



RESIDENCIA PROFESIONAL

**“ESTUDIO FILOGENÉTICO DE BACTERIAS DIAZÓTROFAS AISLADAS DEL
Agave americana L, USANDO EL GEN CROMOSOMAL *rpoB*”**

PRESENTA

Cruz Pérez Néstor Hugo

ASESOR INTERNO:

Dr. Reiner Rincón Rosales

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Diciembre del 2012.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE CUADROS	3
I.- INTRODUCCIÓN	5
II.- JUSTIFICACIÓN	8
III.- OBJETIVOS	10
Objetivo general:.....	10
Objetivos específicos:	10
IV.-MARCO TEÓRICO	11
4.1. Biología del <i>Agave americana</i> L.	11
4.1.1. Características morfológicas del <i>Agave americana</i>	11
4.1.2 – Clasificación taxonómica	13
4.1.3 –Distribución y Hábitat	14
4.2 – Importancia del <i>Agave americana</i>	15
4.3 – El cultivo del <i>Agave americana</i>	17
4.4 – Microorganismos benéficos del suelo	18
4.4.1 – Bacterias fijadoras de nitrógeno	19
4.4.2 – Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)	21
4.4.3 – Microorganismos solubilizadores de fosfatos	23
4.5. Estudio genotípico de bacterias diazótrofes.	24
4.5.1. Genes cromosomales.....	25
4.5.2. Estudio filogenético usando el gen <i>rpoB</i>	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 – Colecta de material biológico.....	27
5.2 – Protocolo de desinfección de las muestras	28
5.3– Aislamiento y cultivo de la bacteria.....	29
5.4 – Caracterización y estudio de cepas bacterianas aisladas del <i>Agave americana</i> L.....	32
5.4.1 –Tinción de Gram.....	32
5.4.2 –Estudio de la colonia.....	32
5.5 – Caracterización genotípica	32

5.5.1 – Extracción de ADN.....	32
5.5.2 – PCR- gen <i>rpoB</i>	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto morfológico de la planta de <i>Agave americana</i>	12
Figura 2. Principales localidades en donde se cultiva el <i>Agave americana</i>	14
Figura 3. Plantas de <i>Agave americana</i> . cultivadas en la parcela experimental.....	27
Figura 4. Raíces de los hijuelos de la planta de <i>Agave americana</i>	29
Figura 5. Tubos con 10 ml de medio NFb inoculados con 500µl de la dilución 10 ⁻⁶ del suelo de la rizosfera.....	30
Figura 6. Caja Petri sembrada con una cepa que absorbió el colorante Rojo Congo.....	31
Figura 7. Cepas conservadas en glicerol	31
Figura 8. Procedimiento para la realización de la tinción de Gram.	32
Figura 9. Programa utilizado para amplificar <i>rpoB</i>	34

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación de localidades con plantaciones de <i>Agave americana</i>	17
Cuadro 2. Ubicación de las parcelas experimentales donde se cultiva el <i>Agave americana</i>	28
Cuadro 3. Componentes del medio NFb	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 4. Mezcla de Reacción para amplificar el gen <i>rpoB</i>	34
Cuadro 5. Número de muestras colectadas y características fisicoquímicas del suelo de las parcelas experimentales en donde se cultiva el <i>Agave americana</i>	36
Cuadro 6. Bacterias representantes de los principales géneros bacterianos aislados del <i>Agave americana</i>	37

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue estudiar y analizar la diversidad de bacterias asociadas al *Agave americana*, una planta de importancia agroindustrial en la región fronteriza del estado de Chiapas, ya que de este agave se obtiene un aguardiente tradicional denominado “Comiteco”. Un total de 120 cepas bacterianas aisladas, tanto del suelo rizosférico, así como de las raíces de las plantas fueron caracterizadas fenotípicamente usando técnicas microscópicas, tinción de Gram y cultivos en medios específicos. La identificación taxonómica de las cepas se realizó mediante un estudio filogenético basado en el gen cromosomal *rpoB*. Con base en el estudio filogenético se logró determinar que la mayor parte de las cepas bacterianas estudiadas están directamente relacionadas con el género *Agrobacterium*. Sin embargo este gen cromosomal reveló la presencia de bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* y *Mesorhizobium* que se caracterizan por su capacidad para fijar nitrógeno. Aunque, la filogenia rizobiana del gen *rpoB* resultó muy limitada, permitió apreciar que este agave puede asociarse con bacterias diazótrofes que presentan potencial para su empleo como biofertilizantes.

Palabras clave: *Agave*, bacterias diazótrofes, fijación de nitrógeno, gen cromosomal

I.- INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso y pluricultural con la mayor variedad de especies de agave conocidas. Se cree, incluso, que el género *Agave* se originó en sus desiertos. Las Agaváceas constituyen un valioso grupo de plantas cuya utilización en México está ligada al desarrollo económico, social y cultural de numerosos grupos étnicos. Las agaváceas son parte importante de su historia y de su cultura; además de emplearse en usos medicinales y ceremoniales, han sido aprovechadas como una fuente de alimento, fibras, bebidas, productos químicos y como plantas de ornato por la simetría de su forma (García-Mendoza, 2007).

Las bebidas que se extraen de plantas del género *Agave*, han alcanzado fama a nivel tanto nacional como internacional. En México, el pulque, es una bebida de larga tradición, obtenida de la fermentación del aguamiel; sin embargo, en la actualidad se ha incrementado el consumo de bebidas que una vez fermentadas se destilan, tal es el caso de los mezcales (García-Mendoza, 1998). Los agaves utilizados para la elaboración o extracción de bebidas, son un recurso natural con un elevado potencial e importancia económica (Valenzuela, 1995). Su uso y aprovechamiento representan una alternativa productiva sustentable a través del desarrollo y aplicación de estrategias productivas basadas en sistemas de manejo agrícola y procesos de producción específicos, para la obtención de productos destinados a un mercado especializado que incluyen tanto taxones silvestres como cultivados (especies, subespecies, variedades).

El cultivo del *Agave americana* se reporta en la Meseta Comiteca de Chiapas desde mediados del siglo XIX (Secretaría de Economía, 2009), como una actividad económica en pequeña escala con una superficie establecida de aproximadamente 50 hectáreas. Actualmente éste cultivo es considerado como una opción promisorio de reconversión productiva para algunos municipios de la región Fronteriza de Chiapas, por lo que diversos actores están promoviendo su explotación a mayor escala.

A la fecha se han establecido varias plantaciones en los municipios de Comitán de Domínguez, Villa Las Rosas y Venustiano Carranza. Sin embargo, en las parcelas se ha observado un lento crecimiento de los hijuelos cuando son trasplantados a condiciones de campo y como consecuencia para obtener plantas adultas con características industriales adecuadas se requiere de un periodo de tiempo de 7 a 10 años.

Es conocido que las plantas dependen de factores abióticos (nutrientes, humedad, pH, etc.) y bióticos (microorganismos asociados a la planta) para lograr su estabilidad, sobrevivencia y crecimiento (Odum y Barrett, 2006). Las plantas establecen asociación con una diversidad de microorganismos con la finalidad de obtener algunos beneficios, como lo es la obtención de nutrientes esenciales (N, P y K) (Franche et al. 2009). Las bacterias del suelo se han utilizado en la producción de cultivos durante décadas. Las principales funciones de estas bacterias son (1) suministrar nutrientes a los cultivos, (2) estimular el crecimiento de las plantas (3) controlar o inhibir la actividad de los patógenos de las plantas, (4) mejorar la estructura del suelo, y (5) la lixiviación microbiana o bioacumulación de sustancias inorgánicas (Hayat et al. 2010). En la rizósfera habitan especies bacterianas, tales como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a una forma orgánica que puede ser empleada por la planta e incorporarlo a su metabolismo básico. Así también, es posible hallar algunos tipos de bacterias y hongos que solubilizan rocas fosfóricas y poner a disposición el fósforo que se requiere para el crecimiento de las plantas. Se ha reportado también, la presencia de bacterias endófitas, que pueden invadir los tejidos y órganos de las plantas y bajo esa condición sintetizar algunos metabolitos y nutrientes que son esenciales para el crecimiento de la planta (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006). Considerando la importancia biológica de los microorganismos, se han realizado trabajos de investigación, encaminados a estudiar la diversidad de las bacterias rizosféricas asociadas a cultivos agrícolas, tales como; maíz (Roesch et al., 2008), banana (Martínez et al., 2003), sorgo (Pacovsky, 1990) y con algunas especies de agave, tales como *Agave tequilana* (Ruiz et al., 2011) para ser empleadas como inoculantes.

El uso de las técnicas moleculares ha permitido una descripción más precisa para una amplia variedad de especies. El análisis de secuencia de genes se ha convertido en uno de los principales criterios para la descripción de varias especies de bacterias asociadas a leguminosas y a otras plantas de importancia agroindustrial. La adopción de herramientas moleculares por los ecólogos microbianos rápidamente ha mejorado nuestro conocimiento de la abundancia de células procariotas, la diversidad, y la función. Algunas herramientas moleculares son ahora de uso común, incluyendo bibliotecas de clones, hibridación fluorescente in situ (FISH), huellas genómicas, electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) y Polimorfismo de longitud de restricción (T-RFLP). Cada uno de

estos métodos mide un aspecto diferente de la comunidad (diversidad, la detección in situ, y la dinámica de la comunidad, respectivamente), pero todos ellos generalmente utilizan un solo gen para diferenciar las unidades operativas taxonómicas (UTO), tales como el gen 16S rRNA (Case et al. 2006). Este gen se ha consolidado como el "estándar de oro", no sólo en la filogenia bacteriana, sino también en los estudios de ecología microbiana. Sin embargo, ninguno de los 16S rRNA basado en métodos moleculares permite una representación exacta de las comunidades microbianas. Además, se ha encontrado que la amplificación del gen muestra múltiples copias heterogéneas dentro de un genoma (Dahllöf et al. 2000). Por este motivo, se están utilizando otros genes que sean más conservados y que permitan determinar con una mayor eficiencia el estatus taxonómico de las bacterias. El gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa, ha sido propuesta como un biomarcador alternativo para el estudio de comunidades microbianas. Este gen se caracteriza por poseer atributos claves parecidos al gen 16S rDNA, es común a todas las bacterias y presenta un mosaico de dominios conservados de secuencias específicas (Dahllöf et al. 2000) y lo más importante, es que el gen *rpoB* existe en una sola copia en genomas bacterianos (Mollet et al. 1997).

El presente reporte contiene los resultados de la caracterización de la diversidad genética de bacterias asociadas al *Agave americana* L. utilizando el gen cromosomal *rpoB* y se da información sobre el papel biológico que juegan estas bacterias en asociación con esta especie de agave de gran importancia agroindustrial.

II.- JUSTIFICACIÓN

En los ecosistemas naturales, los agaves juegan un papel importante debido a que ayudan a mantener la estabilidad de los suelos, brindan refugio a una diversidad de organismos e interaccionan con bacterias benéficas contribuyendo a la fertilidad de los suelos. Así mismo muchas especies de agaves tiene una gran importancia cultural, social y económica, ya que son fuente de medicamentos, alimentos, bebidas, productos químicos y también como plantas de ornato Sin embargo, a pesar de sus valores ecológicos y socioeconómicos, su colecta excesiva y la destrucción de su hábitat están causando la desaparición de muchas especies de agaves. En el estado de Chiapas, México, prospera el *Agave americana*, una especie de gran importancia agroindustrial, debido a que es la fuente de la materia prima para la obtención de una bebida tradicional denominada “Comiteco”. En los últimos años se han establecido plantaciones con la finalidad de lograr su reforestación y posterior aprovechamiento industrial. No obstante, se ha observado que este tipo de agave tiene un lento crecimiento, lo que demanda la necesidad de aplicar fertilizantes químicos. Es conocido que la aplicación constante y durante un largo tiempo de los fertilizantes altera significativamente la estructura fisicoquímica de los suelos provocando que estos pierdan su fertilidad. Por este motivo hoy en día, se buscan nuevas formas para lograr la nutrición de los cultivos. La biofertilización, que consiste en el empleo de microorganismos benéficos es una alternativa de gran eficiencia para mejorar la nutrición de las plantas. El estudio de las bacterias asociadas con plantas de importancia agrícola, ha incrementado recientemente, considerando el potencial de estos microorganismos para su empleo como inoculantes. Una de las principales razones de la búsqueda de especies microbianas como biofertilizantes, es debido a la capacidad de algunas bacterias para fijar N_2 atmosférico; elemento fundamental para mejorar el crecimiento de las plantas. También, se han logrado aislar bacterias que tienen la capacidad de sintetizar reguladores de crecimiento (tales como; auxinas, giberelinas) que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas. A partir de las raíces, tallos y de la rizósfera de las plantas se han aislado una diversidad importante de especies bacterianas.

Por otro lado, para el estudio y análisis de la diversidad de bacterias asociadas a las plantas se emplea un enfoque polifásico, que incluye el estudio microscópico, pruebas fenotípicas, uso de marcadores moleculares, huellas genómicas, prueba de reducción de

acetileno, pruebas con enzimas y las librerías genómicas que usan los sistemas de clonación de genes ribosomales. Los marcadores moleculares son empleados comúnmente para realizar estudios filogenéticos de comunidades bacterianas. El gen cromosomal 16S rDNA ha sido ampliamente utilizado en estudios de diversidad bacteriana en diferentes ambientes naturales o sometidos a intervención humana así como en estudios de filogenia bacteriana. El gen 16S rDNA es un marcador universal relativamente poco afectado por las presiones ambientales además de que posee una función esencial en la síntesis de las proteínas. Sin embargo, el uso de este gene puede presentar ciertas desventajas debido a que es tan conservado que no permite distinguir con precisión entre algunas especies bacterianas además este gene puede ser presente en más de una copia, lo cual dificulta la cuantificación de las especies en comunidades complejas. Recientemente, se ha recomendado el empleo del gen *rpoB* para estudio de la diversidad de bacterias asociadas a plantas. La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos. Con una distribución universal en bacterias, sugirió su aplicación como un cronómetro molecular de alta potencia. El uso de este marcador ofrece algunas ventajas respecto a los marcadores moleculares precedentes, entre ellas, las secuencias del *rpoB* presentan en numerosas ocasiones mayor calidad que las del 16S rADN, al ser secuencias de reciente obtención; también otro factor importante y favorable, es que existe mayor correlación en la similitud de la secuencia del *rpoB* con el criterio de inclusión en la misma especie de la hibridación ADN-ADN (DDH < 70%). Criterio que no fácilmente se cumple para valores de similitudes del 16S ADN superiores al 99%; y por último, otra circunstancia favorable del análisis del *rpoB* es su aplicación como instrumento de genotipificación y de filogenia. Por lo anterior, resulta interesante el estudio de la diversidad de bacterias asociadas con al *Agave americana* empleando este tipo de marcador molecular y determinar aquellos microorganismos con potencial para su empleo como biofertilizante en esta planta, de tal manera que mejore y promueva su rápido crecimiento y desarrollo.

III.- OBJETIVOS

Objetivo general:

Conocer el estatus taxonómico de las bacterias diazótrofes aisladas del *Agave americana* usando como marcador molecular el gen cromosomal *rpoB*.

Objetivos específicos:

- a).- Aislar, cultivar y caracterizar fenotípicamente las cepas bacterianas asociadas al *Agave americana*,
- b).- Caracterizar genotípicamente las cepas bacterianas asociadas al *Agave americana* mediante el uso del gen cromosomal *rpoB*,
- c).- Identificar las especies bacterianas asociadas al *A. americana* mediante un estudio filogenético basado en el gen *rpoB*.

IV.-MARCO TEÓRICO

4.1. Biología del *Agave americana* L.

4.1.1. Características morfológicas del *Agave americana*.

La planta de *Agave americana* se caracteriza por presentar, rosetas hasta 2 m de alto, 2.5-3.0 m de diámetro. Hojas 1.5-2.0 m de largo, 15-25 cm de ancho, lanceoladas a algo espatuladas, erectas o algo recurvadas, acanaladas en el haz, glaucas, superficie ligeramente áspera, margen ondulado a crenado; dientes sobre mamilas, en la parte media de 0.5-1.0 cm de largo, 0.6-1.2 cm de ancho, rectos o recurvados; espina terminal 3.5-4.0 cm de largo. Inflorescencia paniculada, laxa, 6-9 m alto, contorno general ovalado, fértil desde la mitad o el tercio superior, ramas primarias 20-35, 1-1.2 m largo; pedúnculo verde-glaucos, brácteas del pedúnculo 30-60 cm largo, base hasta 10 cm ancho, triangulares, cactáceas, margen entero, espina 1-1.5 mm largo. Flores 6-7.5 cm largo, hipocrateriformes, verde-amarillentas; sépalos 2.5-3.5 cm largo, oblongos, gruesos, tubo del perigonio 1-1.5 cm largo, ovario 2.5-3 cm largo, cuello 2-5 mm; estambres con filamentos 5.5-8.0 cm largo, insertos en la parte media del tubo. Cápsulas 4.0-5.5 cm largo, 2.0-2.5 cm ancho; semillas 9-10 mm largo, 7-8 mm ancho, negras (Fig.1).

Agave americana es una especie polimórfica con numerosas formas cultivadas en varias regiones del mundo (Pritchard et al., 1995) y que han sido seleccionadas y manejadas por el hombre durante miles de años. La variación intraespecífica observada incluye variación en el tamaño de la planta, número y forma de las hojas, disposición de las mismas en el espacio, forma del margen, tamaño de los dientes y tamaño de la espina terminal, sin embargo, podemos reconocerla por la siguiente combinación de caracteres: hojas lanceoladas a algo espatuladas, erectas, recurvadas o reflejas, glaucas, a veces con bandas transversales verdosas, superficie ligeramente áspera al tacto, margen ondulado a crenado, dientes no mayores de un centímetro de largo y espina terminal corta, hasta de 4 cm de largo; flores de 6-7.5 cm de largo, con el ovario más corto que el tubo y los sépalos. Gentry (1982) reconoce una subespecie y ocho variedades.



Figura 1. Aspecto morfológico de la planta de *Agave americana* L.

4.1.2 – Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Liliales
Familia:	Agavaceae
Genero:	Agave
Especie:	<i>Agave americana</i>

Nombre Científico: *Agave americana* L.

Nombre común: Algunos de los nombres son “agave”, “pita”, “maguey”, “cabuya”, “fique” y en el estado de Chiapas es conocido como “agave comiteco”.

4.1.3 –Distribución y Hábitat

La familia Agavaceae es endémica de América (Arizaga y Ezcurra, 1995). Se distribuye desde el sur de los Estados Unidos de América a Colombia y Venezuela, está conformada por nueve géneros y 340 especies (García-Mendoza, 2011). El centro de mayor riqueza y diversidad se encuentra en México donde se distribuyen 261 especies (75% del total) con 177 endémicas (70%) (García-Mendoza, 2004; Eguiarte et al., 2000). El género más grande y diverso es *Agave* con 159 especies, 119 endémicas de México, cifra que representa el 74% (García-Mendoza, 2011). En Chiapas, la especie *Agave americana* se localiza principalmente en los municipios de Venustiano Carranza, Comitán de Domínguez y Las Rosas (Figura 2).

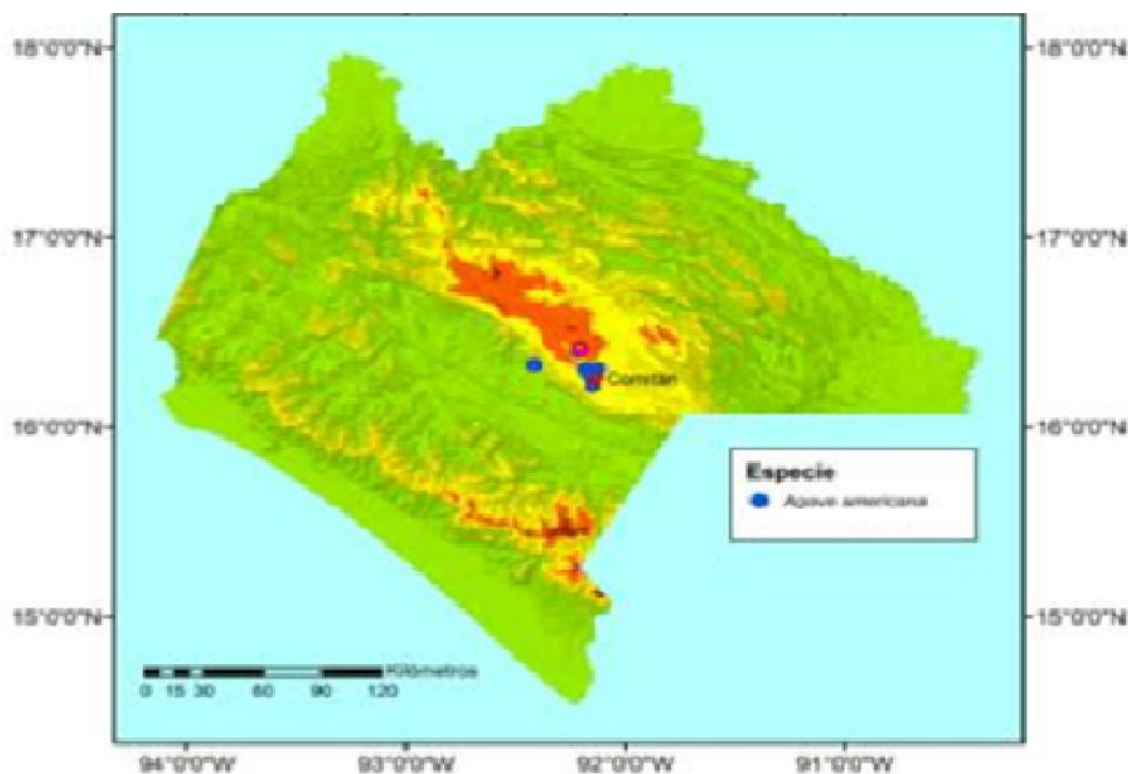


Figura 2. Principales localidades en donde se cultiva el *Agave americana* L.

Agave americana L. es comúnmente cultivada como ornamental en pueblos y ciudades de México. En Chiapas crece preferentemente en altitudes entre los 1,000 y 1,860 msnm. En general, se observa que las plantas prosperan en laderas de roca caliza, sitios inclinados y terrenos con pendiente suave, en lugares abiertos, rocosos y en suelos pedregosos. En los alrededores donde se cultiva se puede observar vegetación secundaria derivada de la selva baja caducifolia y sólo en la localidad de San José de las Rosas la vegetación circundante consiste de bosque de *Pinus-Quercus*. La especie *A. americana*, son plantas siempre verdes cuyas características morfológicas y fisiológicas les confieren una notable capacidad de adaptación a los ambientes más hostiles. Es precisamente en estos ambientes donde se desarrollan y multiplican fácilmente, proporcionando una productividad más alta que muchas de las plantas cultivadas utilizadas actualmente.

4.2 – Importancia del *Agave americana*

Desde la época prehispánica los agaves han sido usados por los seres humanos y continúan siendo ampliamente utilizados como fuentes de alimento, bebidas, materiales de construcción y medicinas naturales (Arizaga y Ecurra, 2002). Gentry (1982) afirma que el cultivo de diferentes especies de *Agave* (maguey) para la producción de pulque se desarrolló con las civilizaciones mesoamericanas. Un desarrollo mucho más reciente, especialmente en los últimos dos siglos, es la producción de licor destilado como el mezcal y el tequila (Mc Vaugh, 1989). De acuerdo con Gómez-Pompa (1963) se puede decir con certeza que no existe ningún otro grupo de plantas silvestres de México que haya tenido tantas modalidades de utilización como los magueyes. El maguey también ha sido utilizado para la fabricación de fibras. Se ha encontrado que en diferentes pueblos se utiliza la fibra de *Agave* para fabricar cordones, redes, bolsas, cestas, tapetes, cobertores, ropa, sandalias, trenzas, cepillos de cabeza, brochas de pintura, hilo de coser, hilo para pescar, instrumentos musicales, entre otros. (Gentry, 1982) las flores del *Agave* se utilizan como alimento, éstas se recolectan de plantas silvestres ò cultivadas. Con las pencas se preparan específicamente ungüentos ò cataplasmas para curar comezones, golpes, moretones y heridas.

Para el caso de la planta de *Agave americana* se ha reportado que esta especie es utilizada para la producción del aguardiente denominado “comiteco” que se obtiene del aguamiel de esta planta. Así también es fuente importante de fructanos, -compuestos carbohidratos que pueden ser empleadas como prebióticos. El agave también se utiliza como una alternativa del azúcar porque contiene fructuosa al 90%, y un índice glucémico bajo. También se obtienen precursores hormonales de esteroides a partir de sus hojas. Las saponinas identificadas en este tipo de agave sirven como producto de partida para sintetizar cortisona y hormonas sexuales para producir anticonceptivos.

Reportes indican la presencia de los siguientes compuestos: hecogenina, clorogenina, agave saponina C, glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, gitogenina, rockogenina, mannogenina, agavosidos A-E, agavasaponinas, saponina G, mevalonato Kinasa, aminopeptidasa, lisina, leucina, isoleucina y sucrosa; obtenidos del análisis realizados en hojas, flores, escapo y tallo (Correa y Bernal, 1989).

El pulque que se prepara a partir de las especies de agave es un alimento que se ha estudiado de manera intensiva por su potencial nutritivo entre los habitantes indígenas de la región, lo que también constituye un ejemplo de cómo las estrategias locales con base en la alimentación pueden usarse para asegurar la nutrición de micronutrientes. Las estrategias alimenticias tradicionales pueden utilizarse no sólo para aliviar la desnutrición, sino también para desarrollar programas de importancia local que impulsen la transición nutritiva y la prevención de enfermedades crónicas.

Debido a la importancia que agroindustrial que representa el *Agave americana*, la empresa “Comiteco Balun Canan” ha iniciado un programa para el rescate, cultivo y aprovechamiento de este agave para la producción de la bebida “comiteco” y lograr la denominación de origen y el reconocimiento internacional de este aguardiente.

4.3 – El cultivo del *Agave americana*

Esta planta se desarrolla mejor, tanto a nivel individual como poblacional, sobre planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias y pH de neutro a ligeramente alcalino. Puede encontrarse lo mismo en sitios con altitudes desde 600 msnm hasta los 2500 msnm. Los cultivos de *A. americana* se encuentran distribuidos entre los 16° de Latitud N y 92° longitud Oeste, que corresponde a la región Fronteriza de Chiapas. Esta región se caracteriza por presentar un clima templado y una temperatura media que oscila entre los 18-25°C y una precipitación anual entre 600 a 1800 mm. La asimilación del CO₂ es favorecida por temperaturas diurnas de 22 a 25°C y nocturnas de 14 a 16°C; y disminuye drásticamente en ambientes donde la temperatura diurna del aire sea mayor de 28°C y nocturna mayor de 20°C. En el cuadro No. 1, se presentan las principales localidades con plantaciones de *A. americana* en Chiapas, con la finalidad de lograr su reforestación y aprovechamiento agroindustrial.

Cuadro 1. Ubicación de localidades con plantaciones de *Agave americana* L.

Localidad	Municipio	Latitud norte	Longitud oeste	Altitud (msnm)
Agua Bendita	Venustiano Carranza	16°14'28.4''	92°25'30.5''	632
Chacajolcom	Comitán	16°18'17.59''	92°11'08.56''	1820
Ejido Las Flores	Comitán	16°13'19.4''	92°08'54.5''	1715
Los Riegos	Comitán	16°18'21.1''	92°07'29.5''	1605
NE de la Ciudad de Comitán	Comitán	16°15'40.7''	92°08'11.5''	1643
San José de Las Rosas	Comitán	16°23'58.2''	92°12'46.6''	2251
Tuilaito Punta de Diamante	Comitán	16°16'24.0''	92°09'56.1''	1858
Yalpalé	Las Rosas	16°19'40.6''	92°24'36.5''	1010

Los agaves se adaptan a diversos tipos de suelo, sin embargo, bajo manejo comercial prosperan mejor en suelos de textura media, denominados suelos francos, franco-arenosos o franco-arcillosos (Ruíz, 2007). Aunque en zonas con baja precipitación, los agaves prefieren suelos con mayor retención de humedad, es decir suelos de textura pesada, como arcillosos o limo-arcillosos, pero pueden desarrollarse adecuadamente en suelos delgados o profundos. Además, el género *Agave* presenta tolerancia de ligera a intermedia a sales y prospera mejor en un rango de pH de 6.0 a 8.0; no son recomendables suelos con problemas de acidez o alcalinidad para su cultivo (FAO Citado por Ruiz, 2007).

La capacidad de almacenar agua por unidad de área de transpiración, como un proceso de desarrollo es un aspecto crucial de la sobrevivencia a la sequía de la plántula. Conforme las plántulas desarrollan más volumen por unidad de área superficial pueden sobrevivir a periodos más largos de sequía (North y Nobel, 1997; Martínez-Salvador *et al.*, 2005). Las respuestas estomáticas al CO₂, difieren entre las plántulas y los adultos. Las estomas permanecen más tiempo cerrado en las plántulas que los adultos, esta disminución en la entrada de CO₂ ayuda también a la conservación de agua (Nobel, 1976; Idso *et al.*, 1986)

4.4 – Microorganismos benéficos del suelo

Una multitud de diferentes especies de microorganismos están presentes en muchos suelos. La rizósfera del suelo se define como el volumen del suelo adyacente y está influenciada por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana (Westover *et al.*, 1997). La rizósfera es un ambiente que la planta misma ayuda a crear y donde los microorganismos patógenos y benéficos constituyen una fuerte influencia sobre la salud y crecimiento de las plantas. El grupo de microorganismos y otros agentes que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos (Johansson *et al.*, 2004).

En la rizósfera hay expresión de relaciones simbióticas mutualistas entre microorganismos y plantas, debido a la exudación de nutrientes orgánicos útiles para el metabolismo microbiano, a la vez, participan en numerosos beneficios, como: influencia en el crecimiento radical, regulación de la actividad metabólica de la raíz e influencia en las propiedades físicas y químicas del suelo, así como de los contaminantes (González-Chávez, 2005).

4.4.1 – Bacterias fijadoras de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno representa, una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. Por su capacidad de fijar nitrógeno, las bacterias fijadoras de nitrógeno se consideran como candidatos de biofertilizante, que se producen en varios países del mundo. Sólo ciertos procariotas poseen el aparato enzimático necesario para reducir el nitrógeno molecular. Este proceso requiere un gasto energético elevado. Los microorganismos implicados pueden obtener los compuestos orgánicos necesarios para conseguir energía, directamente del sustrato sobre el que se desarrollan (fijación libre), o bien colonizar raíces de ciertas plantas que les suministran compuestos orgánicos que utilizan como fuente energética. De esta forma se establece una relación simbiótica, ya que parte del nitrógeno fijado es asimilado por la planta, que lo integra en su metabolismo (fijación simbiótica).

Las implicaciones de ambos sistemas de fijación de nitrógeno son decisivas en lo que se refiere a su efecto sobre la producción primaria, sin embargo los mecanismos por los que el nitrógeno fijado queda a disposición de las plantas son muy distintos, así como el rendimiento energético del proceso y los factores que regulan el flujo de energía que se establece en cada caso. Por esta razón pasamos a considerar los procesos por separado.

4.4.1 .1 Fijación libre del nitrógeno (FLN)

Blackburn (1983) apunta a los microorganismos fijadores libres fotosintéticos como los reductores más eficaces, sin embargo, como quiera que la energía solar incide escasamente sobre la productividad del suelo, la mayoría de los fijadores libres, a nivel edáfico son microorganismos heterótrofos (Evans y Burris, 1992) que se ven obligados a competir por su sustrato con el resto de los microorganismos heterótrofos, y su actividad dependerá en gran parte del éxito en la competencia por el sustrato (Hill, 1992).

El grupo funcional de los fijadores libres de nitrógeno atmosférico está formado por numerosos microorganismos, entre ellos podemos citar las cianofíceas (Haselkorn y Buikema, 1992); bacterias aerobias y microaerobias heterótrofas, como *Azotobacter* spp. y *Azospirillum* spp. respectivamente (Evans y Burris, 1992) o *Beijerinckia* spp. y *Derxia* spp. (Boddey y Dobereiner, 1995); bacterias quimioautótrofas, incluyendo aquellas que oxidan metano (Dalton y Chatfield, 1985) y azufre (Mackintosh, 1978) y las que utilizan H₂ como fuente de energía para el crecimiento autótrofo (Berndt *et al.*, 1976); bacterias anaerobias facultativas como las del género *Klebsiella* y *Enterobacter*, que requieren compuestos nitrogenados para crecer bajo condiciones aerobias pero fijan nitrógeno en anaerobiosis (Aho *et al.*, 1976); bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* (Line y Loutit, 1971) y *Pseudomonas*, que son probablemente los géneros más abundantes en la rizosfera (Acero *et al.*, 1994; Puente y Bashan, 1994); y por último, bacterias anaerobias estrictas, siendo el género *Clostridium* el más importante (Rosenblum y Wilson, 1948; Flather y Beauchamp, 1992).

4.4.1.2 Factores que afectan a la fijación libre de nitrógeno y microorganismos implicados en el proceso

La presencia en el suelo de nitrógeno inorgánico inhibe la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Kitoh y Shiomi, 1991; Roper *et al.*, 1994). Por el contrario, las condiciones que inducen la inmovilización del nitrógeno estimulan la actividad nitrogenasa en el suelo (Roper *et al.*, 1994). Rao (1976) y Sawicka (1982, 1983), indican que la adición de pequeñas cantidades de nitrógeno junto con carbono orgánico incrementa la fijación libre de nitrógeno de estos suelos.

Las bacterias de fijación libre de nitrógeno están estimuladas y su actividad nitrogenasa aumenta en presencia de altos niveles de materia orgánica en el suelo. La rizósfera es una zona con elevada concentración de compuestos orgánicos fácilmente degradables debido a la exudación radical, razón por la cual las bacterias fijadoras libres encuentran en la rizósfera un lugar muy apropiado para fijar nitrógeno (Glick, 1995).

Distintas plantas creciendo en el mismo suelo y bajo las mismas condiciones climáticas poseen distintas tasas de fijación en su rizósfera (Sawicka, 1983). Estas diferencias se deben a la composición específica de los exudados de cada planta (Rovira, 1956). La adición de compuestos no nitrogenados exudados por las raíces, confiere a este tipo de bacterias ventajas competitivas sobre el resto de los heterótrofos de la rizósfera, así como la liberación de diversas vitaminas, como tiamina, que aumenta de forma considerable el número de bacterias diazótropas en la rizósfera (Azaizeh *et al.*, 1995).

Dado el efecto de la naturaleza y cantidad de carbono orgánico disponible sobre la fijación libre de nitrógeno (Alexander y Zuberer, 1989), cierto tipo de manejo, como el aporte de restos vegetales de leguminosas al suelo aumenta los niveles de fijación al proporcionar niveles más altos de carbono lábil a las bacterias fijadoras (Wander *et al.*, 1994). Esta etapa del ciclo es especialmente sensible a la presencia de metales pesados en el suelo, por lo que se han propuesto como indicadores biológicos de la toxicidad de estos elementos (Lorenz *et al.*, 1992). Sin embargo, las bacterias fijadoras heterótrofas y anaerobias, en presencia de metales pesados, son capaces de fijar en un amplio rango de condiciones de alcalinidad y acidez del suelo (Paul y Clark, 1989), y además su actividad nitrogenasa es normalmente mayor que la de aquellas que crecen en condiciones aerobias (Jones, 1977).

4.4.2 – Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia (suelo rizosférico) son denominadas “rizobacterias” (Kloepper, 1994 y 1996). Las Rizobacterias beneficiosas conocidas en la literatura con el acrónimo PGPR (del inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) desempeñan funciones claves para la planta tales como: control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o de Inducción de Resistencia Sistémica (Van Loon *et al.*, 1998), incremento de la biodisponibilidad de elementos minerales y la fitoestimulación al propiciar la emergencia o el enraizamiento. La fitoestimulación provocada por la inoculación de PGPR ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos se basa en la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citoquininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, lo que incrementa a su vez la

capacidad de absorción de agua y nutrientes y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como la sequía.

Las PGPR deben cumplir tres características intrínsecas: ser capaces de colonizar la raíz y/o su zona de influencia; sobrevivir y multiplicarse en los micro-hábitat asociados a la superficie de la raíz donde compiten con la microbiota natural, al menos el tiempo suficiente para ejercer de forma efectiva su actividad promotora del crecimiento y estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1994).

En el proceso de colonización de la raíz o rizósfera la bacteria es atraída por quimiotaxis basada en compuestos presentes en los exudados radicales, para posteriormente unirse a la superficie radical. Algunas bacterias como por ejemplo *Azospirillum* sp., pueden incluso llegar a penetrar en la raíz y colonizar los espacios intercelulares, aunque no forman estructuras especializadas como ocurre en el caso de la asociación *Rhizobium*-Leguminosa. Dentro de este grupo se encuentran especies pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Xanthomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Kloepper *et al.*, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Okon & Lavandera, 1994; Tang, 1994; Barea *et al.*, 2004).

En resumen, se acepta que las PGPR pueden afectar al crecimiento de las plantas, bien de forma directa mediante el suministro de determinados compuestos a las planta, o facilitando la captación de nutrientes solubles del suelo (como hace *Azospirillum* spp.), o bien pueden actuar de forma indirecta evitando los efectos deletéreos de uno o más organismos fitopatógenos (fundamentalmente *Pseudomonas* spp.), de ahí que actualmente se tienda a clasificar o dividir a las PGPR en dos grupos: “PGPB” (del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”) y “Biocontrol-PGPB” (Bashan & Holguin, 1998; Cattelan *et al.*, 1999). El cambio del término “PGPR” por “PGPB” se debe a que muchas bacterias que ejercen efectos beneficiosos sobre la planta no son buenas colonizadoras. Bashan & Levanony (1990) defienden la actuación conjunta de diversos mecanismos, siendo los mecanismos individuales menos importantes que si operan de manera conjunta.

En lo referente a los efectos indirectos son de destacar los basados en la producción de antibióticos y cianuros de hidrógeno (HCN) que generan un decrecimiento en la población de fitopatógenos (Zahir, 2004). La producción de sideróforos es la base de otra actividad de las PGPR ya que estos metabolitos que actúan mediante dos mecanismos: la captación de hierro que puede beneficiar directamente a la planta aumentando la disponibilidad del elemento o indirectamente como agente patógeno para otros microorganismos o plagas por cumplir esta misma labor.

La conjunción de todos los mecanismos de acción ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, un incremento en la emergencia, el vigor y el peso de plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento hasta de 30% en la producción de cultivos de interés comercial (Jiménez, 2001).

4.4.3 – Microorganismos solubilizadores de fosfatos

El fósforo después del nitrógeno, es el nutriente inorgánico más requerido por plantas y microorganismos, y en suelo es el factor limitante del desarrollo vegetal a pesar de ser abundante tanto en formas inorgánicas como orgánicas. No es posible capturarlo biológicamente del aire como ocurre con el nitrógeno (Alexander, 1980; Nautiyal, 1999). Las concentraciones de fósforo en las soluciones del suelo son pequeñas, desde 0.01 a 0.3 mg P·L⁻¹ (Ozanne, 1980). La solución del fósforo en el suelo solamente es adecuada si el fósforo inorgánico lábil es solubilizado al menos tan rápidamente como las raíces pueden extraerlo del suelo (Russell, 1980). Cuando las plantas toman fósforo de la solución del suelo, el fósforo utilizado, es repuesto a partir de las formas lábiles y moderadamente lábiles de fósforo inorgánico. Cuando estas fuentes están agotadas entonces la fuente de fósforo no lábil es el factor que determina la concentración de fósforo soluble en el suelo (Stewart & Sharpley, 1987). La concentración de fósforo asimilable es muy baja, normalmente en niveles que varían entre 5 y 30 mg·kg⁻¹. Estos índices bajos del nutriente se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, el hierro o el aluminio que provocan su precipitación o fijación, disminuyendo su disponibilidad para las plantas. Los fosfatos inorgánicos aplicados

como fertilizantes químicos también son inmovilizados en el suelo y como consecuencia no son solubles para ser aprovechados por los cultivos (Alexander, 1980; Atlas, 2002).

La disponibilidad del fósforo inorgánico depende de diferentes factores como: los fluidos y minerales presentes en el suelo, el pH, la actividad microbiológica, la presencia de enzimas y ácidos orgánicos, y la intensidad de la demanda del nutriente. Los agentes de origen biológico son posibles de manejar y prácticamente tienden a mantener el fósforo en sus estados de mayor disponibilidad, incrementando y manteniendo altas tasas de mineralización e inmovilización. Por lo tanto, los microorganismos son fundamentales para asegurar un mejor y mayor uso del fósforo en el suelo.

El mantenimiento de altas tasas de nutrientes limitantes es un desafío grande para los agricultores, quienes se ven obligados a implementar técnicas, que en algunas ocasiones, no resultan muy benéficas para el mismo suelo (Azcón & Barea, 1997, Atlas, 2002; Nautiyal *et al.*, 2000). El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que como resultado genera un incremento en el rendimiento de cosechas ya que cambia las formas insolubles del fosforo en el suelo en formas solubles (Chen *et al.*, 2006)

4.5. Estudio genotípico de bacterias diazótrofes.

Las herramientas moleculares y genéticas han mejorado el estudio de la diversidad de microorganismos obtenidos de diversas muestras ambientales. La amplificación de genes cromosomales, el estudio de perfil de plásmidos, huellas genómicas, la generación de librerías de clonas, así como la hibridación ADN-ADN sin duda alguna han potencializado la identificación y el estudio genotípico de bacterias. Las secuencias consenso ERIC y REP han sido ampliamente usadas en los estudios de ecología, genéticos y taxonómicos, así como también para la identificación de cepas de rizobia (Mostazo *et al.*, 2002). Por otro lado, Lloret *et al.* (2007) reportaron que los genes *gyrA*, *nolR*, *recA*, *rpoB*, *rrs* y *ssb*, fueron útiles para identificar nuevas especies bacterianas asociadas con leguminosas en México.

4.5.1. Genes cromosomales

Los marcadores moleculares, tales como el gen ADNr 16S, han sido extensivamente aplicados para detectar, identificar y medir la diversidad microbiana de muestras ambientales. La amplificación del gen (ADNr)16S, en combinación con otros métodos moleculares que generan huellas genómicas han sido y es comúnmente usado para análisis de comunidades bacterianas (Rosado et al. 1997). El ARN ribosómico (ADNr)16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de la década de 1970. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana. El ADNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 *nt*, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Dado que los ARNr 16S y 18S proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, *small subunit*) se utiliza para ambos.

Otros genes cromosomales, como *recA* y *atpD* son usados en estudios taxonómicos y evolutivos. Por lo tanto, mediante éste estudio se comprobó la fortaleza y el fundamento de ésta estrategia para construir filogenias a partir de estos genes housekeeping (Gaunt et al. 2001). Gaunt et al. (2001) comprobaron la fortaleza y el fundamento del uso de estos genes para construir filogenias. Estos autores mediante comparación de secuencias de los genes del ARNr, 16S, *recA* y *atpD* realizaron un estudio de filogenia con 25 cepas de bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium*, *Mycoplasma* y *Brevundimms*. A su vez, la asignación de bacterias a los actuales géneros *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* ha sido posible debido al estudio de los genes antes mencionados.

Para estudiar la diversidad de una población de *R. gallicum*, Vinuesa et al. (2005) usaron un conjunto de marcadores moleculares que incluyeron las secuencias parciales de tres genes cromosomales *rrs* (gen del ARN, 16S), *glnII* (gen de la glutamina sintetasa II) y *atpD* (gen que codifica la subunidad beta de la ATP sintetasa), y dos genes simbióticos *nifH* y *nodB*, para mostrar que los dos grupos genéticos estudiados corresponden a dos especies previamente descritas. De esta manera mostraron que tanto el análisis filogenético, como los de genética molecular sirven para tener una mejor perspectiva sobre una determinada población bacteriana y ubicarla en un contexto filogenético. Los genes cromosomales *rrs*, *glnII* (provee de glutamina para biosíntesis e interviene en la asimilación de amonio) y *atpD* son indispensables para el mantenimiento celular y los genes ligados al plásmido simbiótico *nifH* y *nodB*, están involucrados en la interacción simbiótica de las plantas.

Los análisis de poblaciones basadas en la secuencias de los genes *glnII* y *atpD* sirven para conocer el patrón filogenético de las poblaciones bacterianas, Si estos patrones no muestran una diferencia significativa, la población en estudio, se les considera como una misma población.

Aunque el gen del ARNr de 16S es el marcador genético más utilizado, cada vez queda más claro que por su frecuencia de recombinación y número variable de copias por genoma, no es el locus más adecuado para estudios filogenéticos y ecológicos. Se propone entonces analizar genes conservados que codifican para proteínas, ya que contienen mayor información y existen más herramientas para analizar sus procesos de evolución molecular.

4.5.2. Estudio filogenético usando el gen *rpoB*

El gen *rpoB* que codifica para la subunidad beta de la ARN polimerasa, ha sido propuesta como un biomarcador alternativo para el estudio de comunidades microbianas. Este gen se caracteriza por poseer atributos claves parecidos al gen 16S rDNA, en que es común a todas las bacterias y presenta un mosaico de dominios conservados de secuencias específicas (Dahllöf et al. 2000) y lo más importante, el gen *rpoB* existe en una sola copia en genomas bacterianos (Mollet et al. 1997).

Entre los genes universales que pueden ser usados para el análisis taxonómico e identificación, el gen *rpoB* ha sido usado para estudiar varios géneros bacterianos, incluyendo *Bartonella* spp., *Staphylococcus* spp., miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Bosea* spp. y *Afipia* spp., *Mycobacterium* spp., y *Legionella* spp.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 – Colecta de material biológico

Las muestras fueron obtenidas a partir de hijuelos (plántulas jóvenes) que crecen en parcelas experimentales (Figura 3), ubicadas en el municipio de Comitán Domínguez.



Figura 3. Plantas de *Agave americana* cultivadas en la parcela experimental.

Se colectaron muestras de suelo rizosférico y de raíces de los hijuelos de aprox. 6 meses de edad y las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico y transportadas a los laboratorios de investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, en un hielera portátil y posteriormente se almacenaron a 4 °C en un congelador. La ubicación geográfica de las parcelas en donde se llevó a cabo la colecta se presenta en el Cuadro 2. Durante las

colectas se obtuvieron muestras de suelo con la finalidad de determinar las características fisicoquímicas. Así mismo se registro datos relacionados con las características climatológicas y edáficas, así también se registro el tipo de vegetación del lugar.

Cuadro 2. Ubicación de las parcelas experimentales donde se cultiva el *Agave americana*.

Parcelas experimentales	Ubicación geográfica			Tipo de vegetación	Características del suelo
	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)		
Tuilaito	16° 16'.513	92° 10'.05	1832 msnm	Bosque pino- encino perturbado	Pedregoso, poca humedad, color negro
Las Flores	16° 13'.465	92° 08'.668	1832 msnm	Pastizales secundarios	Pedregoso, poca humedad, color negro

5.2 – Protocolo de desinfección de las muestras

Muestras de raíces: Las raíces de los hijuelos se seleccionaron y se desinfectaron, inicialmente para la extracción de la raíz del suelo, se suavizo el suelo con ayuda del agua consecutivamente se seleccionaron las raíces y se cortaron en trozos de aproximadamente de 1 a 2 cm (Figura 4). Los trozos de raíz se colocaron en una caja Petri con etanol al 70% por 5 min, posteriormente se trato con hipoclorito de sodio (NaClO) al 6.25% durante 10 min, después se realizo varios lavados con agua destilada estéril y en seguida tres lavados con sulfato de magnesio (MgSO₄) al 0.1M. Las raíces desinfectadas fueron molidas y se tomaron alícuotas las cuales se inocularon en tubos que contenía 10 ml de medio semisólido NFB.



Figura 4. Raíces de los hijuelos de la planta de *Agave americana* L.

Muestras de suelo rizosférico: A partir de 10 g del suelo de la rizosfera del *Agave americana* L., fueron macerados y diluidos a 100 ml en PBS (Bashan, 1993). Se realizaron diluciones hasta 10^{-6} , y a partir de este último se tomó 500 μ l y se inocularon en tubos que contenía 10 ml de medio semisólido NFB incubándolo a 28°C por 5 días.

5.3– Aislamiento y cultivo de la bacteria

Después de realizar esterilización parcial a segmentos de raíz de los hijuelos al igual que las diluciones del suelo, se sembraron en tubos de (16X150) mm, el cual contenía 10 ml de medio semisólido libre de nitrógeno (NFB) (Cuadro 3), se incubaron de 24 a 48 h a 35°C.

Cuadro 3. Componentes del medio NFB

INGREDIENTES	1 L
Acido Málico	5 g
K ₂ HPO ₄ 10%	5 ml
MgSO ₄ 7H ₂ O 10%	2 ml
NaCl 10%	1 ml
FeSO ₄	40 mg
NaMoO ₄ 7H ₂ O 0.1%	2 ml
MnSO ₄ 1%	1 ml
KOH	4.8 mg
NH ₄ Cl	200 mg
Extracto de levadura	0.3 g
Agua destilada	1000 ml

Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron los tubos que presentaban la aparición de una película blanca de entre 2 y 10 mm y aquellos que hicieron virar el medio del color verde al azul (Figura 5). Posteriormente se tomó una parte de la película blanca con un asa y se sembró con estría cruzada en el medio NFb, incubándola a 28°C por 5 días, después se tomaron aquellas cepas que viraron el medio al color azul y aquellas que crecieron de color blanco, se tomó una de cada caja y se realizaron en el mismo medio de dos a tres veces posteriormente se sembraron por estría cruzada en el medio Rojo Congo, para distinguir entre rizobias y otras bacterias (Rodríguez, 1982) las cuales se incubaron a 28°C por 72 h. Las cepas que se obtengan se resembraron de dos a tres veces más para asegurar que crecieron cepas puras y se comprobó cada una de ellas con la tinción de Gram.



Figura 5. Aspecto de los tubos con medio NFb inoculados con 500µl de la dilución 10^{-6} de suelo rizosférico.

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de bacterias de vida libre, promotoras de crecimiento es el medio adicionado con el colorante Rojo Congo, las bacterias del género *Azospirillum* (Bashan *et al.*, 1985) toman un color rojo escarlata que permite la diferenciación de otros géneros bacterianos, tomando esta característica en su forma de crecimiento se aislaron todas las bacterias que absorbían el colorante Rojo Congo (Figura 6). Las cepas resembradas en este medio se incubaron a 28°C por 48 h posteriormente se comprobó la pureza de cada caja Petri empleando la tinción de Gram.

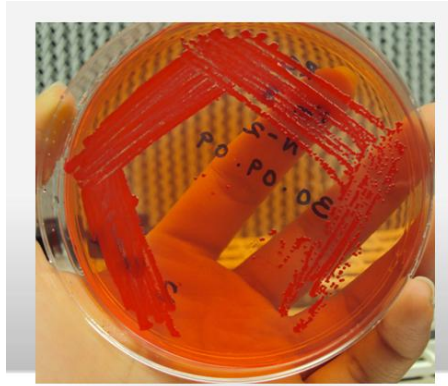


Figura 6. Caja Petri sembrada con una cepa bacteriana que absorbió el colorante Rojo Congo.

Después de haber comprobado que las cepas estaban puras se procedió a conservarlas en tubos eppendorf de 1.5 ml el cual contenía 800 μ l de medio Rojo Congo-glicerol al 60% (Figura 7), cada tubo se saturo con las colonias crecidas en cajas petri de Rojo Congo y guardadas a -20°C .

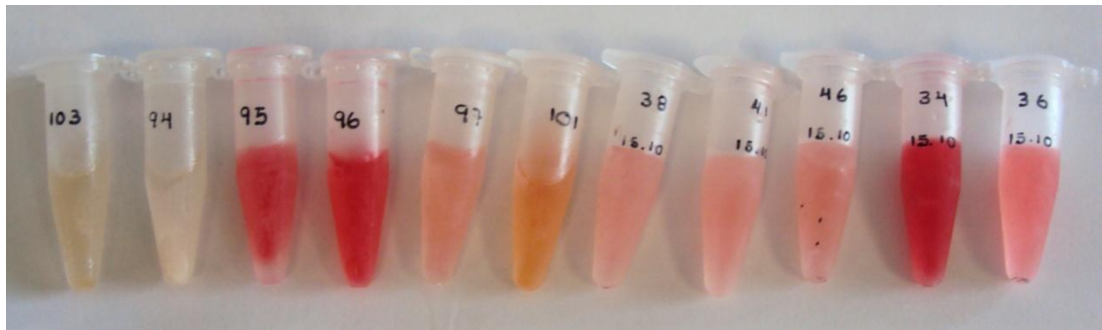


Figura 7. Cepas conservadas en glicerol

5.4 – Caracterización y estudio de cepas bacterianas aisladas del *Agave americana* L.

5.4.1 – Tinción de Gram

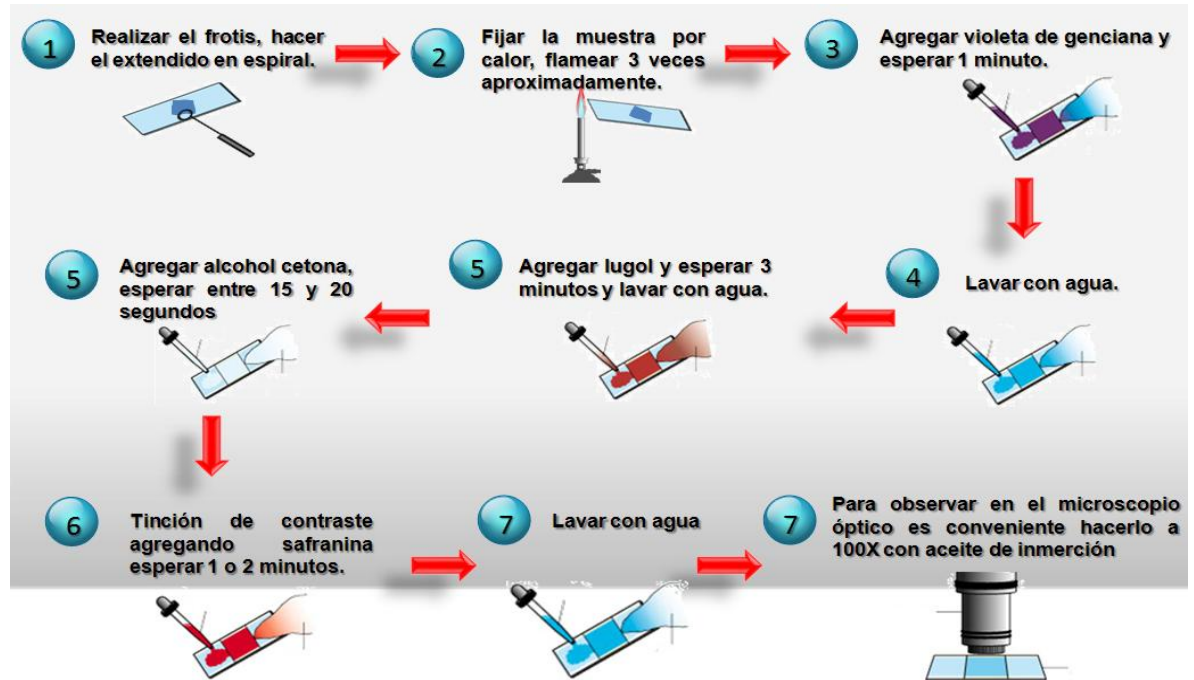


Figura 8. Procedimiento para la realización de la tinción de Gram.

5.4.2 – Estudio de la colonia

Con base en la nomenclatura bacteriana (Bergey's Manual), se realizó un estudio de la morfología de las colonias crecidas en el medio de cultivo Rojo Congo, con la ayuda de un microscopio estereoscópico Marca Micapsa, K6. Especialmente, se considero el aspecto, tamaño y color.

5.5 – Caracterización genotípica

5.5.1 – Extracción de ADN

El ADN total fue extraído usando el kit de la marca Roche™ “DNA Isolation Kit for Cells and Tissues”, se tomaron alícuotas de 30 μ l de las cepas diluidas en RC-glicerol, las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos para remover todo el medio RC-glicerol de las células y obtener un pellet de éstas en el fondo, a continuación se les agregó 150 μ l de buffer de lisis, las células fueron resuspendidas con agitación suave y se agregó 10 μ l

de proteinasa K diluida (1/100), las muestras fueron vortexeadas por 3 segundos, para luego ser incubadas a 65°C por 45 minutos, posteriormente se adiciono a cada una 5µl de RNAsa en solución (10mg/ml), nuevamente las muestras se mezclaron con ayuda de un vortex por 3 segundos. Se incubaron a 37°C por 30 minutos, se les agregó 60µl de solución para precipitación de proteínas y se mezcló por 10 segundos. Las muestras fueron incubadas en hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos a 25°C, cuidadosamente fueron pipeteados los sobrenadantes de cada muestra y se pasaron a tubos de 0.6 ml nuevos estériles. Posteriormente se adicionaron 158µl de isopropanol a cada muestra, para ser mezcladas suavemente. Se centrifugaron por 10 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante fue descartado, de esta forma se obtuvo una pastilla de ADN en los tubos y se les agregó 200 µl de etanol al 70% para lavar el ADN de cada muestra y se mezclaron por vortex, estas muestras nuevamente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos y el etanol se desechó dejando únicamente la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Estas pastillas fueron secadas dejando destapado el tubo por 30 minutos, el ADN así obtenido de cada muestra fue resuspendido con 30µl de la solución hidratadora y se incubaron a 55°C por 5. Las muestras se corrieron en un gel de electroforesis al 1% para comprobar la calidad de la extracción y posteriormente fueron guardadas a -20°C para su posterior uso.

5.5.2 – PCR- *gen rpoB*

Se amplificó el gen *rpoB* ADNr (Weisburg *et al.*, 1991), a partir del ADN total extraído de las cepas, usando los primers Br3200F y Br3950R (Weisburg *et al.*, 1991), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Se preparó la siguiente mezcla de reacción que se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Mezcla de Reacción para amplificar el gen *rpoB*.

Reactivo	1 Tubo (10µL)
Buffer 10X	1
DMSO 10%	1
MgCl ₂	0.4
dNTP's	0.08
Oligo 1	0.2
Oligo 2	0.2
Enzima Taq	0.04
ADN	0.5
Agua MiliQ	6.68

Posteriormente se amplificó el gen 16S ADNr, por medio se PCR con el siguiente programa (Figura 9).

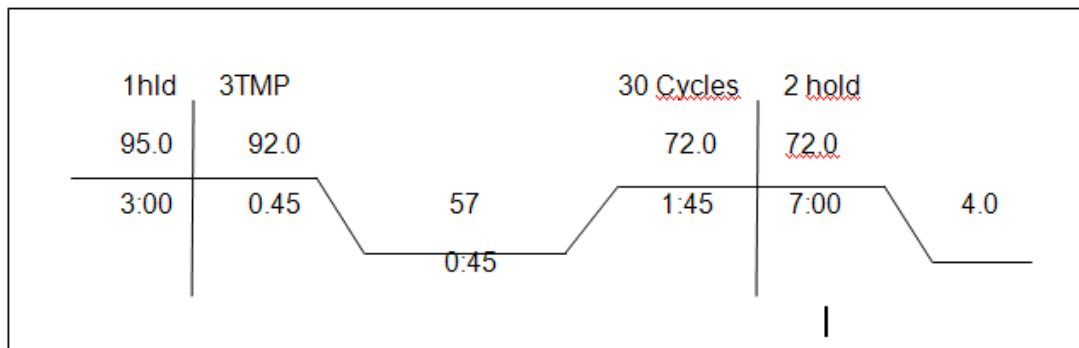


Figura 2. Programa utilizado para amplificar 16'S.

5.6. Purificación y secuenciación del gen *rpoB*.

Los productos de PCR para amplificar el gen *rpoB* fueron purificados, para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit “*PCR product purification system*” de la marca Roche™. Cada producto de PCR fue ajustado a un volumen de 100µl, al cual se le adicionaron 500µl del buffer de unión (*Binding Buffer*) y fue mezclado cuidadosamente, posteriormente se pasó esta mezcla a un tubo con un filtro insertado sobre un tubo recolector y las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto. La solución que pasó a través del filtro fue descartada. Enseguida se les adicionó 500µl de buffer de lavado (*Wash Buffer*), se centrifugaron nuevamente a 13000 por 1 minuto y el filtrado fue desechado. Se realizó un segundo lavado con 200µl del buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente, el filtrado fue desechado. A continuación el tubo con el filtro se trasladó a un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.5ml y se colocaron 85µl de buffer de elución (*Elution Buffer*) y se centrifugó nuevamente durante un minuto para obtener el ADN purificado.

Las muestras (productos de PCR) purificadas fueron cuantificadas utilizando un espectrofotometro modelo NanoDrop 2000c de la marca *Thermo Scientific* (Figura 17) y enviados para su secuenciación a la empresa MACROGEN.

5.7. Análisis filogenético e identificación de especies bacterianas

Las secuencias sentido y antisentido (“*forward*” y “*reverse*”) de cada cepa fueron editadas con el programa BIOEDIT v.7.0.0 (Hall, 1999). Se editaron los cromatogramas de forma manual corroborando visualmente la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le asigna un pico de color distinto) con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del cromatograma. Una vez editadas las secuencias, se procedió a realizar un BLAST en la página web de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Para la inferencia del árbol filogenético, las cepas tipo fueron descargadas del GenBank en la página web del “*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*” y del “*Ribosomal Database Project*”. Se analizaron por el método de *Neighbor-Joining (NJ)* con el modelo de Tamura-Nei utilizando el software MEGA v.4 (Kumar *et al.*, 2004).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1- Características fisicoquímicas del suelo

Se colectó un total de 34 muestras ambientales, correspondientes a 17 muestras de suelo rizosférico y 17 de las raíces de hijuelos del *Agave americana*, tal como se indica en el Cuadro 5. Así también en este cuadro se presentan las características fisicoquímicas del suelo de las parcelas estudiadas. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021 RECNA-2000, estos suelos presentan condiciones adecuadas de fertilidad y cantidad de nutrientes para el cultivo agrícola del *Agave americana*, sin embargo, considerando la naturaleza geológica de estos suelos, aunado a tipo de pH, CIC y % de Materia orgánica, estos suelos podrían en un tiempo no mayor de 10 años, mostrar pérdida paulatina de fertilidad y productividad. Por este motivo es importante iniciar un programa de manejo sustentable de este recurso agrobiológico.

Cuadro 5. Número de muestras colectadas y características fisicoquímicas del suelo de las parcelas experimentales en donde se cultiva el *Agave americana*.

Parcela	No. de muestras		pH (H ₂ O)	M.O (%)	C.I.C (Cmol/Kg)	D.A (gr/mL)	Textura			Tipo textura	N total (%)	Amonio NH ₄ (mg/kg)	Nitratos NO ₃ (mg/kg)	N-inorg. Total (mg/kg)	P (mg/kg)
	Raiz	Suelo					% Arena	% Arcilla	% Limo						
Tuilaito	10	10	6.54	11.81	47.9	1.25	49.8	28.2	22.0	F-A-A*	0.758	6.1	21.3	27.4	8.7
Las Flores	7	7	6.28	13.45	32.5	1.30	45.5	25.3	29.2	F-A-A	0.450	8.2	18.4	20.6	8.5

6.2- Cepas bacterianas aisladas del *Agave americana* L. y su morfología macroscópica.

Se obtuvieron 238 cepas puras de las plantas de *Agave americana* colectadas en las parcelas experimentales, por medio de diferentes protocolos de desinfección y de esterilización de raíces y tallos (Bashan, 1993). En el cuadro 6 se presentan las características fenotípicas de las cepas aisladas que representan los diferentes géneros bacterianos identificados a través de las pruebas moleculares.

Cuadro 6. Bacterias representantes de los principales géneros bacterianos aislados del *Agave americana*.

Género bacteriano	Cepa tipo	Características celulares		Morfología de las colonias en medio NFb	
		Forma	Gram	Características	Diametro (mm)
<i>Achromobacter</i>	4a	Bacilos cortos	(-)	Colonias blancas, opacas, secas, borde crenado y de rápido crecimiento.	3-5
<i>Acinetobacter</i>	13a	Bacilos cortos	(-)	Colonias amarillas, translucidas, borde liso y de rápido crecimiento.	1-2
<i>Agrobacterium</i>	5	Bacilos cortos y delgados	(-)	Colonias blancas, brillosas, húmedas, borde liso y de rápido crecimiento.	1-2
<i>Comamonas</i>	107	Cocos pequeños	(-)	Colonias blancas, opacas, secas, borde crenado y de rápido crecimiento.	2-5
<i>Enterobacter</i>	98	Bacilos cortos	(-)	Colonias blancas, opacas, secas, borde liso y de rápido crecimiento.	1-4
<i>Klebsiella</i>	99	Cocos pequeños	(-)	Colonias blancas, brillosas, húmedas, borde liso y de rápido crecimiento.	2-3
<i>Novoshingobium</i>	14a	Bacilos cortos	(-)	Colonias blancas, translucidas, húmedas, borde liso y de rápido crecimiento.	2
<i>Pseudomonas</i>	17b	Cocos	(-)	Colonias blancas, opacas, húmeda, borde liso y de rápido crecimiento.	1-2
<i>Rhizobium</i>	34a	Bacilos grandes y delgados	(-)	Colonias amarillas, opacas, secas, borde liso y de rápido crecimiento.	1
<i>Stenotrophomonas</i>	31b	Bacilos cortos	(-)	Colonias amarillas, opacas, secas, borde liso y de rápido crecimiento.	1

El estudio microscópico permitió apreciar que las cepas aisladas están conformadas principalmente por bacterias de formas de bacilos cortos, Gram negativo y cuando fueron cultivados en el medio NFb la mayor parte de estos microorganismos produjeron goma mucilaginosa. Es conocido que muchas rizobacterias producen exopolisacáridos (glúcidos) que le permiten adherirse a las raíces de las plantas e iniciar el proceso de reconocimiento intercelular y posteriormente el intercambio de nutrientes.

Cuadro 7. Status taxonómico de las cepas bacterianas aisladas del *Agave americana* con base al gen cromosomal *rpoB*.

Cepa aislada	Género	Cepa bacteriana relacionada (BLAST) de acuerdo al gen <i>rpoB</i>	% Similitud	Fuente de aislamiento
5	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
27	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
34A	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium etli</i> CFN42	92	Raíz
61	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
62	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
71	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
72	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	100	Raíz
75	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
79	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	90	Raíz
81	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
111	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
116	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
156	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
157	<i>Stenotrophomona</i>	<i>Stenotrophomona maltophilia</i> JV3	97	Raíz
162	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Raíz
216	<i>Stenotrophomona</i>	<i>Stenotrophomona maltophilia</i> JV3	97	Raíz
14B	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU41251	90	Suelo
222	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. ITTG S10	99	Suelo
229	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CFN ERS16	100	Suelo
231	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> 245	97	Suelo

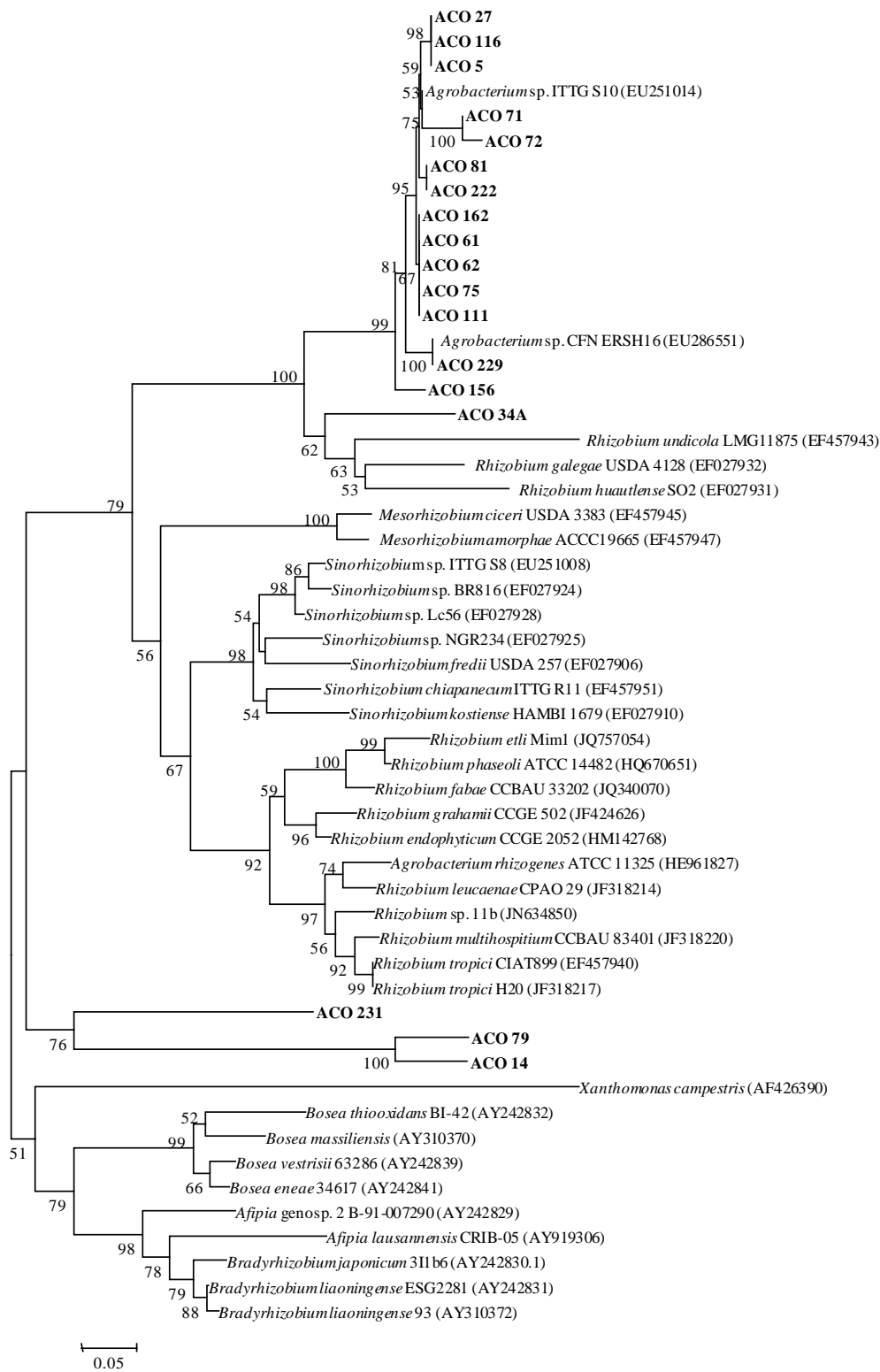


Figura 10. Árbol filogenético basado en el gen *rpoB* de las cepas bacterianas aisladas del *Agave americana*.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados permiten apreciar la amplia diversidad de especies bacterianas asociadas a la planta *Agave americana* comiteco, en donde destacan las bacterias pertenecientes al género *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomona*, así como la curiosa aparición de bacterias que corresponden al género *Azospirillum* y *Mesorhizobium* que tienen potencial para su empleo como biofertilizantes en esta planta de importancia agroindustrial y ecológica, considerando que estas bacterias agrupan especies que tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y la sintetizar reguladores de crecimiento. Así mismo existe un amplio potencial de identificar nuevas especies bacterianas aún no reportadas que están asociadas a la planta y que juegan un papel importante en el crecimiento de esta especie de Agave.

1. De acuerdo con el análisis filogenético realizado a las 20 cepas representantes, éstas pertenecieron a cinco géneros bacterianos distintos, como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Azospirillum* y *Mesorhizobium*.
2. El género en el que se agruparon la mayor cantidad de aislados fue *Agrobacterium/Rhizobium* con un total de 16 cepas, lo cual nos indica que este género bacteriano presenta mayor competitividad en la rizosfera del *Agave americana*.
3. Al conocer la diversidad bacteriana del *Agave americana* con base al gen cromosomal *rpoB* se cumplió el objetivo de este proyecto.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alejandro C. M. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas* sp. (2011). Una revisión. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica. 14 (2): 15 – 31.
- Aranda O. S. (2010). Estructura y diversidad genética de poblaciones bacterianas en la rizósfera de olivo (*Olea europaea* L.) en Andalucía. Tesis (Doctor en Ciencias). Veracruz, México. Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 294 pp.
- Azofeifa D. A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía mesoamericana, 17(2): 221-224.
- Case RI, Boucher Y, Dahllöf I, Holmoström C, Doolittle WF, Kjelleberg S. (2007). Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. Applied and Environmental Microbiology, 73: 278-288.
- Correa F. M. (2008). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis (Doctor en Ciencias). Granada, España. Universidad de Granada, Departamento de Fisiología Vegetal, 260 pp.
- Criollo F. O. H. (2011). Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva in vitro de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel). Tesis (Ingeniero en Biotecnología). Sangolqui, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida e Ingeniería en Biotecnología. 129 p.
- Dahllöf I, Baillie H, Kjelleberg S. (2000). *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 66:3376–3380.
- De La Peña, S. P. (2008). Hacia el rescate del agave comiteco. México. El Faro, (87): 7-9.
- García H.E., Mendez G.S., Talavera, M.D. (2009). El genero *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. En VIII Simposium Taller Nacional y 1er. Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”: (San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados). 20 pp.
- Gaunt M, Turner S, Rigottier-Gois L, Lloyd-Macgil PS, J. Young (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51:2037-2048.
- Ibarra S. C. (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. Tesis (Maestro en Ciencias). México D.F.

Instituto Politécnico Nacional, Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Departamento de Microbiología, 85 pp.

Lara M. C., Villalba A., Mara O. Z. L. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2): 6-14.

Lloret L, Ormeño-Orrillo E, Rincón R, Martínez-Romero J, Rogel-Hernandez MA, Martínez-Romero E (2007) *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* 30:280-290.

Martínez, L.J., Velázquez, A.R., Gutiérrez, O.E., Peña, D.M., Santos, H.A., Pinales, Q.J. (2010). Modelos de crecimiento de maguey (*Agave americana* L.) y nopal nativo (*Opuntia lindheimeri* L.) en Marín, Nuevo León. En IX Simposium-Taller Nacional y II Internacional de producción del nopal y maguey (12 y 13 de Noviembre del 2010. Nuevo León, Universidad Autónoma de Nuevo León). INIFAP-CIRNE-CEGET,. 270 p.

Mollet, C., Drancourt, M. and Raoult, D. (1997) rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* 26, 1005–1011.

Moreno C., Lina M. (2010). Caracterización de las cepas ICA 19 e ICA J96, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya. Tesis (Maestro en Ciencias Biológicas). Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 98 p.

Mostasso L, Mostasso LF, Dias GB, Milton AT, Hungria M. (2002) Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L) rhizobial strains for the Brazil Cerrados. *Field Crops Research* 73:121-132.

Peña, H., Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*. 32 (8): 560-565.

Sarabia O, Rocío MP., Martínez TM., Carreón A.Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Ciencias Biológicas*, 12(1): 65 – 71.

Ramírez T.H.M. (2010). Características bioquímico-fisiológicas de la germinación y desarrollo de plantas jóvenes de maguey (Agave) y su relación con la especie, temperatura y potencial de agua del sustrato. Tesis (Doctor en Ciencias). Estado de México, México. Colegio de postgraduados, Campus Montecillo. 111 p.

Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, J., López-Báez W., López-Luna A. (2012). Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. INIFAP. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur Campo

Experimental Centro de Chiapas. Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. Folleto Técnico No. 14. 24 p.

Reynoso-Santos, R., López-Luna A., López-Báez W., Ruiz-Corral J. (2012). Áreas potenciales para el cultivo del agave (*Agave americana* L.) en la Meseta Comiteca, Chiapas. INIFAP. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur Campo Experimental Centro de Chiapas. Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. Folleto Técnico No. 13. 40 p.

Rodicio, M., Mendoza, M. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(4): 23-45, 2004.

Romero T, Mireya E. (2009). Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en semillas y plántulas de agave pulquero (*Agave atrovirens* KARW. EX SALM-DYCK) y su implicación en un sistema de propagación. Tesis (Maestro en Tecnología Avanzada). Tlaxcala, México. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, 93 p.

Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L. and van Elsas, J.D. (1997) Molecular Microbial Ecology: a minireview. *Revista de Microbiología* 28, 135–147.

Toribio RH. (2005). Comportamiento de explantes de agave pulquero (*Agave atrovirens*) en la interacción de dos reguladores de crecimiento. Tesis (Maestro en Tecnología Avanzada). Tlaxcala, México. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, 39 p.

Vinuesa P, Silva C, Lorite M, Izaguirre-Mayoral M, Bedmar L, Martínez-Romero E. (2005). Molecular systematics of rhizobia base on maximum likelihood and *Bayesian* phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Systematic and Applied Microbiology.* 28:702-716.