic helix loop helix transcription factor.

Se observó que los *SodSid* de *Acinetobacter* sp. *CBIO117* estimulan la expresión de los genes *PR1* y *ERF1*, involucrados en la respuesta inmune de la planta dependiente de la vía del AS y ET, respectivamente. Es probable que estas vías de señalización estén siendo activadas por los sideróforos presentes en los sobrenadantes o por algún otro compuesto. Algunos estudios han demostrado la capacidad de los sideróforos de inducir la inmunidad de plantas por estas vías como consecuencia de la homeostasis del hierro. Dellagi et al. (2009), Aznar et al. (2014) y Aznar, et al. (2015a) demostraron que el sideróforo crisobactina de *Dickeya dadantii* y los sideróforos deferoxamina y EDDHA (ácido N,N'-etilendiamino-bis 2-hidroxifenil acético) estimulan respuestas de inmunidad en *Arabidopsis* mediante la eliminación del hierro regulando la vía del ácido salicílico.

Con el propósito de profundizar en el entendimiento de la cascada de señalización hormonal activada por la aplicación de *SodSid* de *Acinetobacter* *CBIO117*, ante el estrés biótico generado por *Fo/59*, se requiere evaluar tiempos de expresión génica más tempranos post-elicitación y más tardíos post-infección. En estos análisis se debe incluir además un mayor número de genes que compartan rutas entre el hierro y la señalización hormonal como *IRT1*, *MYB72*, *MYB10*, *EIN2* y *EIN3*. Adicionalmente, el análisis de los *SodSid* de *CBIO117* por metabolómica, facilitaría la identificación de los metabolitos presentes que llevaron a la inducción de la respuesta inmune en la planta y /o generaron el control biológico de *Fol*.

Por otro lado, el efecto de la aplicación de los *SodSid* de *Acinetobacter* sp. en los parámetros de crecimiento de plantas infectadas y sin infectar con *Fo/59* nos indicó que las variables de crecimiento biomasa seca, altura de planta y valores de unidades SPAD se vieron afectadas por el estrés biótico causado por *Fo/59*. No obstante, la aplicación de *SodSid* de *CBIO117* en plantas sin infectar proporcionó un leve incremento de algunos parámetros. Estas observaciones, nos llevan a proponer que este aislamiento de *Acinetobacter* sp. podría actuar como bacteria promotora del crecimiento vegetal. En este contexto, existen algunos informes que indican que algunas especies del género *Acinetobacter* sp. pueden promover el crecimiento de las plantas por medio de la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno y la producción de ácido indol-3-acético (IAA) (Huddedar et al., 2002; Indiragandhi et al., 2008; Gulati et al., 2009; Sachdev et al., 2010; Shi et al., 2011). Además, se ha confirmado que *A. baumannii* puede interactuar con las plantas a través de la producción y degradación de IAA (Lin et al., 2018). El desarrollo de estudios en los que las plantas de tomate sean inoculadas con las células de los

aislamientos de *Acinetobacter* sp. y sus sobrenadantes, contribuirán al entendimiento de su capacidad de promoción del crecimiento vegetal.

El estudio de placas Biolog Eco nos permitió identificar además del perfil metabólico de *Acinetobacter* CBIO117, la fuente de carbono que más promueve la producción de sideróforos. Son pocos los estudios que han evaluado el efecto de la fuente de carbono en la producción de sideróforos de aislamientos de *Acinetobacter* sp. Maindard et al. (2014), evaluaron la producción del sideróforo acinetobactina producido por *Acinetobacter calcoaceticus* en medio con ácido succínico, en medio mínimo con glucosa y en medio mínimo con manitol, logrando la mayor producción en el medio con ácido succínico. Por su parte, Kim et al. (2017) indujeron la producción de un sideróforo tipo catecol en *Acinetobacter* sp. B-W usando el ácido glutámico como única fuente de carbono y nitrógeno a una concentración del 3% v/v. En este estudio los aminoácidos Fenilalanina y L-Asparagina, y la amina putrescina fueron identificados entre las fuentes que generaron un mayor incremento en la producción de sideróforos en *Acinetobacter* sp. CBIO117. Teniendo en cuenta su naturaleza química, es posible que estos aminoácidos y amida no sólo fuesen utilizados con fuente de carbono, sino que también como fuente adicional de nitrógeno. Estas fuentes y las demás identificadas como el tween 80, el tween 40 y el éster metílico del ácido pirúvico pueden haber llevado a la inducción de la producción de los quelantes de hierro en *Acinetobacter* sp. CBIO117 actuando como precursores de la molécula final. Para aclarar cualquiera de estas hipótesis, es necesario realizar estudios en los que se evalúe el efecto de la concentración de estas fuentes en la producción de sideróforos del aislamiento CBIO117. Estos resultados son el primer paso hacia la identificación de los sideróforos producidos por este aislamiento al evidenciar las condiciones en que la molécula puede ser sobreproducida. Además, pueden ser utilizados para iniciar el proceso de optimización del medio de cultivo en el que CBIO117 será crecido para la continuación de su uso en estudios de bioprospección.

Por último, en términos biotecnológicos, los sideróforos han sido usados en el campo médico, ambiental y agrícola. Para utilizar los sideróforos secretados por los microorganismos se debe tener en cuenta el riesgo biológico de la cepa bacteriana, la estructura química del sideróforo, el pH en donde se utilizará ya que esto condiciona su efectividad, la cantidad de sideróforo producida y su estabilidad (Soares, 2022).

En nuestro caso para validar la efectividad de estos sobrenadantes en el control del marchitamiento vascular del tomate dentro de un programa de manejo integrado del cultivo se hace necesario realizar experimentos adicionales que nos permitan: a). Optimizar la producción del metabolito; b). Evaluar su eficacia por otros mecanismos de acción como la competencia por nutrientes; c) Identificar el tipo de sideróforo(s) presente en los sobrenadantes; d) Evaluar su estabilidad y si es necesario la aplicación de adyuvantes; e) Evaluar su efectividad en suelos infestados naturalmente con *Fusarium*; f). Evaluar su eficacia cuando es aplicado vía foliar y g). Determinar la dosis y número de aplicaciones en el ciclo del cultivo.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- A través de este estudio, se identificaron bacterias productoras de sideróforos de los géneros *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Delftia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp., y *Serratia* sp., como habitantes de la rizosfera y filosfera de árboles silvestres de cacao de la región Amazónica de los departamentos del Caquetá y Putumayo. Esta información contribuye al limitado conocimiento que se tiene de las comunidades bacterianas presentes en la Amazonía Colombiana.
- Se identificó *Acinetobacter* sp. como el género bacteriano con mayor potencial para producir sideróforos en condiciones de deficiencia de hierro.
- La participación de los sideróforos secretados por los microorganismos como estrategia para la identificación de controladores biológicos de fitopatógenos queda demostrada en este estudio. La aplicación preventiva de sobrenadantes con sideróforos de los aislamientos *CBIO024*, *CBIO086*, *CBIO117*, *CBIO123* y *CBIO159* del género *Acinetobacter* sp. en plantas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* redujeron la incidencia y severidad del marchitamiento vascular.
- El control del marchitamiento vascular en plantas de tomate tratadas con sobrenadantes con sideróforos de *Acinetobacter* *CBIO117* previamente a la infección con *Fo159* puede estar relacionado con un evento de inducción de defensa en la planta por la vía del ácido jasmónico (*MYC2*) que le permite contrarrestar la infección contra un patógeno con características hemibiótropas.

4.2 Recomendaciones

- Realizar la identificación molecular de las especies de *Acinetobacter* sp. mediante marcadores multilocus (MLSA) que permitan llegar de manera precisa a la especie.
- Realizar estudios enfocados en la identificación y caracterización química de los sobrenadantes de *Acinetobacter* sp. (CBIO117) que permitan confirmar la presencia de sideróforos o de posibles moléculas con potencial biocontrolador.
- Evaluar el potencial de los aislamientos de *Acinetobacter* sp. como promotores del crecimiento vegetal.
- Optimizar la producción de sideróforos de *Acinetobacter* CBIO117 para continuar con el desarrollo de estudios que permitan evaluar su potencial biocontrolador en plantas bajo condiciones semicontroladas.
- Evaluar la expresión de genes involucrados en la regulación de la captación de hierro y genes involucrados en la cascada de señalización del ácido jasmónico con el objetivo de construir la vía de señalización involucrada en la inducción de resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* por acción de los sobrenadantes de la cepa de *Acinetobacter* CBIO117.

Bibliografía

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier.
- Aguado-Santacruz, G., Moreno-Gómez, B., Jimenez, B., & Moya, E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación del hierro por las plantas: Una Síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35, 9-21. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.9>
- Aguilar, M. O., Álvarez, F., Medeot, D., Jofré, E., Semorile, L., & Pistorio, M. (2021). Screening of epiphytic rhizosphere-associated bacteria in Argentinian Malbec and Cabernet-Sauvignon vineyards for potential use as biological fertilisers and pathogen-control agents. *OENO One*, 55(4), 145-157. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.4.4655>
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of Non-baumannii Acinetobacter Species. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00049>
- Al-Askar, A. A., Saber, W. I. A., Ghoneem, K. M., Hafez, E. E., & Ibrahim, A. A. (2021). Crude Citric Acid of *Trichoderma asperellum*: Tomato Growth Promotor and Suppressor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plants*, 10(2), 222. <https://doi.org/10.3390/plants10020222>
- Aleghaee, S., Rezaee, S., Ebadi, M., & Zamanizadeh, H. (2019). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* and induction of defensive enzyme of phenylalanine ammonialyse in tomato by *Trichoderma* and *Bacillus* antagonist isolates. *Journal of Microbial World*, 12(2), 125-138.
- Alvarez-Carvajal, F., Gonzalez-Soto, T., Armenta-Calderón, A. D., Méndez Ibarra, R., Esquer-Miranda, E., Juárez, J., Encinas-Basurto, D., Alvarez-Carvajal, F., Gonzalez-Soto, T., Armenta-Calderón, A. D., Méndez Ibarra, R., Esquer-Miranda, E., Juárez, J., & Encinas-Basurto, D. (2020). Silver nanoparticles coated with chitosan against *Fusarium oxysporum* causing the tomato wilt. *Biotecnia*, 22(3), 73-80. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.952>
- Alves-Júnior, M., de Sousa, F. O., Silva, T. F., Albino, U. B., Garcia, M. G., Moreira, S. M. C. de O., & Vieira, M. R. da S. (2021). Functional and morphological analysis of isolates of phylloplane and rhizoplane endophytic bacteria interacting in different cocoa production systems in the Amazon. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100039. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100039>
- Amaya-Gómez, C. V., Hirsch, A. M., & Soto, M. J. (2015). Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility. *BMC Microbiology*, 15, 58. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0390-z>
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X)
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Argüello-Navarro, A. Z., & Moreno-Rozo, L. Y. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63(3), 238-245. <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.41033>
- Arnold, A. E., & Herre, E. A. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, 95(3), 388-398.
- Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 81(6), 673-677.

- Arya, N., Rana, A., Rajwar, A., Sahgal, M., & Sharma, A. (2018). Biocontrol Efficacy of Siderophore Producing Indigenous Pseudomonas Strains Against Fusarium Wilt in Tomato. *National Academy Science Letters*, 41. <https://doi.org/10.1007/s40009-018-0630-5>
- Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez Vascular del Tomate: I. Presencia de Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 114-120.
- Aznar, A., Chen, N., Rigault, M., Riache, N., Joseph, D., Desmaële, D., Mouille, G., Boutet, S., Soubigou-Taconnat, L., Renou, J.-P., Thomine, S., Expert, D., & Dellagi, A. (2014). Scavenging Iron: A Novel Mechanism of Plant Immunity Activation by Microbial Siderophores1[C][W]. *Plant physiology*, 164. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233585>
- Aznar, A., Chen, N. W. G., Thomine, S., & Dellagi, A. (2015). Immunity to plant pathogens and iron homeostasis. *Plant Science*, 240, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.08.022>
- Aznar, A., Patrit, O., Berger, A., & Dellagi, A. (2015). Alterations of iron distribution in Arabidopsis tissues infected by *Dickeya dadantii*. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 521-528. <https://doi.org/10.1111/mpp.12208>
- Báez-Valdez, E. P., Carrillo-Fasio, J. A., Báez-Sañudo, M. A., García-Estrada, R. S., Valdez-Torres, J. B., & Contreras-Martínez, R. (2010). Uso de Portainjertos Resistentes para el Control de la Fusariosis (*Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* Snyder & Hansen raza 3) del Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Condiciones de MallaSombra. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 111-123.
- Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillet, B., Siegwart, M., & Nicot, P. C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*, 6, 566. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566>
- Bardin, M., & Nicot, P. (2018). *Is the development of resistance to biological control among plant pathogens possible?*
- Baysal, Ö., Siragusa, M., İkten, H., Polat, İ., Gümrükcü, E., Yigit, F., Carimi, F., & Teixeira da Silva, J. A. (2009). *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2009.09.008>
- Betoudji, F., Abd El Rahman, T., Miller, M. J., Ghosh, M., Jacques, M., Bouarab, K., & Malouin, F. (2020). A Siderophore Analog of Fimsbactin from *Acinetobacter* Hinders Growth of the Phytopathogen *Pseudomonas syringae* and Induces Systemic Priming of Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Pathogens*, 9(10), 806. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100806>
- Betoudji, F., Rahman, T. A. El, Miller, M. J., Ghosh, M., Jacques, M., Bouarab, K., & Malouin, F. (2020). A siderophore analog of fimsbactin from *acinetobacter* hinders growth of the phytopathogen *pseudomonas syringae* and induces systemic priming of immunity in *arabidopsis thaliana*. *Pathogens*, 9(10), 1-12. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100806>
- Binh, P., Viet Tru, N., Dung, V., Thoa, N., Thao, P., Ha, T., & Thang, V. (2017). Bacteria in Wooden Box Fermentation of Cocoa in Daklak, Vietnam. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 5. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00176>
- Bodah, E. (2017). Root Rot Diseases in Plants: A Review of Common Causal Agents and Management Strategies. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*, 5. <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.05.555661>
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: An intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, 10, 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- Bourigault, Y., Rodrigues, S., Crépin, A., Chane, A., Taupin, L., Bouteiller, M., Dupont, C., Merieau, A., Konto-Ghiorghi, Y., Boukerb, A. M., Turner, M., Hamon, C., Dufour, A., Barbey, C., & Latour, X. (2021). Biocontrol of Biofilm Formation: Jamming of Sessile-Associated Rhizobial Communication by Rhodococcal Quorum-Quenching. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8241. <https://doi.org/10.3390/ijms22158241>
- Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Resistencia de plantas a patógenos: Una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 245-255. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>

- Cáceres, P. F. F., Vélez, L. P., Junca, H., & Moreno-Herrera, C. X. (2021). Theobroma cacao L. agricultural soils with natural low and high cadmium (Cd) in Santander (Colombia), contain a persistent shared bacterial composition shaped by multiple soil variables and bacterial isolates highly resistant to Cd concentrations. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100086>
- Caracuel, Z., Roncero, M. I. G., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I., & Di Pietro, A. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology*, 48(3), 765-779. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03465.x>
- Cardona, G. I., Arcos, A. L., & Murcia, U. G. (2005). Abundancia de actinomicetes y micorrizas arbusculares en paisajes fragmentados de la Amazonia colombiana*. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 317-326.
- Cardona-Piedrahita, L., & Zapata, J. (2019). Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen, causante del marchitamiento vascular del tomate. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43, 227. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.854>
- Carmona, S. L., Burbano-David, D., Gómez, M. R., Lopez, W., Ceballos, N., Castaño-Zapata, J., Simbaqueba, J., & Soto-Suárez, M. (2020). Characterization of Pathogenic and Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates Associated with Commercial Tomato Crops in the Andean Region of Colombia. *Pathogens*, 9(1), 70. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010070>
- Carmona, S. L., Villarreal-Navarrete, A., Burbano-David, D., Gómez-Marroquín, M., Torres-Rojas, E., & Soto-Suárez, M. (2021). Protection of tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* induced by chitosan. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 15(3), e12822-e12822. <https://doi.org/10.17584/rcch.2021v15i3.12822>
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. *Agronomy*, 9(3), 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., & Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1919-1928. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0090-7>
- Chiang, K.-S., Liu, H. I., Tsai, J. W., Tsai, J. R., & Bock, C. (2017). A discussion on disease severity index values. Part II: Using the disease severity index for null hypothesis testing. *Annals of Applied Biology*, 171, 490-505. <https://doi.org/10.1111/aab.12396>
- Constantin, M. E., de Lamo, F. J., Vlieger, B. V., Rep, M., & Takken, F. L. W. (2019). Endophyte-Mediated Resistance in Tomato to *Fusarium oxysporum* Is Independent of ET, JA, and SA. *Frontiers in Plant Science*, 10, 979. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00979>
- Cucu, M. A., Gilardi, G., Pugliese, M., Gullino, M. L., & Garibaldi, A. (2020). An assessment of the modulation of the population dynamics of pathogenic *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* in the tomato rhizosphere by means of the application of *Bacillus subtilis* QST 713, *Trichoderma* sp. TW2 and two composts. *Biological Control*, 142, 104158. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104158>
- Cui, Y., Chen, C.-L., Cui, M., Zhou, W.-J., Wu, H.-L., & Ling, H.-Q. (2018). Four IVa bHLH Transcription Factors Are Novel Interactors of FIT and Mediate JA Inhibition of Iron Uptake in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 11. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.005>
- de Lamo, F. J., & Takken, F. L. W. (2020). Biocontrol by *Fusarium oxysporum* Using Endophyte-Mediated Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00037>
- De Lorenzo, G., Ferrari, S., Cervone, F., & Okun, E. (2018). Extracellular DAMPs in Plants and Mammals: Immunity, Tissue Damage and Repair. *Trends in Immunology*, 39(11), 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.09.006>
- de Sain, M., & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *International journal of molecular sciences*, 16, 23970-23993. <https://doi.org/10.3390/ijms161023970>

- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Delgado-Jarana, J., Martínez-Rocha, A. L., Roldán-Rodríguez, R., Roncero, M. I. G., & Di Pietro, A. (2005). Fusarium oxysporum G-protein beta subunit Fgb1 regulates hyphal growth, development, and virulence through multiple signalling pathways. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *42*(1), 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.10.001>
- Delgado-Ramírez, C. S., Hernández-Martínez, R., & Sepúlveda, E. (2021). Rhizobacteria Associated with a Native Solanaceae Promote Plant Growth and Decrease the Effects of Fusariumoxysporum in Tomato. *Agronomy*, *11*(3), 579. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030579>
- Dellagi, A., Segond, D., Rigault, M., Fagard, M., Simon, C., Saindrenan, P., & Expert, D. (2009). Microbial Siderophores Exert a Subtle Role in Arabidopsis during Infection by Manipulating the Immune Response and the Iron Status. *Plant Physiology*, *150*(4), 1687-1696. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138636>
- Di Pietro, A., García-MacEira, F. I., Męglecz, E., & Roncero, M. I. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus Fusarium oxysporum is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, *39*(5), 1140-1152.
- Díaz-García, Huang, S., Spröer, C., Sierra-Ramírez, R., Bunk, B., Overmann, J., & Jiménez, D. J. (2021). Dilution-to-Stimulation/Extinction Method: A Combination Enrichment Strategy To Develop a Minimal and Versatile Lignocellulolytic Bacterial Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(2), e02427-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02427-20>
- Dimkpa, C., Merten, D., Svatos, A., Büchel, G., & Kothe, E. (2009). Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.10.010>
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, *10*(1), 9-17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1416>
- Duffy, B. K., & Défago, G. (1999). Environmental Factors Modulating Antibiotic and Siderophore Biosynthesis by Pseudomonas fluorescens Biocontrol Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(6), 2429-2438.
- Dumas, Z., Ross-Gillespie, A., & Kümmerli, R. (2013). Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments. *Proceedings. Biological Sciences*, *280*(1764), 20131055. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1055>
- Duyvesteijn, R., van Wijk, R., Boer, Y., Rep, M., Cornelissen, B., & Haring, M. (2005). Frp1 is a Fusarium oxysporum F-box protein required for pathogenicity on tomato. *Molecular microbiology*, *57*, 1051-1063. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04751.x>
- Ehlert, G., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1994). Serratichelins, a New Catechol Siderophore from Serratia marcescens. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *49*(1-2), 11-17. <https://doi.org/10.1515/znc-1994-1-203>
- Elshahawy, I., Saied, N., Abd-El-Kareem, F., & Morsy, A. (2018). Field application of selected bacterial strains and their combinations for controlling onion and garlic white rot disease caused by Stromatinia cepivora. *Journal of Plant Pathology*, *100*. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0113-z>
- Esmeraldas García, G. A. (2019). *Actividad antagonista de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR) a Moniliophthora perniciosa (Escoba de bruja) en Cacao (Theobroma cacao L.)*. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3627>
- Essarioui, A., Mokrini, F., & Afechtal, M. (2016). Molecular interactions between tomato and its wilt pathogen Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici- a review. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, *4*, 66-74.
- Fang, Q., Fan, Z., Xie, Y., Wang, X., Li, K., & Liu, Y. (2016). Screening and Evaluation of the Bioremediation Potential of Cu/Zn-Resistant, Autochthonous Acinetobacter sp. FQ-44 from Sonchus oleraceus L. *Frontiers in Plant Science*, *7*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01487>
- Farag, H., Abdou, Z., Salama, D., Ibrahim, M., & Srour, H. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, *56*, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2011.05.007>
- Fasio, J. A. C., Rodríguez, T. de J. M., Estrada, R. S. G., Ortega, J. E. C., Zequera, I. M., & Barajas, A. J. S. (2003). Razas de Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici Snyder y Hansen, en Tomate (Lycopersicon

- esculentum Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123-127.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist*, 125(1), 1-15.
- Filiz, E., & Kurt, F. (2019). FIT (Fer-like iron deficiency-induced transcription factor) in plant iron homeostasis: Genome-wide identification and bioinformatics analyses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28(2), 143-157. <https://doi.org/10.1007/s13562-019-00497-0>
- Foughalia, A., Yousra, B., Chandeysson, C., Djedidi, M., Tahirine, M., Kamel, A., & Nicot, P. (2022). *Acinetobacter calcoaceticus* SJ19 and *Bacillus safensis* SJ4, two Algerian rhizobacteria protecting tomato plants against *Botrytis cinerea* and promoting their growth. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32. <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00511-z>
- Ganger, M. T., Dietz, G. D., & Ewing, S. J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 534. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1949-5>
- Gao, M., He, Y., Yin, X., Zhong, X., Yan, B., Wu, Y., Chen, J., Li, X., Zhai, K., Huang, Y., Gong, X., Chang, H., Xie, S., Liu, J., Yue, J., Xu, J., Zhang, G., Deng, Y., Wang, E., ... He, Z. (2021). Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. *Cell*, 184(21), 5391-5404.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.009>
- Garzón, L. P. (2016). IMPORTANCIA DE LAS MICORRIZAS ARBUSCULARES (MA) PARA UN USO SOSTENIBLE DEL SUELO EN LA AMAZONIA COLOMBIANA. *Revista Luna Azul*, 42, 217-234.
- Goel, V., Kapil, A., Das, B., & Rao, D. (1998). Influence of iron on growth and extracellular products of *Acinetobacter baumannii*. *Japanese journal of medical science & biology*, 51, 25-33. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.51.25>
- González Marquetti, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*-TOMATE. *Revista de Protección Vegetal*, 27, 1-7.
- González-Chávez, M. C. A. (2017). FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA POR MICROORGANISMOS: ENFÁSIS EN BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS. *Agro Productividad*, 10(4), Article 4. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1000>
- Guerinot, M. L. (1994). Microbial Iron Transport. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 743-772. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.003523>
- Gulati, A., Vyas, P., Rahi, P., & Kasana, R. (2009). Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter rhizosphaerae* Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas. *Current microbiology*, 58, 371-377. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9339-x>
- Guo, L., Zhao, G., Xu, J., Kistler, H. C., Gao, L., & Ma, L. (2016). Compartmentalized gene regulatory network of the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *The New Phytologist*, 211(2), 527-541. <https://doi.org/10.1111/nph.13912>
- Hamuel, J. D., Ndakidemi, P., Human, I., & Benade, S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and environments / JSME*, 26, 101-112. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME10179>
- Heo, A. Y., Koo, Y. M., & Choi, H. W. (2022). Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against Tomato *Fusarium* Wilt and Bacterial Speck Diseases. *Biology*, 11(4), 619. <https://doi.org/10.3390/biology11040619>
- Herlihy, J. H., Long, T. A., & McDowell, J. M. (2020). Iron homeostasis and plant immune responses: Recent insights and translational implications. *Journal of Biological Chemistry*, 295(39), 13444-13457. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010856>
- Hernandez-Montiel, L. G., Gutierrez-Perez, E. D., Murillo-Amador, B., Vero, S., Chiquito-Contreras, R. G., & Rincon-Enriquez, G. (2018). Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.01.015>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637-657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>

- Hipólito-Romero, E., Carcaño-Montiel, M. G., Ramos-Prado, J. M., Vázquez-Cabañas, E. A., López-Reyes, L., & Ricaño-Rodríguez, J. (2017). Efecto de inoculantes bacterianos edáficos mixtos en el desarrollo temprano de cultivares mejorados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal tradicional del norte de Oaxaca, México. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.003>
- Hirano, Y., & Arie, T. (2006). PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. Sp. *Lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Journal of General Plant Pathology*, 72(5), 273-283. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0287-7>
- Höfte, M., & Bakker, P. (2007). *Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (pp. 121-133). https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5_6
- Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986-995. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J. C., Takken, F. L. W., & Rep, M. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 58(6), 970-978. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03838.x>
- Hsiao, P.-Y., Cheng, C.-P., Koh, K. W., & Chan, M.-T. (2017). The Arabidopsis defensin gene, AtPDF1.1, mediates defence against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* via an iron-withholding defence system. *Scientific Reports*, 7(1), 9175. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08497-7>
- Huang, Z., Zhang, Z., Zhang, X., Zhang, H., Huang, D., & Huang, R. (2004). Tomato TERF1 modulates ethylene response and enhances osmotic stress tolerance by activating expression of downstream genes. *FEBS Letters*, 573(1-3), 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.064>
- Huddedar, S. B., Shete, A. M., Tilekar, J. N., Gore, S. D., Dhavale, D. D., & Chopade, B. A. (2002). Isolation, characterization, and plasmid pUPI126-mediated indole-3-acetic acid production in acinetobacter strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102-103(1-6), 21-39. <https://doi.org/10.1385/abab:102-103:1-6:021>
- Hurtado, E., González-Vallejos, F., Roper, C., Bastías, E., & Mazuela, P. (2017). Propuesta para la determinación del contenido de clorofila en hojas de tomate. *Idesia (Arica)*, 35, 129-130. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017000400129>
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., & Sa, T. (2008). Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Bacteria Isolated from Larval Guts of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current microbiology*, 56, 327-333. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4>
- Jaramillo Noreña, J., Rodríguez, V. P., Guzmán, M., & Zapata, M. (2006). *El cultivo de tomate bajo invernadero*. <http://localhost:8080/handle/11348/3824>
- J.g, M., C, K., & F, S. (1990). Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Radicis-lycopersici*. *Plant Disease*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Additions+to+the+host+range+of+Fusarium+oxysporum+f.+sp.+radicis-lycopersici.&author=Menzies+J.G.&publication_year=1990
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kang, S.-M., Khan, A., Hamayun, M., Shinwari, Z., Kim, Y.-H., Joo, G.-J., & Lee, I.-J. (2012). *Acinetobacter Calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Abstracts of papers*, 44, 365-372.
- Kang, Y.-S., Jung, J., Jeon, C. O., & Park, W. (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. Nov. Is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 49(1), 29-34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y>
- Karthika, S., Varghese, S., & Jisha, M. S. (2020). Exploring the efficacy of antagonistic rhizobacteria as native biocontrol agents against tomato plant diseases. *3 Biotech*, 10(7), 320. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02306-1>
- Khalil, Md. M. R., Fierro-Coronado, R. A., Peñuelas-Rubio, O., Villa-Lerma, A. G., Plascencia-Jatomea, R., Félix-Gastélum, R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2021). Rhizospheric bacteria as potential biocontrol agents against *Fusarium* wilt and crown and root rot diseases in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7460-7471. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.043>

- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, 212-213, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Kieu, N. P., Aznar, A., Segond, D., Rigault, M., Simond-Côte, E., Kunz, C., Soulie, M.-C., Expert, D., & Dellagi, A. (2012). Iron deficiency affects plant defence responses and confers resistance to *Dickeya dadantii* and *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 13(8), 816-827. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00790.x>
- Kim, K.-J., Jang, J.-H., & Yang, Y.-J. (2017). Production of siderophore from L-glutamic acid as both carbon and nitrogen sole sources in *Acinetobacter* sp. B-W. *Korean Journal of Microbiology*, 53(2), 97-102. <https://doi.org/10.7845/kjm.2017.7023>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kwon, H.-D., & Song, H.-G. (2014). Interactions between Indole-3-acetic Acid Producing *Acinetobacter* sp. SW5 and Growth of Tomato Plant. *The Korean Journal of Microbiology*, 50, 302-307. <https://doi.org/10.7845/kjm.2014.4050>
- Lairini, K., Perez-Espinoza, A., Pineda, M., & Ruiz-Rubio, M. (1996). Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Applied and environmental microbiology*, 62, 1604-1609. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.5.1604-1609.1996>
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(10), 7072-7077. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>
- Leite, H. A. C., Silva, A. B., Gomes, F. P., Gramacho, K. P., Faria, J. C., de Souza, J. T., & Loguercio, L. L. (2013). *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2639-2651. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4574-2>
- Leiva, E., Osorio García, M. A., & Ramírez, R. (2013). MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L) EN CONDICIONES DE BOSQUE HÚMEDO PREMONTANO (Bh-PM). *Suelos Ecuatoriales*, 43, 35-45.
- Lievens, B., van Baarlen, P., Verreth, C., van Kerckhove, S., Rep, M., & Thomma, B. P. H. J. (2009). Evolutionary relationships between *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* and *F. oxysporum* f. Sp. *Radicis-lycopersici* isolates inferred from mating type, elongation factor-1 α and exopolysaccharuronase sequences. *Mycological Research*, 113(Pt 10), 1181-1191. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.019>
- Lin, H.-R., Shu, H.-Y., & Lin, G.-H. (2018). Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiological Research*, 216, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.004>
- Lin, J., Cheng, J., Wang, Y., & Shen, X. (2018). The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00230>
- López-Berges, M. S., Rispaal, N., Prados-Rosales, R. C., & Di Pietro, A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 22(7), 2459-2475. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075937>
- López-Díaz, C. (2019). *Mecanismos genéticos y moleculares implicados en la plasticidad genómica de Fusarium oxysporum*. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/18865>
- Madrid, M. P., Di Pietro, A., & Roncero, M. I. G. (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular Microbiology*, 47(1), 257-266. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>
- Maindard, D. V., Kasture, V. M., Chaudhari, H., Dhavale, D. D., Chopade, B. A., & Sachdev, D. P. (2014). Characterization and Fungal Inhibition Activity of Siderophore from Wheat Rhizosphere Associated *Acinetobacter calcoaceticus* Strain HIRFA32. *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), 315-322. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0446-z>
- Mantilla-Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña-Venegas, C. P., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. M. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros

- fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical*, 57(4), 915-927.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M. J., Jung, S. C., Pascual, J. A., & Pozo, M. J. (2013). Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 4, 206. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00206>
- Martín-Urdroz, M., Roncero, M. I. G., González-Reyes, J. A., & Ruiz-Roldán, C. (2008). ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 112-121. <https://doi.org/10.1128/EC.00347-07>
- McRose, D., Baars, O., Seyedsayamdoost, M., & Morel, F. (2018). Quorum sensing and iron regulate a two-for-one siderophore gene cluster in *Vibrio harveyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 201805791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805791115>
- Mehnert, M., Retamal-Morales, G., Schwabe, R., Vater, S., Heine, T., Levicán, G. J., Schlömann, M., & Tischler, D. (2017). Revisiting the Chrome Azurol S Assay for Various Metal Ions. *Solid State Phenomena*, 262, 509-512. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.509>
- Meziane, H., Sluis, I. van der, Loon, L. C. van, Höfte, M., & Bakker, P. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular plant pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00276.x>
- Michavila, G., Adler, C., De Gregorio, P. R., Lami, M. J., Caram Di Santo, M. C., Zenoff, A. M., de Cristobal, R. E., & Vincent, P. A. (2017). *Pseudomonas protegens* CS1 from the lemon phyllosphere as a candidate for citrus canker biocontrol agent. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 19(4), 608-617. <https://doi.org/10.1111/plb.12556>
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- Milagres, A. M., Machuca, A., & Napoleão, D. (1999). Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 37(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(99)00028-7)
- Modarresi, F., Azizi, O., Shakibaie, M. R., Motamedifar, M., Mosadegh, E., & Mansouri, S. (2015). Iron limitation enhances acyl homoserine lactone (AHL) production and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, 6(2), 152-161. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1003001>
- Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., Cano Ríos, P., Moreno Reséndez, A., Carda Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: Una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Müller, G., Matzanke, B. F., & Raymond, K. N. (1984). Iron transport in *Streptomyces pilosus* mediated by ferrichrome siderophores, rhodotorulic acid, and enantio-rhodotorulic acid. *Journal of Bacteriology*, 160(1), 313-318. <https://doi.org/10.1128/jb.160.1.313-318.1984>
- Muñoz Macías, B. I. (2019). *Rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en el biocontrol del nematodo Meloidogyne incognita y Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici en el cultivo de tomate (Lycopersicon esculentum)*. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3634>
- Nirmaladevi, D., Venkataramana, M., Srivastava, R. K., Uppalapati, S. R., Gupta, V. K., Yli-Mattila, T., Clement Tsui, K. M., Srinivas, C., Niranjana, S. R., & Chandra, N. S. (2016). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Lycopersici. *Scientific Reports*, 6(1), 21367. <https://doi.org/10.1038/srep21367>
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V. J., & Kareem, A. (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01298>
- Nogales, J., Domínguez-Ferreras, A., Amaya-Gómez, C. V., van Dillewijn, P., Cuéllar, V., Sanjuán, J., Olivares, J., & Soto, M. J. (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* fadD mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics*, 11(1), 157. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-157>
- Nüsslein, K. (2012, enero 11). *Amazon rainforest microbial observatory: Functional diversity, taxonomic diversity and response to ecosystem conversion*.

- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403-1414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>
- Payne, S. M. (1994). Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology*, 235, 329-344. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Pedroza-Sandoval, A., & Gaxiola, J. (2009). *Análisis del área bajo la curva del progreso de las enfermedades (ABCPE) en patosistemas agrícolas* (pp. 180-189). <https://doi.org/10.13140/2.1.4475.7767>
- Pena, R. T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., Bleriot, I., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2019). Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01100>
- Penwell, W. F., DeGrace, N., Tentarelli, S., Gauthier, L., Gilbert, C. M., Arivett, B. A., Miller, A. A., Durand-Reville, T. F., Joubran, C., & Actis, L. A. (2015). Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 16(13), 1896-1904. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500147>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pietro, A., Gonzalez-Roncero, M., & Roldán, M. (2009). *From Tools of Survival to Weapons of Destruction: The Role of Cell Wall-Degrading Enzymes in Plant Infection* (Vols. 181-200, pp. 181-200). https://doi.org/10.1007/978-3-540-87407-2_10
- Popat, R., Harrison, F., da Silva, A., Easton, S., McNally, L., Williams, P., & Diggle, S. (2017). *Environmental modification via a quorum sensing molecule influences the social landscape of siderophore production*. <https://doi.org/10.1101/053918>
- Popovic, Z., Maier, V., Avramov, M., Uzelac, I., Gosic-Dondo, S., Blagojević, D., & Kostál, V. (2021). Acclimations to Cold and Warm Conditions Differently Affect the Energy Metabolism of Diapausing Larvae of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* (Hbn.). *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.768593>
- Prashant, D., Makarand, R. R., Bhushan, L., & Sudhir, B. (2009). *Siderophoregenic Acinetobacter calcoaceticus isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity*. <https://doi.org/10.21161/mjm.13508>
- Prathibha, K., & Sumathi, S. (2008). Biodegradation of mixture containing monohydroxybenzoate isomers by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 813-823. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9545-x>
- Prihatna, C., Barbetti, M. J., & Barker, S. J. (2018). A Novel Tomato Fusarium Wilt Tolerance Gene. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01226>
- Purkayastha, G., Mangar, P., Saha, A., & Saha, D. (2018). Evaluation of the biocontrol efficacy of a *Serratia marcescens* strain indigenous to tea rhizosphere for the management of root rot disease in tea. *PLOS ONE*, 13, e0191761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191761>
- Rada Cuentas, J. (2016). *Acinetobacter un patógeno actual*. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 55(1), 29-48.
- Radó, J., Kaszab, E., Benedek, T., Kriszt, B., & Szoboszlai, S. (2019). First isolation of carbapenem-resistant *Acinetobacter beijerinckii* from an environmental sample. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 66(1), 113-130. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.004>
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104(3), 321-330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Ranjan, K., Paula, F. S., Mueller, R. C., Jesus, E. da C., Cenciani, K., Bohannan, B. J. M., Nüsslein, K., & Rodrigues, J. L. M. (2015). Forest-to-pasture conversion increases the diversity of the phylum Verrucomicrobia in Amazon rainforest soils. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00779>

- Rehman, R., Waheed, K., Nawaz, H., & Hanif, M. A. (2019). *Medicinal Plants of South Asia, Chapter 46—Tomato* (p. 768). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00046-X>
- Restrepo, S., Henao, C., Galvis, L., Pérez, J., Hoyos, R., & Granada, D. (2020). Siderophore containing extract from *Serratia plymuthica* AED38 as an efficient strategy against avocado root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Biocontrol Science and Technology*, *31*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1846162>
- Ríos, A. G., Vidal, C. C. R., Montes, E. R., & López, A. S. (2017). Residuos de plaguicidas en tomate (*Solanum lycopersicum*) comercializado en Armenia, Colombia. *Vitae*, *24*(2 (2)), 68-79. [https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2\(2\)a08](https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2(2)a08)
- Rispail, N., & Pietro, A. (2009). *Fusarium oxysporum* Ste12 Controls Invasive Growth and Virulence Downstream of the Fmk1 MAPK Cascade. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, *22*, 830-839. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0830>
- Rodrigues, J. L. M., Pellizari, V. H., Mueller, R., Baek, K., Jesus, E. da C., Paula, F. S., Mirza, B., Hamaoui, G. S., Tsai, S. M., Feigl, B., Tiedje, J. M., Bohannan, B. J. M., & Nüsslein, K. (2013). Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(3), 988-993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220608110>
- Rokhbakhsh-Zamin, F., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K. R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P. K., & Chopade, B. A. (2011). Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(6), 556-566.
- Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., & Milano, F. (2017). Antifungal activity of pomegranate peel extract against fusarium wilt of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, *147*(1), 229-238. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0994-7>
- Rooney, A. P., Dunlap, C. A., & Flor-Weiler, L. B. (2016). *Acinetobacter lactuca* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (Asteraceae: *Lactuca sativa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(9), 3566-3572. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001234>
- Rosconi, F., Davyt, D., Martínez, V., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., Zane, H., Butler, A., de Souza, E. M., & Fabiano, E. (2013). Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. *Environmental Microbiology*, *15*(3), 916-927. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12075>
- Sachdev, D., Nema, P., Dhakephalkar, P., Zinjarde, S., & Chopade, B. (2010). Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological Research*, *165*(8), 627-638. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.12.002>
- Safdarpour, F., & Khodakaramian, G. (2019). *Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with Verticillium dahliae under in-vitro and in-vivo conditions*. *7*, 77-90.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(5), 3984-3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Saijo, Y., Loo, E. P.-I., & Yasuda, S. (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *93*(4), 592-613. <https://doi.org/10.1111/tpj.13808>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sajeed Ali, S., & Vidhale, N. (2013). Bacterial Siderophore and their Application: A review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, *2*, 303-312.
- Santos, S., Neto, I. F. F., Machado, M. D., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2014). Siderophore Production by *Bacillus megaterium*: Effect of Growth Phase and Cultural Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(1), 549-560. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0562-y>
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Peña Cabriales, J., & Farías-Rodríguez, R. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, *28*, 53-60.

- Sayed, Chincholkar, S., Reddy, M., Gangurde, Dr. N., Patel, P., & Maheshwari, D. (2013). Siderophore Producing PGPR for Crop Nutrition and Phytopathogen Suppression. En *Bacteria in Agrobiology: Disease Management* (pp. 449-471). https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_17
- Sayed, R., Badgajar, M., Sonawane, H., Mhaske, M., & Chincholkar, S. (2005). Production of microbial iron chelators (siderophores) by Fluorescent pseudomonads. *Indian Journal of Biotechnology Vol, 4*, 484-490.
- Sayed, R., & Reddy, M. (2011). *Siderophore based heavy metal resistant green fungicides for sustainable environment* (pp. 443-445).
- Sayed, R. Z., & Patel, P. R. (2011). Biocontrol Potential of Siderophore Producing Heavy Metal Resistant *Alcaligenes* sp. And *Pseudomonas aeruginosa* RZS3 vis-à-vis Organophosphorus Fungicide. *Indian Journal of Microbiology*, *51*(3), 266-272. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0170-x>
- Schandry, N. (2017). A Practical Guide to Visualization and Statistical Analysis of *R. solanacearum* Infection Data Using R. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00623>
- Schmidt, S. M., Houterman, P. M., Schreiber, I., Ma, L., Amyotte, S., Chellappan, B., Boeren, S., Takken, F. L. W., & Rep, M. (2013). MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics*, *14*(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-119>
- Schmitt, S., Maréchaux, I., Chave, J., Fischer, F. J., Pioniot, C., Traissac, S., & Hérault, B. (2020). Functional diversity improves tropical forest resilience: Insights from a long-term virtual experiment. *Journal of Ecology*, *108*(3), 831-843. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13320>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987a). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, *160*(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987b). Universal CAS assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, *160*, 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shapiro, J. A., & Wencewicz, T. (2016). Acinetobactin Isomerization Enables Adaptive Iron Acquisition in *Acinetobacter baumannii* through pH-Triggered Siderophore Swapping. *ACS infectious diseases*. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00145>
- Sheldon, J. R., & Skaar, E. P. (2020). *Acinetobacter baumannii* can use multiple siderophores for iron acquisition, but only acinetobactin is required for virulence. *PLoS Pathogens*, *16*(10), e1008995. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008995>
- Shi, Y., Lou, K., & Li, C. X. (2011). Growth promotion effects of the endophyte *Acinetobacter johnsonii* strain 3-1 on sugar beet. *Symbiosis*. <https://doi.org/10.1007/s13199-011-0139-x>
- Shin, B., Park, C., Imlay, J. A., & Park, W. (2018). 4-Hydroxybenzaldehyde sensitizes *Acinetobacter baumannii* to amphenicols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(5), 2323-2335. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8791-1>
- Silva, J. C. da, Santos, L. D. S., Faria, P. S. A., Silva, F. G., Rubio, A., Martins, P. F., & Selari, P. J. R. G. (2021). Multifunctional characteristics of *Acinetobacter lwoffii* Bac109 for growth promotion and colonization in micropropagated sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, *51*. <https://www.redalyc.org/journal/2530/253068585042/html/#B50>
- Singh, P., Singh, J., Ray, S., Rajput, R., Vaishnav, A., Singh, R., & Singh, H. (2020). Seed biopriming with antagonistic microbes and ascorbic acid induce resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Microbiological Research*, *237*, 126482. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126482>
- Singh, R., Biswas, S., Nagar, D., Singh, J., Singh, M., & Mishra, Y. (2015). Sustainable Integrated Approach for Management of *Fusarium* Wilt of Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* (Sacc.) Synder and Hansen. *Sustainable Agriculture Research*, *4*. <https://doi.org/10.5539/sar.v4n1p138>
- Soares, E. (2022). Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11995-y>
- Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2014). Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against

- Rhizoctonia solani. *Journal of Basic Microbiology*, 54(6), 585-597. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200564>
- Sridevi, M., & Mallaiiah, K. (2008). Production of Hydroxamate-Type of Siderophores by Rhizobium strains from Sesbania sesban (L.) Merr. *International Journal of Soil Science*, 3, 28-34. <https://doi.org/10.3923/ijss.2008.28.34>
- Srinivas, C., Nirmala Devi, D., Narasimha Murthy, K., Mohan, C. D., Lakshmeesha, T. R., Singh, B., Kalagatur, N. K., Niranjana, S. R., Hashem, A., Alqarawi, A. A., Tabassum, B., Abd_Allah, E. F., Chandra Nayaka, S., & Srivastava, R. K. (2019). Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1315-1324. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.002>
- Srinivasan, R., Mohankumar, R., Kannappan, A., Karthick Raja, V., Archunan, G., Karutha Pandian, S., Ruckmani, K., & Veera Ravi, A. (2017). Exploring the Anti-quorum Sensing and Antibiofilm Efficacy of Phytol against Serratia marcescens Associated Acute Pyelonephritis Infection in Wistar Rats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 498. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00498>
- Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J., & Poole, K. (1998). Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa: LasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 166(2), 341-345. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13910.x>
- Suzuki, W., Sugawara, M., Miwa, K., & Morikawa, M. (2014). Plant growth-promoting bacterium Acinetobacter calcoaceticus P23 increases the chlorophyll content of the monocot Lemna minor (duckweed) and the dicot Lactuca sativa (lettuce). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 41-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.007>
- Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., & Ichinose, Y. (2010). The Siderophore Pyoverdine of Pseudomonas syringae pv. Tabaci 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 117-126. <https://doi.org/10.1128/JB.00689-09>
- Tejman-Yarden, N., Robinson, A., Davidov, Y., Shulman, A., Varvak, A., Reyes, F., Rahav, G., & Nissan, I. (2019). Delftibactin-A, a Non-ribosomal Peptide With Broad Antimicrobial Activity. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02377>
- Thapa, S., & Prasanna, R. (2018). Prospecting the characteristics and significance of the phyllosphere microbiome. *Annals of Microbiology*, 68(5), 229-245. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1331-5>
- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Liang-tong, Y., & Du, B. (2009). Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200013>
- Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L., Jin, F., & Du, B. (2008). [Screening, identification and antagonistic activity of a siderophore-producing bacteria G-229-21T from rhizosphere of tobacco]. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*, 48(5), 631-637.
- Tiwari, V., Rajeswari, M. R., & Tiwari, M. (2019). Proteomic analysis of iron-regulated membrane proteins identify FhuE receptor as a target to inhibit siderophore-mediated iron acquisition in Acinetobacter baumannii. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 1156-1167. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.173>
- Torres, M. A. (2009). ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum*, 138, 414-429. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01326.x>
- Vallejo Cabrera, F. A. (1999). *Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/51997>
- Vásquez-Ramírez, L., & Castaño-Zapata, J. (2017, julio). Manejo integrado de la marchitez vascular del tomate (Fusarium oxysporum f. Sp. Lycopersici (SACC.) W.C. Snyder & H.N. Hansen): Una Revisión. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262017000200014
- Vélez, J. M. bedoya, Castaño, G., & Agudelo, S. O. (2019). Tolerancia al plomo de aislamientos nativos de Pseudomonas spp. De aguas residuales del Valle de Aburrá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 135-143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.65146>
- Verbon, E., Trapet, P., Stringlis, I., Kruijs, S., Bakker, P., & Pieterse, C. (2017). Iron and Immunity. *Annual review of phytopathology*, 55, 355-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035537>
- Villa Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de Fusarium spp. Y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64, 194-205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>

- Villegas, M. E. D. de, Villa, P., & Frías, A. (2002). Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3-4), 112-117.
- Wang, H., & Ng, T. B. (1999). Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid). *Life Sciences*, 65(9), 849-856. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00083-1](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00083-1)
- Weakland, D. R., Smith, S. N., Bell, B., Tripathi, A., & Mobley, H. L. T. (2020). The Serratia marcescens Siderophore Serratiochelin Is Necessary for Full Virulence during Bloodstream Infection. *Infection and Immunity*, 88(8), e00117-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00117-20>
- Wen, Y., Kim, I. H., Son, J.-S., Lee, B., & Kim, K.-S. (2012). Iron and Quorum Sensing Coordinately Regulate the Expression of Vulnibactin Biosynthesis in *Vibrio vulnificus*. *The Journal of biological chemistry*, 287, 26727-26739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374165>
- Wilson, M. K., Abergel, R. J., Raymond, K. N., Arceneaux, J. E. L., & Byers, B. R. (2006). Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(1), 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.055>
- Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions*, 30, 691-696. <https://doi.org/10.1042/BST0300691>
- Wu, H., & Ling, H.-Q. (2019). FIT-Binding Proteins and Their Functions in the Regulation of Fe Homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 0. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00844>
- Xue, Q.-Y., Chen, Y., Li, S.-M., Chen, L.-F., Ding, G.-C., Guo, D.-W., & Guo, J.-H. (2009). Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48(3), 252-258. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.11.004>
- Yeole, G. J., Kotkar, H. M., Teli, N. P., & Mendki, P. S. (2016). Herbal fungicide to control *Fusarium* wilt in tomato plants. *Biopesticides International*, 12(1), 25-35.
- Yockteng, R., Almeida, A. M. R., Yee, S., Andre, T., Hill, C., & Specht, C. D. (2013). A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analyses. *Applications in Plant Sciences*, 1(12), 1300070. <https://doi.org/10.3732/apps.1300070>
- Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L., Jin, Y., & Qu, J. (2017). Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1500-1512. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05021>
- Yu, Teng, C., Liang, J., Song, T., Dong, L., Bai, X., Jin, Y., & Qu, J. (2017). Characterization of siderophore produced by *Pseudomonas syringae* BAF.1 and its inhibitory effects on spore germination and mycelium morphology of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 55(11), 877-884. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7191-z>
- Yu, X., Ai, C., Xin, L., & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Zhao, L., Xu, Y., & Lai, X. (2018). Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 49(2), 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.007>