



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

BLANCA EGLAYDE GENOVEZ MARTINEZ

CON EL TEMA:

**“ESTUDIO DEL POTENCIAL DE CEPAS BACTERIANAS
Pseudomonas AISLADAS DEL *Agave americana* CON
POTENCIAL COMO BACTERIAS PROMOTORAS DEL
CRECIMIENTO DE PLANTAS”**

MEDIANTE:

OPCIÓN III

(PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)

DIRECTOR DE TESIS:

DR. REINER RINCÓN ROSALES

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; MÉXICO

JUNIO 2017.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por darme la vida y su amor incondicional, por guiarme a lo largo de mi carrera para llegar a ser una persona con victorias a pesar de las pruebas y luchas, por todas las cosas maravillosas que nos ha dado, por las cuales vale la pena vivir y luchar.

A MIS PADRES:

Manuel de Jesús y María de Lourdes, por enseñarme a confiar en Dios, a salir adelante, a ser una persona humilde y sencilla. Por todo los esfuerzos, sufrimientos y oraciones realizadas para poder cumplir este sueño tan deseado.

A MIS HERMANOS:

Javier, Yesenia y Deudelia, por toda la confianza, y el amor que nos tenemos, porque antes de ser hermanos somos amigos, por compartir y apoyarnos siempre en los buenos y malos momentos.

A MI AMIGA:

Clarita, por hacer de nuestra amistad lo más valiosa y sincera, por compartir juntas cada momento de nuestra carrera y por apoyarme en este proyecto.

A MI DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Reiner Rincón Rosales, con admiración y respeto, por su sencillez, por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

A MIS REVISORES:

Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo, Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina; por su valiosa colaboración para la terminación de este proyecto y por todas las cualidades que encierran como persona y como profesionistas.

A MIS PROFESORES:

Quienes me impartieron todas sus enseñanzas con dedicación en cada una de sus materias.

AL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

Por la formación profesional recibida durante la estancia en la institución, por ser nuestra escuela y nuestra casa.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. MARCO TEORICO	4
2.1. Genero <i>Pseudomonas</i>	4
2.1.1. Características biológicas de bacterias <i>Pseudomonas</i>	4
2.1.2. Clasificación taxonómica	5
2.1.3. Importancia de <i>Pseudomonas</i>	6
2.2. Características de las Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPB).	8
2.2.1. Biosíntesis de auxinas (AIA) por bacterias PGPB	9
2.2.2. Biosíntesis de giberelinas (GA ₃) por bacterias PGPB	13
2.2.3. Solubilización de fosfato (PO ₄)	15
2.2.4. Capacidad de fijación de nitrógeno (N ₂)	16
2.2.5. Producción de sideróforos	17
2.3. Estudio genotípico de bacterias <i>Pseudomonas</i>	18
2.3.1. Genes cromosomales	18
2.3.2. Técnicas utilizadas para la caracterización genética de bacterias	20
2.3.3. Huellas genómicas ERIC-PCR	21
2.3.4. Secuenciamiento del gen 16S rDNA	21
2.3.5. Estudio filogenético usando el gen 16S rDNA	23
2.4. <i>Agave americana</i> L.	25
2.4.1. Características morfológicas del <i>Agave americana</i>	25
2.4.2. Clasificación taxonómica	26
2.4.3. Distribución y hábitat	26
2.4.4. Importancia del <i>Agave americana</i>	28
2.4.5. El cultivo de <i>Agave americana</i>	29
2.5. Empleo de las cepas <i>Pseudomonas</i> como biofertilizantes	31
III. JUSTIFICACION	35
IV. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo general	36
4.2. Objetivos específicos	36
V. METODOLOGIA	37
5.1. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas	37
5.2. Caracterización fenotípica de las cepas <i>Pseudomonas</i>	38
5.2.1. Estudio de la morfología celular	38
5.2.2. Morfología de las colonias bacterianas en medios de cultivo	38
5.3. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las cepas <i>Pseudomonas</i>	39
5.3.1. Crecimiento de bacterias a diferentes grados de temperatura	39
5.3.2. Crecimiento de bacterias a diferentes niveles de pH	39
5.3.3. Capacidad para crecer en diferentes concentraciones de NaCl	39
5.3.4. Tolerancia a metales pesados (Al ²⁺ y Cu ²⁺)	39

5.3.5. Resistencia intrínseca a los antibióticos	40
5.4. Caracterización genotípica de las cepas <i>Pseudomonas</i>	40
5.4.1. Extracción de ADN	40
5.4.2. Análisis de huellas genómicas	41
5.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la prueba de huellas genómicas (ERIC).	42
5.4.4. Electroforesis del ERIC-PCR	42
5.4.5. Amplificación del gen 16S ADNr	43
5.4.6. Análisis de restricción del gen 16S ADNr amplificado (ARDRA)	44
5.4.7. Electroforesis de ARDRA	44
5.4.8. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr	44
5.4.9. Análisis filogenético e identificación de especies bacterianas	45
5.5. Estudio de las características multifuncionales de las cepas <i>Pseudomonas</i>	45
5.5.1. Capacidad para biosintetizar auxinas	45
5.5.2. Potencial para solubilizar fosfato	46
5.5.3. Capacidad para fijar N ₂ atmosférico	46
5.5.4. Capacidad para producir sideróforos	46
5.6. Evaluación del potencial antifúngico de cepas <i>Pseudomonas</i>	47
5.7. Evaluación de potencial de las cepas <i>Pseudomonas</i> como PGPB	47
5.8. Análisis estadístico de datos	48
VI. RESULTADOS	49
6.1. Características fenotípicas de las cepas bacterianas	49
6.2. Identificación molecular de las cepas bacterianas	51
6.3. Eficiencia del potencial de las cepas <i>Pseudomonas</i>	51
6.4. Potencial para la Promoción del Crecimiento de Plantas por <i>Pseudomonas</i>	53
6.5. Actividad antifunfica	54
VII. DISCUSIÓN	56
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. RECOMENDACIONES	60
X. BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Descripción de la figura	Página
1	Imagen de una bacteria <i>Pseudomonas</i> . Vista al microscopio electrónico de barrido. 50,000 X.	4
2	Vías de biosíntesis de ácido indol-3-acético en bacterias.	12
3	Ruta de síntesis de giberelinas siguiendo del Ácido mevalónico.	15
4	Técnicas epidemiológicas basadas en la PCR: rep-PCR.	20
5	Aspecto morfológico de la planta de <i>Agave americana</i> L.	25
6	Principales localidades en donde se cultiva el <i>Agave americana</i> L. (García-Mendoza, 2002).	27
7	Plantas de <i>Agave americana</i> cultivadas en la parcela experimental.	37
8	Programa utilizado para amplificar ERIC-PCR.	42
9	Programa utilizado para amplificar 16S rDNA.	43
10	Árbol filogenético basado sobre las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas <i>Pseudomonas</i> aisladas de <i>Agave americana</i> . Los números de acceso de las secuencias son indicados dentro de paréntesis. Los generados en este estudio se muestran en negrita.	51
11	El efecto de las PGPB sobre el crecimiento de las plantas de <i>Agave americana</i> . a) Diferencias sobre el crecimiento (vista frontal) entre las plantas inoculadas y no inoculadas. b) Aspecto del crecimiento de las plantas inoculadas y no inoculadas (Vista superior). c) Volúmen del brote y la raíz de las plantas inoculadas y no inoculadas.	54

ÍNDICE DE CUADROS

No. Cuadro	Enunciado del cuadro	Página
1	Grupos taxonómicos de bacterias <i>Pseudomonas</i> .	5
2	Ubicación de localidades con plantaciones de <i>Agave americana</i> L.	30
3	Ubicación de las parcelas experimentales donde se cultiva el <i>Agave americana</i> .	38
4	Características de antibiogramas que se utilizaron evaluar la resistencia intrínseca de las cepas <i>Pseudomonas</i> .	40
5	Mezcla de Reacción para ERIC-PCR.	42
6	Mezcla de Reacción para amplificar el gen 16S rDNA.	43
7	Características que distinguen cepas de <i>Pseudomonas</i> aisladas de <i>Agave americana</i> de taxones filogenéticamente cercanos.	50
8	Solubilización de fosfato, producción de AIA y AG3, y actividad de reducción de acetileno (ARA) en las cepas aisladas de <i>Agave americana</i> .	52
9	Parámetros de crecimiento de las plantas de <i>Agave americana</i> inoculadas con las cepas <i>Pseudomonas</i> .	53
10	Actividad antifúngica de las cepas <i>Pseudomonas</i> aisladas de <i>Agave americana</i> .	55

RESUMEN

Las propiedades biológicas y multifuncionales como Bacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPB) de cuatro cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *Agave americana* fueron estudiadas. De acuerdo con las características fenotípicas y a la secuencia del gen cromosomal 16S ARNr; las cepas ACO-17B, ACO-21B, ACO-53, y ACO-106 se agruparon dentro del género *Pseudomonas*. Las cepas bacterianas demostraron potencial como PGPB debido a su capacidad para fijación de nitrógeno, síntesis de auxina (AIA) y giberelina (AG₃), solubilización de fosfatos y antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*. La cepa ACO-53 mostró los valores más altos de fijación de nitrógeno (N₂) y solubilización de fosfato (PO⁴⁻), y también produjo las mayores concentraciones de ácido indol acético (AIA) y giberelinas parecidas al GA₃. La inoculación con cepas de *Pseudomonas* tuvo un efecto significativo ($P < 0.05$) sobre el crecimiento de *A. americana*, principalmente sobre el peso total de planta y número de hojas. La cepa ACO-17B mostró inhibición de *F. oxysporum* y *R. solani*, mientras que ACO-53 mostró actividad contra *F. solani* y ACO-21B inhibió significativamente *F. verticillioides*. En conclusión, la biofertilización utilizando *Pseudomonas* nativas demostró ser una alternativa eficaz para promover el crecimiento de *A. americana*.

PALABRAS CLAVE: agave, 16S ARNr, PGPB, actividad antifúngica, *Pseudomonas*.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas establecen interacciones con microorganismos del suelo para obtener nutrientes esenciales (Hayat *et al.*, 2010). PGPB son microorganismos que tienen la capacidad de aumentar el crecimiento de la planta a través de una amplia variedad de mecanismos, tales como la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la actividad antifúngica, la inducción de resistencia sistémica y la promoción de simbiosis beneficiosas de microbios vegetales, entre otras funciones (Bhattacharyya & Jha, 2012). Diferentes PGPB, incluyendo bacterias de vida libre, tales como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas* han sido utilizados como biofertilizantes debido a sus efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas (Esitken *et al.*, 2010).

El género *Pseudomonas* es un grupo de bacterias Gram-negativas que no forman esporas, son móviles y tienen forma de bacilo. Las *Pseudomonas* están muy extendidas en diversos ambientes naturales, como el suelo, las plantas, los animales, el aire y el agua (Li-Ting *et al.*, 2010). Las *Pseudomonas*, como grupo principal de rizobacterias, colonizan las raíces de las plantas de forma agresiva y han sido consideradas un grupo importante para la agricultura sostenible. Hoy en día, la selección de estas bacterias con propiedades biofertilizantes y de control biológico ha sido un tema de interés (Jha *et al.*, 2009). Algunas cepas de *Pseudomonas* se han aislado de plantas de agave y otras suculentas que crecen en ecosistemas áridos y semiáridos (Fonseca-García *et al.*, 2016). Estas cepas fueron identificadas como PGPB debido a su capacidad para fijación de nitrógeno, producción de auxina y solubilización de fosfato. En consecuencia, las *Pseudomonas* se utilizan como biofertilizantes en sistema de producción orgánica, lo que mejora el crecimiento y el rendimiento de los cultivos de agave (De La Torre-Ruiz *et al.*, 2016). También se conoce que las PGPB puede mejorar la resistencia de la planta a una variedad de estrés ambiental. Algunas cepas de *Pseudomonas* han demostrado su capacidad para suprimir las enfermedades transmitidas por el suelo, que está correlacionada con la producción de metabolitos antifúngicos (Haas & Keel, 2003).

Por otro lado, México es considerado el punto de origen, evolución y diversificación del género *Agave* (García-Mendoza, 2002). Aproximadamente 163 especies se encuentran en México, de las cuales 123 son endémicas (Delgado-Lemus *et al.*, 2014). *Agave americana* L. es una especie que crece en suelos de la región Altos de Chiapas (México). Tiene una importancia económica, social y cultural, ya que es fuente de fibra natural, medicina y fructanos, además de ser utilizada para la producción de bebidas alcohólicas (García-Mendoza, 2002). Los agricultores locales han establecido plantaciones de *A. americana* para obtener suficientes materias primas para el uso agroindustrial. Sin embargo, la escasez de nutrientes en el agua y el suelo, y algunas enfermedades causadas por hongos, principalmente especies de *Fusarium* (Ávila-Miranda *et al.*, 2012), limitan el crecimiento de las plantas. En consecuencia, las plantas alcanzan la madurez después de 5 a 7 años. Una alternativa que ya está siendo usada en otros cultivos es aplicar PGPB. Sin embargo, es necesario evaluar los posibles efectos sobre *A. americana* específicamente. Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron: i) determinar las características fenotípicas y genotípicas de cuatro cepas de *Pseudomonas* aisladas de *A. americana*, y ii) evaluar su potencial como PGPB junto con su actividad antifúngica.

II. MARCO TEORICO

2.1. Genero *Pseudomonas*

2.1.1. Características biológicas de bacterias *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positiva, aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (Fig.1). El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Es común la presencia de plásmidos y no forman esporas.

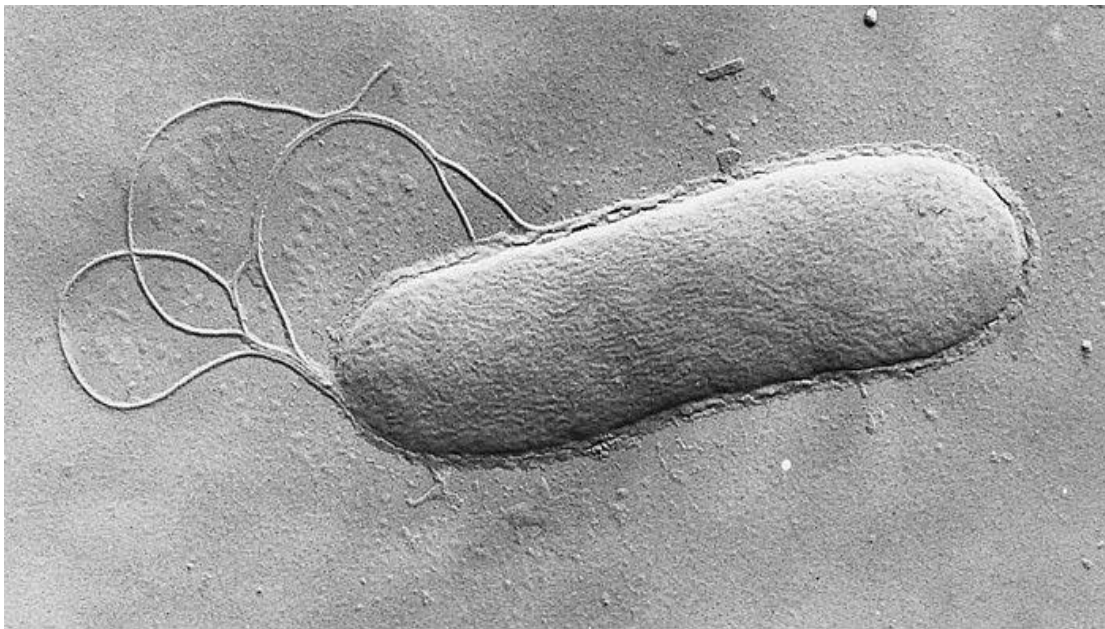


Figura 1. Imagen de una bacteria *Pseudomonas*. Vista al microscopio electrónico de barrido. 50,000 X. (Appanna *et al.*, 2003).

Con el reciente análisis de secuencias del gen 16S RNAr se han definido la taxonomía de muchas especies bacterianas (Anzai *et al.*, 2000) y como resultado, el género *Pseudomonas* incluyen algunas cepas clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*, Otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*.

2.1.2. Clasificación taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: Pseudomonas

Debido a la amplia diversidad de especies bacterianas *Pseudomonas*, se ha propuesto agruparlos en 10 grupos taxonómicos (Cuadro 1). Para este fin se han considerado características biológicas, fisiológicas, bioquímicas, moleculares y relaciones filogenéticas (Felker *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Grupos taxonómicos de bacterias *Pseudomonas*

Grupo de <i>P. aeruginosa</i>	Grupo de <i>P. fluorescens</i>	Grupo de <i>P. pertucinogena</i>
<i>P. aeruginosa</i> <i>P. alcaligenes</i> <i>P. anguilliseptica</i> <i>P. argentinensis</i> <i>P. borbori</i> <i>P. citronellolis</i> <i>P. flavescens</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. nitroreducens</i> <i>P. oleovorans</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i> <i>P. resinovorans</i> <i>P. straminea</i>	<i>P. antarctica</i> <i>P. azotoformans</i> <i>P. blatchfordae</i> <i>P. brassicacearum</i> <i>P. brenneri</i> <i>P. cedrina</i> <i>P. corrugata</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. gessardii</i> <i>P. libanensis</i> <i>P. mandelii</i> <i>P. marginalis</i> <i>P. mediterranea</i> <i>P. meridiana</i> <i>P. migulae</i> <i>P. mucidolens</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. panacis</i> <i>P. proteolytica</i> <i>P. rhodesiae</i> <i>P. synxantha</i> <i>P. thivervalensis</i> <i>P. tolaasii</i> <i>P. veronii</i>	<i>P. denitrificans</i> <i>P. pertucinogena</i> Grupo de <i>P. chlororaphis</i> <i>P. aurantiaca</i> <i>P. aureofaciens</i> <i>P. chlororaphis</i> <i>P. fragi</i> <i>P. lundensis</i> <i>P. taetrolens</i>

Grupo de <i>P. putida</i>	Grupo de <i>P. stutzeri</i>	Grupo de <i>P. syringae</i>
<p><i>P. cremoricolorata</i> <i>P. fulva</i> <i>P. monteilii</i> <i>P. mosselii</i> <i>P. oryzihabitans</i> <i>P. parafulva</i> <i>P. plecoglossicida</i> <i>P. putida</i></p>	<p><i>P. balearica</i> <i>P. luteola</i> <i>P. stutzeri</i></p>	<p><i>P. amygdali</i> <i>P. avellanae</i> <i>P. caricapapayae</i> <i>P. cichorii</i> <i>P. coronafaciens</i> <i>P. ficuserectae</i> '<i>P. helianthi</i>' <i>P. meliae</i> <i>P. savastanoi</i> <i>P. syringae</i> '<i>P. tomato</i>' <i>P. viridiflava</i></p>
incertae sedis	incertae sedis	incertae sedis
<p><i>P. abietaniphila</i> <i>P. acidophila</i> <i>P. agarici</i> <i>P. alcaliphila</i> <i>P. alkanolytica</i> <i>P. amyloclavata</i> <i>P. asplenii</i> <i>P. azotifigens</i> <i>P. cannabina</i> <i>P. coenobios</i> <i>P. congelans</i> <i>P. constantinii</i> <i>P. cruciviae</i> <i>P. delhiensis</i> <i>P. excubis</i> <i>P. extremorientalis</i> <i>P. frederiksbergensis</i> <i>P. fuscovaginae</i> <i>P. gelidicola</i> <i>P. grimontii</i> <i>P. indica</i> <i>P. jessenii</i> <i>P. jinjuensis</i> <i>P. kilonensis</i></p>	<p><i>P. knackmussi</i> <i>P. koreensis</i> <i>P. lini</i> <i>P. lutea</i> <i>P. moraviensis</i> <i>P. otitidis</i> <i>P. pachastrellae</i> <i>P. palleroniana</i> <i>P. papaveris</i> <i>P. peli</i> <i>P. perolens</i> <i>P. poae</i> <i>P. pohangensis</i> <i>P. psychrophila</i> <i>P. psychrotolerans</i> <i>P. rathonis</i> <i>P. reptilivora</i> <i>P. resiniphila</i></p>	<p><i>P. rhizosphaerae</i> <i>P. rubescens</i> <i>P. salomonii</i> <i>P. segitis</i> <i>P. septica</i> <i>P. simiae</i> <i>P. suis</i> <i>P. thermotolerans</i> <i>P. tremae</i> <i>P. trivialis</i> <i>P. turbinellae</i> <i>P. tuticorinensis</i> <i>P. umsongsensis</i> <i>P. vancouverensis</i> <i>P. vranovensis</i> <i>P. xanthomarina</i></p>

2.1.3. Importancia de *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas* representa un grupo grande e importante de bacterias Gram negativas el cual incluye especies de gran versatilidad metabólica así como de propensión patológica, de ahí su importancia tanto clínica como ambiental. El interés de

estas bacterias se ha reflejado en el gran número de publicaciones de investigación originales, revisiones y libros sobre este tema (Appanna *et al.*, 2003).

Las especies del género *Pseudomonas* son organismos ubicuos, bacterias Gram negativas que se agrupan dentro de las proteobacterias. Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos. También son microbiota predominante en la rizósfera y en la filosfera de plantas; del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce y en aguas marinas. En general inocuas para el hombre también existen: patógenos oportunistas como *P. aeruginosa*; patógenos de animales y patógenos de plantas como *P. syringae* (Appanna *et al.*, 2003).

El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros (Felker *et al.*, 2005).

Las cepas del género *Pseudomonas* son capaces de procesar, integrar y reaccionar a una amplia variedad de condiciones cambiantes en el ambiente, y muestran una alta capacidad de reacción a señales fisicoquímicas y biológicas. Se han descrito cepas capaces de adquirir resistencia a metales pesados, disolventes orgánicos y detergentes, que les permite explotar una amplia gama de fuentes de carbono como nutrientes, así como colonizar ambientes y nichos que difícilmente son colonizables por otros microorganismos. Por ello no es sorprendente que se considere a las bacterias del género *Pseudomonas* un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos claves en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas. Además de su uso en biodegradación las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales (como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol) (Felker *et al.*, 2005).

2.2. Características de las Bacterias Promotoras del Crecimiento de plantas (PGPB).

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPB), son un grupo de diferentes microorganismos que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, los géneros más conocidos y utilizados en la agricultura son: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, entre otros. Las PGPB presentan grandes ventajas para incrementar la productividad de los cultivos, pueden actuar favoreciendo el crecimiento vegetal de manera directa e indirecta (Camelo *et al.*, 2011).

a) Efectos directos:

- Fijación de nitrógeno atmosférico.
- Producción y síntesis de sideróforos (es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos).
- Solubilización de minerales (especialmente fosforo).
- Síntesis de fitohormonas (auxinas, citocininas y giberelinas).
- Síntesis de la enzima ACC Desaminasa.

b) Efectos indirectos

- Biocontrol de fitopatógenos (desarrollo óptimo de raíces).
- Producción de antibióticos.
- Reducción de hierro (Fe^{+3}).
- Resistencia inducida.
- Enzimas líticas de pared celular fungosa.

Para llevar a cabo estas funciones las PGPB actúan a través de diversos mecanismos, fungiendo como bioestimulantes, fitoestimulador, biopesticidas o agentes de biocontrol. Los biofertilizantes son sustancias las cuales contienen microorganismos vivos que cuando son aplicados en semillas, superficie vegetal o al suelo colonizan la rizósfera o interior de la planta y promueve el crecimiento a través del incremento en el suplemento o disponibilidad de los nutrientes por el hospedero vegetal, por ejemplo: aumentan la

fijación de Nitrógeno, convierten al fósforo insoluble disponible para las plantas. Las bacterias que actúan como fitoestimuladores, tienen la habilidad de producir o cambiar la concentración de los reguladores de crecimiento tales como: ácido indolacético, ácido giberélico, citocininas y etileno. Mientras que los biopesticidas o agentes de control biológico, promueven el crecimiento de las plantas a través del control del fitopatógeno, principalmente por la producción de antibióticos y metabolitos antifúngicos (Camelo *et al.*, 2011).

Para poder trabajar con estos microorganismos existen métodos de aplicación de las (PGPB), basados en la inoculación de semilla, sustrato, plántula, follaje, frutos, inoculación de suelo e inoculación en composta. Se debe tener en cuenta algunas consideraciones, por ejemplo; no son productos químicos y es recomendable aplicarse en las primeras etapas de la planta, así como mantener un manejo integral del cultivo y las características del suelo (Camelo *et al.*, 2011).

2.2.1. Biosíntesis de auxinas (AIA) por bacterias PGPB

El ácido indol-3-acético (AIA) es el más común, así como la auxina más estudiada, y gran parte de la literatura científica considera la auxina y el AIA términos intercambiables (Ergun *et al.*, 2002). El AIA afecta a la división, extensión y diferenciación celular de las plantas; estimula la germinación de semillas y tubérculos; aumenta la tasa de desarrollo del xilema y de las raíces; controla los procesos de crecimiento vegetativo; inicia la formación de raíces laterales y adventicias; media las respuestas a la luz, la gravedad y la fluorescencia; afecta a la fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de diversos metabolitos y resistencia a condiciones estresantes (Matsukawa *et al.*, 2007).

El triptófano (Trp) se considera generalmente como el precursor del ácido indol-acético (AIA). Se han descrito varias rutas biosintéticas del AIA, como la vía indol-3-acetamida, la vía indol-3-piruvato, la vía triptamina, la ruta de la enzima triptófano cadena-lateral oxidasa, la vía indol-3-acetonitrilo y las vías independientes del triptófano (Spaepen *et al.*, 2007). En las vías dependientes de Trp, el triptófano se convierte en indol-3-acetamida

(IAM) por la enzima triptófano-2-monooxigenasa y el IAM se metaboliza en AIA por la enzima IAM-hidrolasa (Matsukawa *et al.*, 2007).

Las bacterias tienen la capacidad de sintetizar auxinas. La biosíntesis de AIA no está limitada a las plantas superiores. Organismos como bacterias, hongos y algas son capaces de sintetizar AIA, lo que puede afectar el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En bacterias, la producción de AIA es una capacidad relevante, tanto de PGPBs, como de bacterias fitopatógenas (Patten & Glick, 2002). Las plantas superiores exudan, entre otros componentes el aminoácido triptófano, que es el principal precursor para la biosíntesis de AIA microbiano. Se ha propuesto que el 80% de las bacterias de la rizósfera son capaces de producir AIA. Se ha observado un alto grado de similitud en las vías de síntesis de AIA de plantas y bacterias (Spaepen *et al.*, 2007).

Los microorganismos de rizósfera que interaccionan con las plantas, interfieren con su desarrollo, mediante el desbalance de auxinas, de manera que pueden afectar a la planta en forma positiva o negativa. Las bacterias productoras de AIA (BIP, del inglés *bacterial IAA producer*) tienen el potencial de interferir con los procesos de incorporación de AIA en las plantas. La consecuencia para la planta depende de la cantidad de AIA producida y la sensibilidad del tejido de la planta a los cambios en la concentración de AIA, lo que se asocia a la vía biosintética utilizada por las bacterias asociadas a plantas (Spaepen *et al.*, 2007). Bacterias fitopatogénicas como *Agrobacterium* spp. y *Pseudomonas savastanoi* causan en el tejido vegetal tumores y corona de agallas, respectivamente, que en plantas jóvenes significan retrasos en el crecimiento, el desarrollo anormal, la susceptibilidad a otras enfermedades o la muerte de la planta (Mole *et al.*, 2007). Por otra parte, la PGPB *Azospirillum* favorece el desarrollo de la raíz. El triptófano es el principal precursor en las vías de biosíntesis de AIA en bacterias (Tsavkelova *et al.*, 2007). Diferentes vías de síntesis de AIA han sido identificadas en bacterias. Cinco de estas rutas anabólicas son dependientes de triptófano. Las vías de síntesis de AIA más importantes y ampliamente distribuidas son la vía indol-3piruvato (IPA) y la vía indol-3acetamida (IAM) (Spaepen *et al.*, 2011). La vía IPA ha sido reportada principalmente en PGPB, mientras que la vía IAM ha sido descrita en bacterias fitopatógenas (Fig. 2).

Además, se han descrito vías de síntesis de AIA independientes de triptófano, que han sido estudiadas mediante mutantes y marcaje isotópico.

Vía indol-3-piruvato (IPA)

La vía IPA ha sido propuesta como la principal ruta para la biosíntesis de AIA en plantas. Sin embargo, las enzimas o genes clave no han sido aún identificados en plantas (Spaepen *et al.*, 2011). La producción de AIA por la vía IPA ha sido descrita en diversas bacterias, como el fitopatógeno *Pantoea agglomerans*, bacterias benéficas (e.g., *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Enterobactercloacae*) y en cianobacterias. Esta vía tiene como primera etapa la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPA) por una aminotransferasa. En una segunda etapa el IPA se descarboxila a ácido indol-3-acetaldehído (AIAld) por la indol-3-piruvato descarboxilasa (IPDC), siendo esta la etapa limitante de la síntesis. El gen *ipdC* que codifica para la enzima IPDC ha sido caracterizado en algunas bacterias como *Azospirillum brasilense*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. agglomerans* y *Paenibacillus*. En la etapa final, el AIAld es oxidado a AIA por la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (Spaepen *et al.*, 2007).

Vía indol-3-acetamida (IAM)

La vía IAM es la ruta más caracterizada en bacterias. Esta vía no ha sido descrita en plantas (Spaepen *et al.*, 2007). Esta vía metabólica está presente en diversos patógenos y contribuye a la virulencia de estas bacterias por la excesiva producción de AIA. Los síntomas fitopatogénicos están principalmente ligados a la vía IAM, dado que sería microbiana específica.

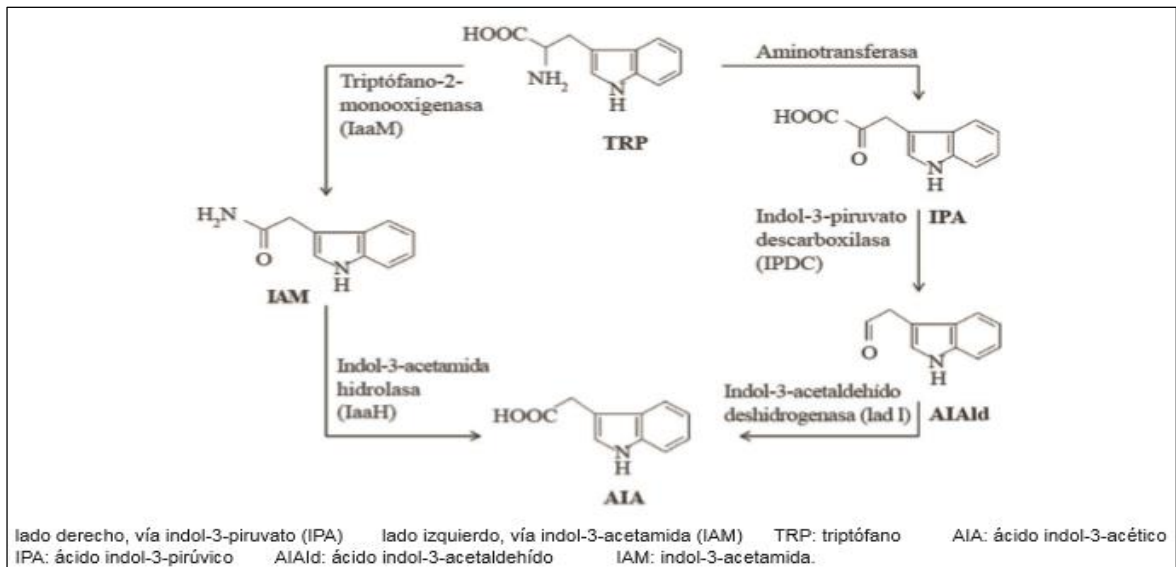


Figura 2. Vías de biosíntesis de ácido indol-3-acético en bacterias

Debido a que las plantas no poseen los intermediarios metabólicos de esta vía, no son capaces de mantener el AIA a niveles no tóxicos o fisiológicamente apropiados en sus tejidos por retroalimentación (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Los genes, las proteínas y la regulación de esta ruta metabólica han sido caracterizados y comprende dos etapas. En la primera, el triptófano es convertido en IAM por la enzima triptófano-2-monooxigenasa (*IaaM*), que está codificada en el gen *iaaM*. En la segunda, el IAM es convertido a AIA y amonio, mediante una IAM hidrolasa (*IaaH*), que es codificada por el gen *iaaH*. Estos genes han sido descritos en bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Pseudomonas syringae*, *P. agglomerans*, *Rhizobium sp.* NGR234 y *Bradyrhizobium japonicum* (Spaepen *et al.*, 2011).

Para determinar AIA se emplea comúnmente la técnica de Gordon & Weber (1951). Cada cepa bacteriana debe cultivarse separadamente en caldo de medio de cultivo enriquecido con Trp, y luego realizarse un estudio colorimétrico a partir del sobrenadante, lo que consume mucho tiempo y no aporta fiabilidad debido a que no pueden cuantificarse con certeza las concentraciones de AIA. Por ello se ha hecho uso de técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para poder realizar un análisis cuantitativo de los niveles de biosíntesis del AIA (Zakharova *et al.*, 2001).

2.2.2. Biosíntesis de giberelinas (GA₃) por bacterias PGPB

Las giberelinas" son terpenoides, compuestos que derivan del difosfato de isopentenilo. Esta molécula se puede sintetizar por dos rutas biosintéticas diferentes. La primera usa como intermediarios el hidroximetilglutaril-CoA y el mevalonato; la segunda, descubierta más recientemente, usa como intermediario el fosfato de gliceraldehído y el piruvato (Rhomer *et al.*, 1993). Los experimentos de alimentación con mevalonato radioactiva indican que las giberelinas se sintetizan en *Gibberella* y en las plantas por la vía del mevalonato (Domenech *et al.*, 1996). Un paso crítico en la síntesis de giberelinas es la ciclación del difosfato de geranilgeranilo para dar kaureno, el primer diterpenotetracíclico en la ruta. El kaureno se oxida sucesivamente a kaurenol, kaurenal, ácido kaurenico y ácido 7- α -hidroxíkaurenico. De esta parte de la ruta derivan otros metabolitos secundarios de *Gibberella*, como son el fujenal (Martínez D. & García, 2004), el gibelactol (Barrero *et al.*, 1992) o las kaurenolidas (Beale *et al.*, 1982). La contracción del anillo del ácido 7- α -hidroxíkaurenico da lugar al aldehído de GA₁₂, primer compuesto con la estructura típica de las giberelinas, con dos anillos pentagonales y dos hexagonales (esqueleto ent-giberelano). A partir de ahí, la ruta en *Gibberella* se escinde en dos vías paralelas que se diferencian en la presencia o ausencia de una hidroxilación en el carbono 3 del aldehído de GA₁₂. La ruta hidroxilada es predominante en la estirpe silvestre de *Gibberella*.

Durante muchos años, *Gibberella* fue el único organismo conocido productor de giberelinas. Este hecho, unido a su simplicidad de manipulación en el laboratorio, explica que haya sido el objeto preferente en la investigación de la ruta biosintética de estas hormonas. Un ejemplo relevante lo constituye el mutante B1-41A (Vega-Celedón *et al.*, 2016), bloqueado en la oxidación de kaureno a ácido kaurenico, cuya capacidad de metabolizar ácido kaurenico exógeno facilitó la identificación de intermediarios de la ruta.

Hoy en día muchos de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal son reconocidos como productores de giberelinas. Tal es el caso de bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter*, algunos hongos como *Gibberella*

fujikuroi, *Fusarium moniliforme*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus flavus*, *F. oxysporium*, *Penicillium corylophilum*, *P. cyclopium* y *Rhizopus stolonifer*, entre otros, también han reportado algas como productoras de giberelinas (Ergun *et al*, 2002; Hasan, 2002; Srivastava & Ahmad, 2003).

Se han aislado y caracterizado 121 GAs, la mayoría de ellas a partir de especies vegetales superiores. Al estudiar dichos compuestos se determinó su estructura, revelando su capacidad como reguladores del crecimiento vegetal, por lo que pueden afectar, regular o modular un amplio rango de respuestas de crecimiento vegetal ya sea en la germinación de semillas, la estimulación del crecimiento del tallo o raíces (Azcon *et al.*, 2000).

La biosíntesis de giberelinas en microorganismos es similar a la ruta biosintética que realizan las plantas superiores, aunque no juegan un papel vital en la fisiología de estos microorganismos, las giberelinas son producidas como metabolitos secundarios. La ruta biosintética de las giberelinas en PGPRs aún no ha sido reportada, pero gracias a que las giberelinas son compuestos isoterpenoides, tanto los producidos por las plantas como las producidas por las bacterias, se podría asumir que la vía de biosíntesis en este tipo de bacterias, es la que se ha reportado en animales, plantas, hongos, archeas y algunas enterobacterias (Rohmer, 2003), es decir por la ruta del ácido mevalónico (Fig. 3) donde el acetato y el mevalonato son considerados como precursores importantes de la síntesis de los isoterpenoides.

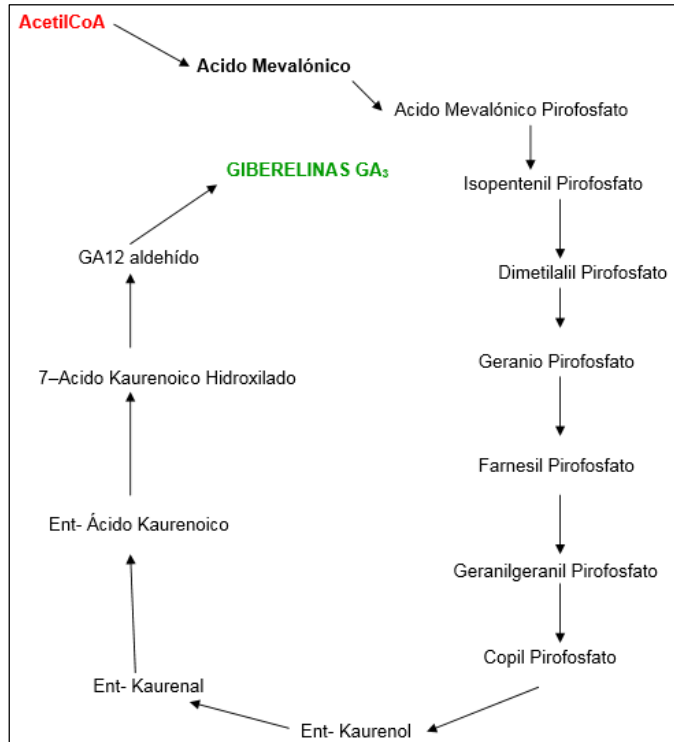


Figura 3. Ruta de síntesis de giberelinas siguiendo del Ácido mevalónico.

2.2.3. Solubilización de fosfato (PO₄)

La biodisponibilidad limitada de [PO₄]⁻³ en el suelo, combinada con el hecho de que este elemento es esencial para el crecimiento de las plantas, significa que la incapacidad para obtener suficiente P-3 limita el crecimiento de las plantas. La solubilización y mineralización del P-3 por las bacterias solubilizantes de PO₄⁻³ es un rasgo importante en PGPB. Comúnmente, la solubilización del fósforo inorgánico se produce como consecuencia de la acción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular tales como ácido glucónico y ácido cítrico, los cuales son sintetizados por varias bacterias del suelo (Igual *et al.*, 2001). Por otro lado, la mineralización del fósforo orgánico se produce a través de la síntesis de una variedad de diferentes fosfatasa, catalizando la hidrólisis de ésteres fosfóricos. Es importante destacar que la solubilización y mineralización de fosfato pueden coexistir en la misma cepa bacteriana (Rodríguez *et al.*, 2004).

Para el aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP), se han documentado en la literatura diferentes medios de cultivos que incluyen en su

composición variadas fuentes de fosfato, tanto de origen orgánico, como inorgánico (Pi). Sin embargo, el medio NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) ha sido uno de los más usados por su eficiencia para seleccionar microorganismos con alta capacidad para solubilizar fuentes de Pi (Díaz-de la Osa *et al.*, 2015). Varios autores atribuyen la solubilización del fosfato insoluble inorgánico por microorganismos a la producción de ácidos orgánicos y oxoácidos quelantes a partir de azúcares (Kundu *et al.*, 2009).

Cotidianamente se usan medios de cultivo en placa enriquecidos con fuentes de Pi como un método para asegurar el aislamiento de BSP. Este método se usa también en ensayos preliminares de solubilización de fosfato. La evaluación de la capacidad de solubilización de fosfato se lleva a cabo seleccionando aquellos microorganismos que son capaces de producir una zona clara (o halo) en la placa debido a la producción de ácidos orgánicos en el medio circundante (Katznelson *et al.*, 2011). Sin embargo, se cuestiona la fiabilidad de esta técnica basada en halos de solubilización, ya que muchos aislamientos que no producen una zona clarificada en placas de agar, pueden solubilizar diversos tipos de fosfatos inorgánicos insolubles cuando se encuentran en medio líquido.

Es importante realizar los ensayos en medios líquidos para estudiar la dinámica de la solubilización de fosfatos por las bacterias a través de la medición del fósforo liberado en un caldo de cultivo que ha sido previamente suplementado con una cantidad conocida de una fuente única de fosfato insoluble. De este modo, se puede estimar la tasa de solubilización de P-3 por sustracción de la concentración final de P-3 de la cantidad teórica inicial de P-3 suplementado, respecto al control no inoculado (Bashan *et al.*, 2013).

2.2.4. Capacidad de fijación de nitrógeno (N₂)

Todos los organismos requieren nitrógeno (N) para sintetizar biomoléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la fuente principal de N en la naturaleza, el nitrógeno atmosférico (N₂), no es accesible a la mayoría de los organismos vivos, incluyendo eucariontes. La fijación biológica de nitrógeno (BNF) es el proceso

responsable de la reducción de N_2 a amoníaco (NH_3) y se realiza en microorganismos diazotófos, particularmente bacterias y arqueas (Dixon & Kahn, 2004). En el suelo, el nitrógeno es transformado por varios procesos como la amonificación, que es la liberación de nitrógeno en forma de amonio a partir de sustancias orgánicas; y la nitrificación, que es la conversión de amonio en nitratos. El nitrógeno es el elemento más limitante para el crecimiento vegetal tanto en ambientes naturales como para la producción agrícola (Martínez-Romero *et al.*, 2013). Los microorganismos diazotróficos realizan BNF a través de nitrogenasa, una enzima altamente conservada que comprende dos metaloproteínas, FeMo-proteína y Fe-proteína (Dixon & Kahn, 2004).

El uso de la reducción catalizada por nitrogenasa de acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) como un ensayo sensible y simple para medir la fijación biológica de nitrógeno ha contribuido en gran medida al progreso de la investigación en esta área. El método de ARA (Ensayo de Reducción de Acetileno, siglas en inglés) es un método basado en la capacidad de ciertos productos químicos tales como nitrato de plata amoniacal para precipitar el acetileno cuantitativamente, facilitando de este modo un análisis cromatográfico de gases más rápido de las muestras.

2.2.5. Producción de sideróforos

A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la tierra, en suelos aeróbicos, el hierro no es fácilmente asimilado por bacterias o plantas porque el ion férrico o Fe^{+3} , que es la forma predominante en la naturaleza, es escasamente soluble, de modo que la cantidad de hierro disponible para la asimilación por los organismos vivos es extremadamente baja. Para sobrevivir con un suministro limitado de hierro, las bacterias sintetizan sideróforos de bajo peso molecular (~400-1500 Da), moléculas con una alta afinidad por Fe^{+3} así como receptores en las membranas que son capaces de unir el complejo Fe-sideróforo, facilitando así, la asimilación de hierro por los microorganismos.

Se han desarrollado diversos ensayos para detectar diferentes fenotipos de sideróforos (Arnold & Viswanatha, 1983). Aunque estos ensayos son útiles para

identificar varios sideróforos, sería necesario realizar numerosos ensayos para detectar todas las formas posibles de sideróforos (Schwyn & Neiland, 1987), desarrollaron un ensayo universal de sideróforos utilizando cromo azurol S (CAS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) como indicadores, basado en la afinidad por hierro (III). El complejo CAS/HDTMA se enlaza fuertemente con hierro o magnesio para producir un color azul. Cuando un agente quelante fuerte como un sideróforo remueve al hierro o magnesio del complejo de colorantes, el color cambia de azul a naranja (Louden *et al.*, 2011).

2.3. Estudio genotípico de bacterias *Pseudomonas*

El estudio de la diversidad genética se realiza para clasificar un individuo o población comparada con individuos u otras poblaciones, esta determinación puede basarse en información de tipo bioquímica, morfológica y molecular. Sin embargo, los marcadores moleculares han tomado ventaja sobre los otros tipos, en donde se muestran las diferencias genéticas en un nivel más detallado y sin interferencias de factores ambientales, en donde se involucran técnicas que proveen resultados rápidos detallando la diversidad genética (Souza *et al.*, 2008).

2.3.1. Genes cromosomales

Las técnicas de biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de estructuras y composición de las especies de las comunidades microbianas. En particular, variaciones en la secuencias de rRNA han sido aprovechadas para inferir en las relaciones filogenéticas entre microorganismos, y para designar sondas de nucleótidos específicos para la detección de taxones individuales microbianos en hábitats naturales. Estas técnicas también han sido utilizadas para determinar la actividad la diversidad genética de comunidades microbianas e identificar varios microorganismos no cultivables (Muyzer, *et al.*, 1993).

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el

marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan en base al ARNr 16S. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomías bacterianas. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. La secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S ha sustituido en la actualidad a la secuenciación de catálogos de oligonucleótidos (Sleigh & Curson, 2000).

Existen también conjuntos de marcadores moleculares para detectar polimorfismos del ADN, en los estudios de biodiversidad genética, los más utilizados son los microsatélites. Los microsatélites, SSR (Repeticiones de Secuencia Única) o STR (Repeticiones Simples en Tándem) consisten en un tramo de ADN de 2 a 6 pares de bases (pb) de longitud que se repiten varias veces en tándem. Están diseminados por todo el genoma de los eucariotas. Los microsatélites son de un tamaño relativamente pequeño y, por consiguiente, pueden ser fácilmente amplificados con la PCR usando ADN extraído de fuentes diversas, como la sangre, el pelo, la piel, e incluso las heces. Los polimorfismos se pueden visualizar en un gel secuenciador, y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis ultrarrápido de un gran número de muestras (Goldstein & Schlötterer, 1999).

Por otro lado, la existencia de múltiples copias de *rpoB* nunca ha sido reportada para cualquier bacteria. La comparación del uso de *rpoB* de la secuencia parcial parece ser un complemento razonable o una herramienta alternativa para la identificación universal de bacterias (Roux & Raoult, 1995).

El gen *rpoB* codifica la subunidad β de ADN dependiente ARN polimerasa (Kim *et al.* 1999). El gen ha sido introducido en los estudios taxonómicos y análisis de la comunidad de las bacterias como una alternativa a la del gen 16S rARN porque existe en una sola copia en todos los genomas bacterianos estudiados hasta el momento, y contiene

conservado como, así como regiones variables (Da Mota *et al.* 2004).

El análisis del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa se ha utilizado con éxito como un enfoque de determinación del genotipo para superar los obstáculos de similitud gen 16S rRNA en estudios filogenéticos dentro de *Geobacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Complibacter*, *Pasteurellaceae* y *Enterobacteriaceae*. Diversos estudios han demostrado que *rpoB* basada análisis efectivamente podría superar las limitaciones intrínsecas de la heterogeneidad dentro de una especie de ARNr 16S (Dahllöf *et al.*, 2000).

2.3.2. Técnicas utilizadas para la caracterización genética de bacterias

Estas técnicas se fundamentan en la amplificación de fragmentos del genoma, que se encuentran entre dos secuencias repetidas. Son tres las secuencias repetitivas que se han utilizado con esta finalidad: las secuencias REP (*repetitive extragenic palindromic*), las ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) y los elementos BOX. En tales casos, las técnicas se han denominado REP-PCR, ERIC-PCR y BOX-PCR respectivamente, y rep-PCR colectivamente (Fig.4.). Estas técnicas se han mostrado más reproducibles que las AP-PCR (*Arbitrary Primed-PCR*) y se están aplicando para el estudio epidemiológico de un gran número de especies distintas; además, son de gran utilidad por su sencillez y rapidez, pudiendo introducirse en el día a día del laboratorio (Prats-Pastor, 2006).

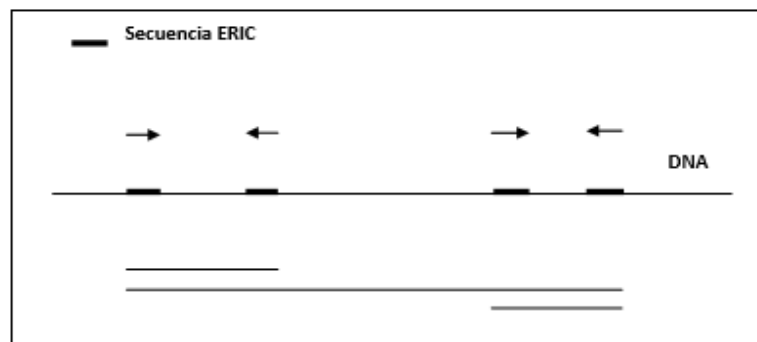


Figura 4. Técnicas epidemiológicas basadas en la PCR: rep-PCR.

En las rep-PCR, secuencias repetidas y próximas entre sí del genoma (como las secuencias ERIC, BOX o REP) se utilizan como diana para los cebadores que amplifican

los espacios intermedios. Las técnicas comparan las diferencias de tamaño existentes de los espacios intermedios amplificados entre las cepas (Prats-Pastor, 2006).

Estas técnicas son rápidas, y sencillas en relación al PFGE (Electroforesis de campo pulsante) y aunque su reproducibilidad no es absoluta, la comparación de los resultados en un mismo gel posee extraordinario valor.

2.3.3. Huellas genómicas ERIC-PCR

Una técnica de tipificación basada en DNA, la cual es frecuentemente empleada para tales propósitos depende de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y “primers” dirigidos a secuencias de nucleótidos específicas designadas como secuencias ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) para generar huellas genómicas específicas de cada cepa (Lindsay & Sharp, 2006).

Los elementos ERIC han sido descubiertos en regiones intergénicas no codificadas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Ramazanzadeh *et al.*, 2013). Éstas son pequeñas unidades repetitivas de 126 pb que contienen una repetición conservada central invertida de 40 pb (Lindsay & Sharp, 2006). La secuencia ERIC es un palíndromo imperfecto. Además, secuencias más cortas son producidas por supresiones internas, como también secuencias más largas debido a inserciones de alrededor 70 pb en sitios específicos internos (Prats-Pastor, 2006). El número de copias de la secuencia ERIC varía entre especies: se han estimado por extrapolación alrededor de 30 copias en *E. coli* K-12 y quizás 150 en *S. entérica Typhimurium* LT2 (Ramazanzadeh *et al.*, 2013), mientras que la secuencia del genoma de *Photobacterium luminescens* ha sido reportada conteniendo alrededor de 700 copias (Wilson & Sharp, 2006).

2.3.4. Secuenciamiento del gen 16S rDNA

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970 (Olsen & Woese, 1993). Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas

en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archae o bacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos (Woese, 1987).

Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas (Woese *et al.*, 1990). Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado 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 (Rodicio & Mendoza, 2005). De hecho, las ediciones vigentes de los dos tratados fundamentales de bacteriología, el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (<http://www.springer-ny.com/bergeysoutline/main.htm>) y *The Prokaryotes* (<http://www.prokaryotes.com>), basan su estructuración del mundo procariota en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula.

La identificación molecular basada en el análisis del ARNr 16S (o del gen que lo codifica) puede representar una ventaja tanto en tiempo como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.

Aunque existen cronómetros moleculares alternativos al ARNr 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Rodicio & Mendoza, 2005):

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.

2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados.

2.3.5. Estudio filogenético usando el gen 16S rDNA

La filogenia (del griego phylon: “tribu, raza” y genea: nacimiento, origen, procedencia”) es la determinación de la historia evolutiva de los organismos. La diversidad genética provee la fuente de materia prima para que la selección natural actúe. La filogenética es el estudio de la filogenia utilizando diagramas tipo árbol para representar los ancestros de esos organismos, haciendo esto a diferentes niveles taxonómicos, incluyendo el árbol universal, formando una reconstrucción de esta relación en base a diversos caracteres homólogos (adquiridos por descendencia directa) tanto morfológicos como moleculares. Las hipótesis filogenéticas resultantes son la base para hacer predicciones (inferencias)

sobre propiedades biológicas de los grupos revelados por la filogenia mediante el mapeo de caracteres sobre la topología (hipótesis evolutiva).

La evolución molecular estudia los mecanismos y procesos que han llevado a la formación de dichos caracteres, desde nivel de posiciones de un codón hasta la organización y estructura genómica y anatómica de un organismo, en un marco de biología comparada en contextos tanto de poblaciones (especies) como de linajes (supraespecífico). Para ello requiere de la hipótesis evolutiva de relaciones entre entidades revelada por una filogenia.

Los caracteres moleculares que están en la forma de secuencias de ADN o de proteínas pueden ser muy útiles para proporcionar una perspectiva de la evolución de los organismos. Esto se debe a que en cuanto a la medida en que los organismos evolucionan, el material genético (genotipo) acumula las mutaciones que causan los cambios fenotípicos (expresión del genotipo, rasgos físicos y conductuales). Gracias a la cantidad masiva de secuencias disponibles en las bases de datos (incluyendo decenas de genomas completos) y la disponibilidad de sofisticados modelos de evolución de secuencias y de su implementación en programas de cómputo muy eficientes, las filogenias moleculares se han vuelto indispensables para examinar todo tipo de cuestiones evolutivas (Roux & Raoult, 1995). La filogenética estudia las mutaciones en las secuencias biológicas (ADN, ARN o proteínas) de una población de individuos con la finalidad de reconstruir su historia evolutiva usando árboles (Rodicio & Mendoza, 2005).

La filogenética se ocupa de determinar la filogenia, y consiste en el estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos, utilizando matrices de información de moléculas de ADN y de morfología (Sleigh & Curson, 2000). Con esta información se establecen los árboles filogenéticos, base de la clasificación filogenética. Esta clasificación forma parte de la sistemática, que además también comprende los sistemas de clasificación fenética y clásica o Linneana. Los árboles filogenéticos se construyen tomando en cuenta la teoría de la evolución, que nos indica que todos los organismos son descendientes de un ancestro común: la protocélula. Así, todos los

organismos, ya sean vivos o extintos, se encuentran emparentados en algún grado (Rodicio & Mendoza, 2005).

2.4. *Agave americana* L.

2.4.1. 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. 5).



Figura 5. Aspecto morfológico de la planta de *Agave americana* L.

Agave americana es una especie polimórfica con numerosas formas cultivadas en varias regiones del mundo 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.

2.4.2. Clasificación taxonómica (Arizaga *et al.*, 2000).

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”.

2.4.3. Distribución y hábitat

La familia Agavaceae es endémica de América (Arizaga *et al.*, 2000). 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). 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 (Fig. 6).

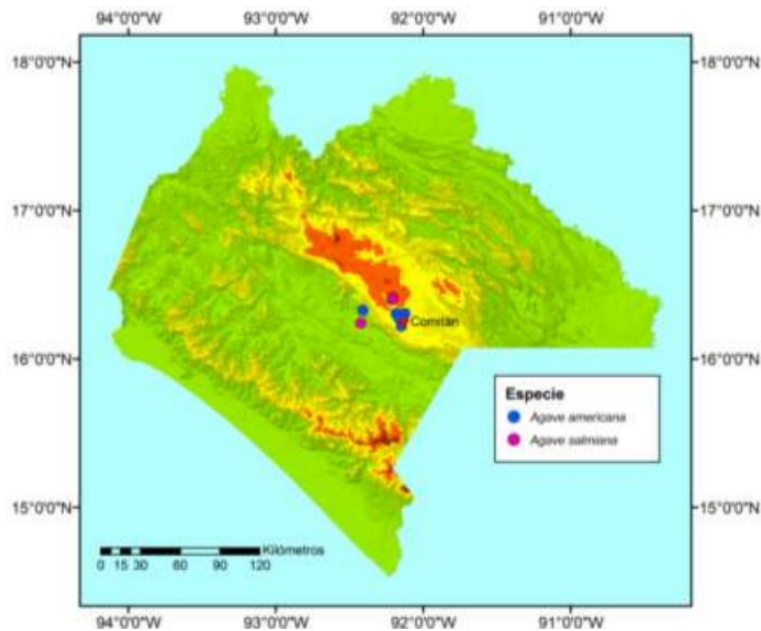


Figura 6. Principales localidades en donde se cultiva el *Agave americana* L. (García-Mendoza, 2002).

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.

2.4.4. 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 *et al.*, 2000). 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. 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 o cultivadas. Con las pencas se preparan específicamente ungüentos o 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, mevalonatoKinasa, aminopeptidasa, lisina, leucina, isoleucina y sucrosa; obtenidos de los análisis realizados en hojas, flores, escapo y tallo.

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 agroindustrial que representa el *Agave americana*, en la región Fronteriza IX del estado de Chiapas, México, se 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.

2.4.5. El cultivo de *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. 2, se presentan las principales localidades con plantaciones de *A. americana* en Chiapas, con la finalidad de lograr su reforestación y aprovechamiento agroindustrial.

Cuadro 2. 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 Sonia, 2011). 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 (Ruiz, 2011).

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 da la plántula. Conforme las plántulas desarrollan más volumen por unidad de área superficial pueden sobrevivir a periodos más largos de sequía (Martínez-Natarén *et al.*, 2005). Las respuestas estomáticas al CO₂, difieren entre las plántulas y los adultos. Las estomas permanecen más tiempo cerradas en las plántulas que los adultos, esta disminución en la entrada de CO₂ ayuda también a la conservación de agua.

2.5. Empleo de las cepas *Pseudomonas* como biofertilizantes

Los biofertilizantes, también conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad.

Aunque el término biofertilizante se empleó inicialmente para facilitar el registro de cepas con fines comerciales, algunos autores mencionan que el término debería ser eliminado ya que sólo algunos microorganismos cumplen estrictamente con la función de incorporar nuevos nutrientes a los ecosistemas, básicamente los microorganismos fijadores de nitrógeno (Bashan *et al.*, 2013).

Los microorganismos poseen una gran diversidad de mecanismos a través de los cuales promueven el crecimiento de las plantas. En función de estos mecanismos se reconocen cuatro grandes grupos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal:

a) Microorganismos que incorporan nitrógeno al sistema planta-suelo mediante la fijación biológica de nitrógeno. Los fijadores de nitrógeno más eficientes son bacterias que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

b) Microorganismos que incrementan la captación de nutrientes y agua.

En esta categoría se pueden mencionar a las micorrizas que juegan un importante papel en absorción de agua, fósforo, zinc, azufre y cobre (Hayman, 1982), y bacterias como *Azospirillum* spp., que incrementan la capacidad de absorción de agua y nutrientes por las plantas mediante la estimulación de su crecimiento radical a través de la producción de hormonas.

- c) Microorganismos que aumentan la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el suelo en formas no asimilables. En esta categoría se incluyen microorganismos que solubilizan fósforo mediante la producción de fosfatasas o ácidos orgánicos (e.g. *Bacillus megaterium* o *Pseudomonas fluorescens*), bacterias oxidadoras de azufre que convierten azufre elemental o cualquier forma reducida de este elemento a sulfatos que son la forma aprovechable por las plantas, y microorganismos productores de sideróforos, como algunas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Flavobacterium* que incrementan la disponibilidad de hierro a las plantas.
- d) Microorganismos que poseen actividades antagónicas contra agentes fitopatógenos. Este mecanismo se sustenta en el hecho de que una planta sana se alimentará y funcionará mejor, además de que será capaz de amortiguar más eficientemente el efecto de deficiencias nutricionales o el impacto de condiciones ambientales adversas. En este grupo se reconocen las propiedades de biocontrol de diferentes especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Flavomonas*, *Curtobacterium* y *Trichoderma*, entre otros (Esitken *et al.*, 2010).

Adicionalmente se han propuesto otras categorías para referenciar los mecanismos a través de los cuales los microorganismos promueven el crecimiento de las plantas:

- a) Biopesticidas o bioplaguicidas.

Incluyen microorganismos que estimulan el crecimiento de las plantas mediante el control de agentes fitopatógenos. Por ejemplo, *Pseudomonas aurantiaca* es una bacteria promotora de crecimiento de color naranja, Gram negativa, aislada originalmente de la rizósfera de papa que produce el compuesto di-2,4 diacetilfloroglucilmetano que es un antibiótico activo contra diversos organismos fitopatógenos del suelo (Felker *et al.*, 2005). Adicionalmente algunos otros microorganismos endófitos, e.g. *Cladosporium sphaerosperum*, *Neotyphodium* sp., *Phomopsis oblonga*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas*

fluorescens poseen actividades de biocontrol contra insectos (Azevedo *et al.*, 2000) o nemátodos (Hallmann *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2009) nocivos para las plantas.

b) Bioestimuladores o fitoestimuladores.

En esta categoría se agrupan microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas usualmente a través de la producción de hormonas. Se ha logrado dilucidar que el principal mecanismo de promoción de crecimiento de *Azospirillum brasilense* se relaciona con su capacidad para estimular el crecimiento radical a través de la producción de ácido indol acético (AIA).

Los beneficios del uso de los biofertilizantes en la agricultura incluyen:

- Aumento de la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes del suelo.
- Reducción de los requerimientos de irrigación y fertilización en los cultivos.
- Aumento del crecimiento y establecimiento de las plántulas.
- Incremento del enraizamiento de esquejes.
- Aumento del vigor de las plántulas y plantas adultas.
- Biocontrol de fitopatógenos.
- Reducción de los tiempos de cosecha (en algunos casos entre 7 y 9 días; (Dibut & Martínez, 2004) y extensión de los tiempos de producción.
- Incremento del rendimiento de los cultivos, tanto en campo como en invernadero.
- Aumento de la calidad de los frutos.
- Compatibilidad con la producción orgánica de los cultivos agrícolas.
- Reducción de la contaminación ambiental a través de la disminución del uso de pesticidas y fertilizantes químicos (Kennedy, 2001).
- Bioremediación de suelos contaminados por derivados del petróleo y metales pesados. Diferentes experimentos han demostrado el gran potencial de las PGPB y micorrizas para la destoxificación de contaminantes orgánicos (Abdul,

2006). En particular, la capacidad de *Burkholderia xenovorans* (antes *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia* o *Burkholderia fungorum*) para degradar pesticidas cloro-orgánicos y bifenilos policlorinados (PCBs) está bien documentada. Existe además la tecnología desarrollada por Kuiper y colaboradores (Kuiper *et al.*, 2001), denominada rizoremediación, en la cual se seleccionan rizobacterias degradadoras de contaminantes que viven sobre, o están cercanas a la raíz, de tal modo que no dependen de su capacidad para asimilar los productos de la degradación de estos químicos sino de los exudados secretados por la planta a través del sistema radical.

Algunos microorganismos poseen una gran diversidad de valores agregados. Por ejemplo, se sabe que algunas cepas de *Pseudomonas* poseen actividades de biocontrol contra fitonemátodos (Haas & Kell, 2003) y algunos moluscos que representan un problema en reservorios de agua (Molloy & Mayer, 2007). Asimismo, algunas especies del hongo de biocontrol *Trichoderma* son productoras eficientes de muchas enzimas extracelulares empleadas en la industria alimentaria y textil. Debido a sus capacidades para degradar polisacáridos complejos poseen además un gran potencial en la producción de biocombustibles lignocelulósicos (Kovacs *et al.*, 2009).

Finalmente, otra ventaja del empleo de microorganismos como un medio para controlar enfermedades en las plantas es que (a diferencia de lo que sucede con los pesticidas químicos) es menos probable que los patógenos desarrollen resistencia ante los microorganismos debido a que muchos de ellos poseen múltiples mecanismos de biocontrol.

III. JUSTIFICACIÓN

El aislamiento de rizobacterias asociadas a plantas para su empleo como biofertilizantes o bioinoculantes ha incrementado significativamente en los últimos años. Lo anterior se debe en gran parte al incremento de los costos en la producción de los fertilizantes químicos empleados para la nutrición de las plantas y también a hecho de que estas sustancias químicas contribuyen al deterioro ambiental.

Los bioinoculantes son microorganismos con potencial biológico para la captación de nutrientes en asociación con las plantas. Una gran variedad de bacterias se han reportado que tienen la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, también pueden solubilizar fosfato, y biosintetizar sustancias reguladores del crecimiento vegetal. Dentro de esta gamma de bacterias benéficas, se encuentran las bacterias *Pseudomonas*. Estas bacterias están distribuidas ampliamente en el ambiente, y pueden ser aisladas del suelo rizosferico, de los tejidos vegetales y de ambientes acuáticos y marinos. Aunque, se conoce que un porcentaje importante de cepas *Pseudomonas* son patógenas o causan enfermedades al hombre, tan existen especies que pueden resultar beneficiosas para su empleo biofertilizantes en los sistemas agrícolas.

En este trabajo se investigó las cualidades multifuncionales de cuatro cepas *Pseudomonas* aisladas del *Agave americana* y también fueron evaluados su potencial como PGPB en pruebas de inoculación y en ensayos de antagonismo contra hongos fitopatógenos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar las características fenotípicas y genotípicas de cepas *Pseudomonas* asociadas al *Agave americana* L. y determinar su potencial como bacterias promotoras del crecimiento de plantas.

4.2. Objetivos específicos

- a) Aislar y cultivar cepas *Pseudomonas* asociadas a la rizósfera del *A. americana* L.
- b) Estudiar características fenotípicas de las cepas *Pseudomonas* aisladas de la rizósfera de *A. americana* L.
- c) Identificar taxonómicamente las cepas bacterianas aisladas del *A. americana* usando herramientas moleculares.
- d) Evaluar el potencial de las cepas *Pseudomonas* como Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPB).

V. METODOLOGIA

5.1. Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas

Las muestras fueron obtenidas a partir de hijuelos (plántulas jóvenes) que crecen en parcelas experimentales (Fig.7.) ubicadas en el municipio de Comitán de Domínguez.



Figura 7. Plantas de *Agave americana* cultivadas en la parcela experimental.

Se colectaron muestras de suelo rizosferico 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 una hielera portátil y posteriormente se almacenaron a 8°C en un refrigerador. La ubicación geográfica de las parcelas en donde se llevó a cabo la colecta se presenta en el Cuadro 3. Así mismo, se registraron datos relacionados con las características climatológicas y edáficas, así también se registró el tipo de vegetación del lugar.

Cuadro 3. 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

A partir de 1 g del suelo de la rizosfera del *Agave americana* L., fueron macerados y diluidos a 100 ml en H₂O destilada (Bashan, 1993). Se realizaron diluciones hasta 10⁻⁶, y a partir de este último se tomó 100 µl. La suspensión bacteriana fue sembrada en cajas Petri conteniendo medio Agar Soya Trypticaseina (TSA) y también en el medio King B (Nishimori *et al.*, 2000). Las cajas fueron incubadas a 28°C por 5 días. Después de este tiempo, se realizó varias resiembras en mismo medio de cultivo hasta obtener cepas puras. Las cepas fueron conservadas en glicerol al 70% a -20°C y otro lote de cepas 8°C fueron conservadas en medio TSA hasta su empleo.

5.2. Caracterización fenotípica de las cepas *Pseudomonas*

5.2.1. Estudio de la morfología celular

La morfología celular de las bacterias fue analizada bajo un microscopio compuesto CARLS ZEIS M-14, usando muestras teñidas y fijadas de acuerdo a la técnica de tinción de Gram. Así también, la movilidad de las células bacterianas fue estudiada de acuerdo a la técnica recomendada por (Hungría *et al*, 2001).

5.2.2. Morfología de las colonias bacterianas en medios de cultivo

La morfología de las colonias bacterianas formadas en el medio de cultivo TSA fue estudiada siguiendo el manual de microbiología de Bergey. Así también, el tiempo de crecimiento de las cepas en el medio de cultivo fue considerado. En esta etapa de la

investigación se observa la capacidad de las cepas para producir exopolisacáridos, así como algún tipo de pigmentos sobre el medio específico King B.

Así también, La producción de acidez o alcalinidad se determinó adicionando el indicador azul de bromotimol. Según el viraje de este indicador, las cepas se calificaron como productoras de alcalinidad, ligera acidez o moderada acidez.

5.3. Aspectos fisiológicos y bioquímicos de las cepas *Pseudomonas*

5.3.1. Crecimiento de bacterias a diferentes grados de temperatura

Las cepas bacterianas fueron evaluadas su capacidad de crecimiento a diferentes grados de temperatura en el medio de cultivo TSA. Las cepas fueron incubadas a temperatura de 37° y 44°C, durante 2-5 días.

5.3.2. Crecimiento de bacterias a diferentes niveles de pH.

Se evalúa la capacidad de crecimiento de las cepas a diferentes niveles de pH: (4, 5, 7, 9 y 11). En este caso se emplearon medios de cultivo TSA líquidos y se ajustó el pH del medio usando buffer de fosfatos para la alcalinización y buffer de acetato de sodio para conseguir el pH ácido correspondiente. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante días.

5.3.3. Capacidad para crecer en diferentes concentraciones de NaCl.

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio TSA adicionado con cloruro de sodio (NaCl) a diferentes concentraciones de salinidad. 0.5 %, 1%, 2%, 3%, 4% y 5%. Las cajas fueron incubadas a 28°C durante días.

5.3.4. Tolerancia a metales pesados (Al^{2+} y Cu^{2+})

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio sólido TSA a 28°C enriquecido con metales pesados. Un grupo de cepas fue cultivado en presencia de Al^{3+} (500 $\mu g\ ml^{-1}$ de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$) y el otro grupo fue tratado con Cu^{+2} (100 $\mu g\ ml^{-1}$ de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$). Las cepas fueron incubadas a 28°C y su capacidad de crecimiento en estos medios fueron evaluados después de 72 hrs de cultivo.

5.3.5. Resistencia intrínseca a los antibióticos

Para esta prueba cada una de las cepas fueron sembradas en medio TSA y bajo condiciones asépticas se colocaron los discos antibiogramas (Cuadro 4) específicos para bacterias Gram negativas y se incubó a 28°C, durante 48 horas. Al término del periodo de incubación se midió con un Vernier el halo de inhibición de los antibióticos al crecimiento de la bacteria.

Cuadro 4. Características de antibiogramas que se utilizaron evaluar la resistencia intrínseca de las cepas *Pseudomonas*

Antibiótico	Concentración del disco. ($\mu\text{g mL}^{-1}$).
Amikacina	10
Ampicilina	100
Carbencilina	20
Kanamicina	100
Cloranfenicol	100
Gentamicina	10
Netilmicina	20

5.4. Caracterización genotípica de las cepas *Pseudomonas*

5.4.1. 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 μl de las cepas diluidas en 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 μl de buffer de lisis, las células fueron resuspendidas con agitación suave y se agregó 10 μl 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 5 μl 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 60 μl 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 min 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 min.

Las muestras se corrieron en una electroforesis usando un gel de agarosa al 1% para comprobar la calidad de la extracción y posteriormente fueron guardadas a -20°C para su posterior uso.

5.4.2. Análisis de huellas genómicas

Para conocer la huella genómica de cada cepa aislada, se realizó la técnica de ERIC-PCR para agruparlas por similitud entre los patrones de electroforesis obtenidos por cada cepa. Se realizó el PCR para ERIC utilizando un termociclador modelo 2720 de la marca *Applied Biosystems*, usando los primers ERIC₁ y ERIC₂ descritos por (Versalovic *et al.*,1991), para esto se preparó la mezcla de reacción indicada en el Cuadro 5. Posteriormente la mezcla realizada para ERIC se dividió en 103 tubos para PCR, colocando 9.2 µl en cada uno de ésta, a los cuales se les agregó 0.8 µl de DNA total previamente extraído, para posteriormente ser amplificado.

Cuadro 5. Mezcla de Reacción para ERIC-PCR.

Reactivos	1tubo (10 µl)
Buffer 10x	1
DMSO 10%	1
MgCl ₂	1.52
dNTP's	1.24
ERIC 1	0.2
ERIC 2	0.2
Taq polimerasa	0.08
H ₂ O miliQ	3.96
Total	10

5.4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la prueba de huellas genómicas (ERIC).

Se utilizó el siguiente programa en el termociclador para PCR de ERIC (Fig. 8).

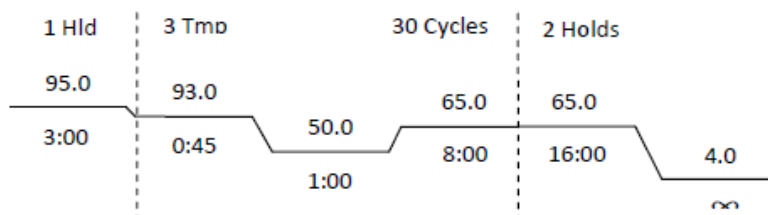


Figura 8. Programa utilizado para amplificar ERIC-PCR.

5.4.4. Electroforesis del ERIC-PCR

Los productos de ERIC-PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1.5%, colocando 5µl de producto de PCR de cada muestra, 2.5µl de buffer de carga y 2µl de marcador de peso molecular (1kb). Las muestras se corrieron a 115 Volts por 40 minutos.

5.4.5. Amplificación del gen 16S ADNr

Se amplificó el gen 16S ADNr, a partir del ADN total extraído de las cepas, usando los primers rD1 y fD1 (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 6.

Cuadro 6. Mezcla de Reacción para amplificar el gen 16S rDNA.

Reactivo	1 Tubo (μL)
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
Total	10

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

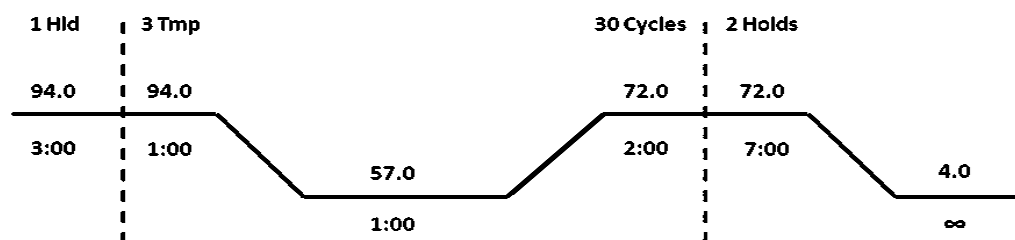


Figura 9. Programa utilizado para amplificar 16S rDNA.

5.4.6. Análisis de restricción del gen 16S ADNr amplificado (ARDRA)

Utilizando los productos de PCR del gen 16S ADNr de cada cepa, se realizó una digestión con una enzima de restricción (Rsa I) para agrupar las cepas con el mismo patrón de corte. Para estas digestiones se preparó una mezcla de reacción, colocando 7.2µl de H₂O, 1µl de Buffer, 0.3µl de Enzima y 1.5µl del producto de PCR del gen 16S, para obtener un volumen total de reacción de 10µl. La digestión se dejó por 24 horas a 37 °C.

5.4.7. Electroforesis de ARDRA

Los productos digeridos enzimáticamente se colocaron en un gel de agarosa al 3% y se corrieron en una cámara de electroforesis a 130 V durante 40 minutos. Posteriormente los gels se tiñeron en 300 ml de agua destilada con 40 µl de bromuro de etidio (5mg/ml) en agitación constante durante 5 minutos.

5.4.8. Purificación y secuenciación del gen 16S ADNr

Los productos de PCR para amplificar el gen 16S fueron purificados, para liberar al fragmento amplificado de los residuos de la PCR, usando el kit “*PCR product purification system*” de la marca RocheTM. 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* y enviados para su secuenciación a la empresa MACROGEN.

5.4.9. 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. 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).

5.5. Estudio de las características multifuncionales de las cepas *Pseudomonas*

5.5.1. Capacidad para biosintetizar auxinas

Las bacterias se cultivaron en matraces Erlenmeyer que contenían 50 ml de medio YMA: Compuesto de manitol (0,25 g L⁻¹), K₂HPO₄ 10% (5 ml L⁻¹), MgSO₄ 10% (2 ml L⁻¹), NaCl 10% ml de L⁻¹), CaCO₃ (1 g L⁻¹) y extracto de levadura (3 g L⁻¹) a un pH de 6,8, suplementado con 100 mg mμ L⁻¹ de L- triptófano. Después de la incubación a 30° C en un agitador rotativo durante 48 h, el medio de cultivo se centrifugó a 5000 g durante 10 min y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,22 μm. Los niveles de AIA en los sobrenadantes filtrados de cada cepa se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una serie de modelos PerkinElmer 200A equipada con una columna SupelcoLiChrosorb RP C18 (5 μm, 4,6 x 150 mm). La fase móvil fue acetonitrilo – KH₂PO₄ 50 mM (pH 3) (30/70) a un flujo de 1 ml min⁻¹. Los eluidos se analizaron con un detector de red de diodos a 220 nm, y el IAA se cuantificó

integrando el área bajo el pico; Se utilizó como estándar un AIA auténtico (Sigma). El AIA producido por cada cepa se midió por triplicado (Zakharova *et al.*, 2001).

5.5.2. Potencial para solubilizar fosfato

Los aislados se cultivaron individualmente en medio de caldo YM durante la noche, y la densidad óptica OD⁶⁰⁰ nm se ajustó a 1,0. Las células se lavaron dos veces en solución esterilizada de Ringers al 0,85% antes de inocular en medio de crecimiento de fosfato (Nautiyal, 1999) del Instituto Nacional de Investigaciones Botánicas, que contenía fosfato tricálcico insoluble (Ca₃ (PO₄)₂). El pH del medio NBRIP se ajustó a 7,0 antes de la autoclave. Las cepas se inocularon en viales de 20 ml que contenían medio NBRIP y se incubaron a 30° C en un agitador (150 rpm) durante 5 días. Después de la incubación, se tomaron 5.0 ml de cada cepa y se centrifugaron, y se registró el pH del sobrenadante. Se estimó el contenido de fósforo disponible en el sobrenadante del cultivo así como el testigo (sobrenadante obtenido a partir de medio no inoculado con bacterias) usando el método colorimétrico de vanado-molibdato (Fiske & Subbarow, 1925) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Cada tratamiento se replicó tres veces.

5.5.3. Capacidad para fijar N₂ atmosférico

La capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas de PGPB se determinó mediante la actividad de reducción de acetileno (Burris, 1972). Los tubos se sellaron con tapones de caucho después de la inoculación y luego se incubaron durante 24 h en medio NFB (Döbereiner *et al.*, 1976). Se retiró el 10% del aire de cada tubo y se inyectó un volumen igual de acetileno usando una jeringa, antes de incubar los tubos a 30°C durante 24 horas. Se preparó un tubo de control paralelo no inoculado. Se tomó una muestra de aire de 100 µl y se determinó la cantidad de etileno producido a partir de acetileno mediante cromatografía de gases (Perkin Elmer, EE.UU.). El valor de ARA se informó como [ARA nmol C₂H₄ por cultivo h⁻¹].

5.5.4. Capacidad para producir sideróforos

Todas las cepas se ensayaron para la producción de sideróforos mediante el ensayo de placa de cromo Azurol S (CAS) como se describe por (De Jesús *et al.*, 2014).

Brevemente, las cepas se hicieron crecer en medio TSB a 30° C durante 24 h. Después, las cepas se inocularon en placas que contenían medio CAS y se incubaron a 30°C durante 48-72 h. La formación de un halo naranja alrededor de las colonias bacterianas en crecimiento confirmó la producción de sideróforos.

5.6. Evaluación del potencial antifúngico de cepas *Pseudomonas*

Las cepas *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*, previamente reportadas como hongos patógenos de plantas de agave (Ávila-Miranda *et al.*, 2012), fueron utilizadas para ensayos de antagonismo. Las cepas de *Pseudomonas* se ensayaron para el antagonismo in vitro hacia patógenos fúngicos siguiendo una técnica de co-inoculación estándar en PDA (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2015). Brevemente, se tapones bacterianos (6 mm de diámetro) fueron removidos de un cultivo de 48 h y se transfirieron al centro de las placas PDA, que habían sido inoculadas con suspensión de esporas fúngicas (10^6 conidias ml^{-1}). Las placas de ensayo se incubaron a 28°C durante 5 días. Se midió la inhibición del crecimiento apareciendo alrededor de los tapones bacterianos. Este experimento se realizó por triplicado.

5.7. Evaluación de potencial de las cepas *Pseudomonas* como PGPB

La eficiencia de las cepas ACO-17B, ACO-21B, ACO-53 y ACO-106 se evaluó en una prueba de inoculación. Se plantaron plántulas de *A. americana*, previamente obtenidas mediante micropropagación, en bandejas de poliestireno que contenían turba como sustrato (el pH de la turba se ajustó a 6,7 usando 35 g de Na_2CO_3 por cada 100 g de material) y se cubrió con una lámina de polietileno para mantener la humedad y prevenir la deshidratación. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28°C y 38% de humedad relativa (RH) con un fotoperiodo de 14 h de luz/10 h de oscuridad (Ruíz-Valdiviezo *et al.* 2015). Después de dos meses (60 días después del trasplante), las plantas se transfirieron a macetas que contenían turba humedecida con medio Fahraeus libre N como nutriente y se colocó en el invernadero a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (iluminación natural). Las plantas se inocularon con cada una de las cepas de PGPR, con 2 ml de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 CFU mL^{-1} . Las plantas sin inóculo y otras tratadas con 30 mg de $\text{KNO}_3\text{-N}$ por planta, sirvieron como control. Se utilizaron

cuatro repeticiones por tratamiento (cepa PGPR), y se dispusieron en un diseño completamente al azar. Las plantas se cultivaron bajo condiciones de invernadero durante 90 días. Las mediciones de las plantas, el peso fresco, el diámetro del tallo, el número de hojas y la longitud de las raíces se llevaron a cabo en las plantas durante la fase de trasplante (m1) y después de 90 días (m2) en el invernadero.

5.8. Análisis estadístico de datos

El efecto de las cepas sobre el crecimiento de las plantas y la actividad antifúngica, la actividad de P-solubilización, ARA, las giberelinas y la producción de IAA se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

VI. RESULTADOS

6.1. Características fenotípicas de las cepas bacterianas

En este estudio, las cepas ACO-17B, ACO-21B, ACO-53 y ACO-106 aisladas de *A. americana* presentaron características fenotípicas similares con especies de *Pseudomonas* (Cuadro 7). Las células son Gram-negativas, móviles, en forma de bacilo, no formadoras de esporas, aeróbicas y de rápido crecimiento.

Con respecto las características fenotípicas de las cepas bacterianas. En el medio TSA, las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 formaron colonias circulares de color amarillo crema de 1,5 y 2,5 mm de diámetro con un aspecto brillante. La cepa ACO-53 formó colonias circulares de color blanco crema, con bordes regulares, que abarcaban entre 1,0 y 1,5 mm de diámetro. Éstos tenían un aspecto mucoso, que se debe a exopolisacáridos (EPS) producidos por bacterias. Además, se produjo un pigmento fluorescente en medio King B por las cuatro cepas.

En relación con los aspectos fisiológicos, La temperatura óptima de crecimiento fue de 30° C. Las cuatro cepas pueden crecer a 37°C, pero no a 44 o 50°C. Las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 pueden crecer en un amplio rango de pH entre 4,0 y 11,0. Por el contrario, la cepa ACO-53 sólo crece entre un pH de 5,0 y 9,0. En cuanto a la tolerancia al NaCl, las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 son capaces de crecer en un intervalo de NaCl de 0,5 a 5,0%, con la excepción de la cepa ACO-53, que tolera sólo hasta el 3,0% de sal. Sin embargo, esta última cepa fue la más resistente a los antibióticos probados en comparación con otras cepas. También se determinó que todas las cepas tienen la capacidad de crecer en presencia de Al^{+3} y de Cu^{+2} . Además, este estudio muestra que las cuatro cepas tuvieron la capacidad de producir sideróforos.

Cuadro 7. Características que distinguen cepas de *Pseudomonas* aisladas de *Agave americana* de taxones filogenéticamente cercanos.

Características	<i>Pseudomonas</i> aisladas de <i>A. americana</i>			
	ACO-17B	ACO-21B	ACO-53	ACO-106
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)	(-)
Aspecto de la colonia en medio TSA:	Amarillo-crema Brillosa	Amarillo-crema brillosa	Blanca-crema mucoide	Amarillo-crema brillosa
Producción de pigmento fluorescente en medio King B	+	+	+	+
Crecimiento sobre Agar TSA a:				
37°C	+	+	+	+
44 °C	-	-	-	-
Crecimiento en medio TSA a diferentes pH a 28° C:				
4.0	+	+	+	+
5.0	+	+	+	+
7.0	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+
11.0	+	+	-	+
Tolerancia a NaCl:				
0.5 %	+	+	+	+
1.0 %	+	+	+	+
2.0 %	+	+	+	+
3.0 %	+	+	+	+
5.0 %	+	+	-	+
Tolerancia antibioticos (ug mL ⁻¹):				
Ampicilina (100)	+	+	+	+
Amikacina (10)	-	-	+	-
Carbencilina (20)	+	+	+	+
Cloramfenicol (100)	-	-	-	-
Gentamicina (10)	-	-	+	-
Kanamicina (100)	+	+	+	+
Netilmicina (20)	-	-	+	-
Tolerancia a metales (ug mL ⁻¹):				
Al ⁺³ (500)	+	+	+	+
Cu ⁺² (100)	+	+	+	+
Producción de sideroforos	+	+	+	+

6.2. Identificación molecular de las cepas bacterianas

La posición taxonómica de las cepas se determinó mediante el análisis filogenético realizado con secuencias parciales del gen 16S ADNr (Fig. 10). Las cuatro cepas se relacionaron con el género *Pseudomonas*. Las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 mostraron una similitud genética de 98,6% con *P. plecoglossicida* y la cepa ACO-53 tuvo un 99,0% con *P. putida* IAM. Las secuencias se depositaron en el Gen Bank bajo el número de acceso: KU869715-KU869718.

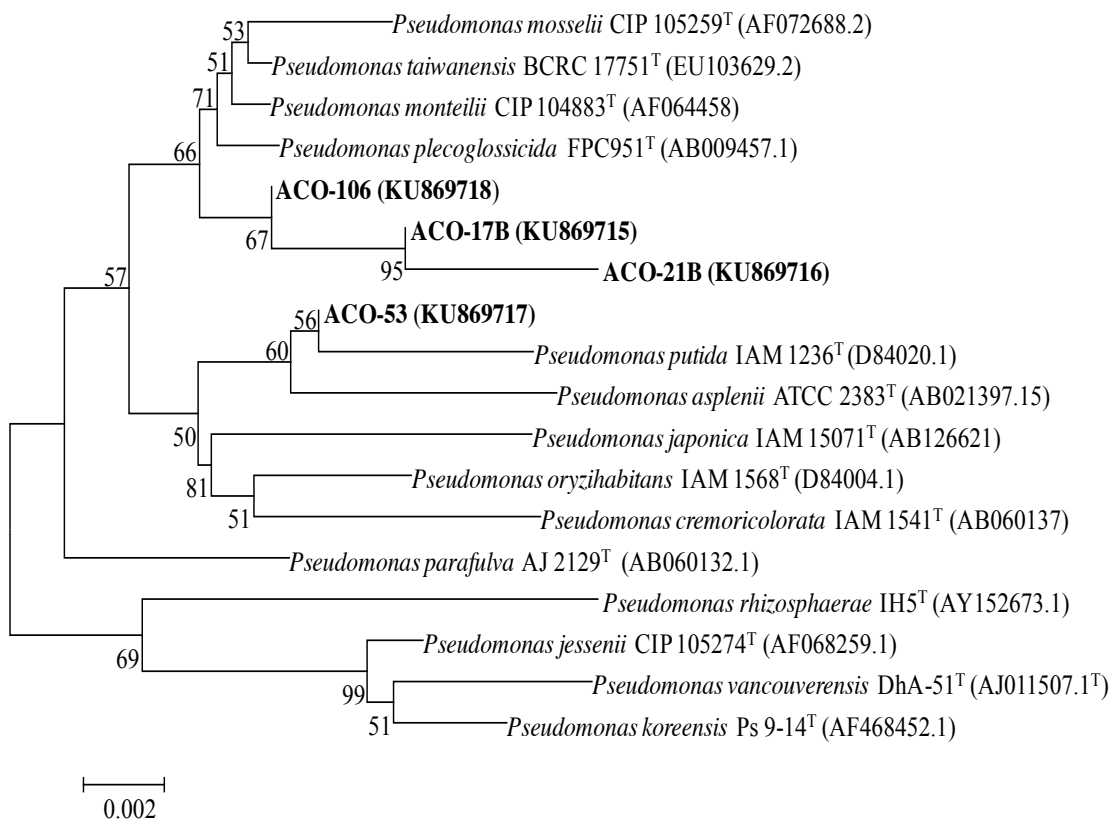


Figura 10. Árbol filogenético basado sobre las secuencias del gen 16S ARNr de las cepas *Pseudomonas* aisladas de *Agave americana*. Los números de acceso de las secuencias son indicados dentro de paréntesis. Los generados en este estudio se muestran en negrita.

6.3. Eficiencia del potencial de las cepas *Pseudomonas*

El potencial de las cepas de *Pseudomonas* como PGPB se evaluó en base a la capacidad de Solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, auxinas (AIA) y producción

de giberelinas (GA₃). En este estudio, la Solubilización del fosfato inorgánico por las cuatro cepas de *Pseudomonas* fue acompañada por una disminución significativa del pH después de 72 h (Cuadro 8). La máxima solubilización en P se registró mediante la cepa ACO-53 con una caída máxima en el pH de 4,3. La biosíntesis de las fitohormonas por las cepas de *Pseudomonas* mostró que todos diferían en su capacidad para producir AIA y GA₃ (Cuadro 8). Después de 72 h de crecimiento, la producción de AIA fue significativamente mayor en la cepa ACO-53 en comparación con las otras cepas. La producción de giberelinas por cepas de *Pseudomonas* mostró que la cepa ACO-53 produjo una cantidad significativamente mayor de GA₃. Además, la cepa ACO-53 mostró actividad nitrogenasa máxima en comparación con las otras cepas (Cuadro 8). Por lo tanto, esta cepa mostró el potencial para producir AIA y solubilizar el fosfato, así como la capacidad de fijación de nitrógeno. Estos resultados son importantes porque el nitrógeno y el fósforo son elementos clave para el crecimiento y el metabolismo de plantas de *Agave americana* (Ávila-Miranda *et al.*, 2012).

Cuadro 8. Solubilización de fosfato, producción de AIA y AG₃, y actividad de reducción de acetileno (ARA) en las cepas aisladas de *Agave americana*.

Cepa	Solubilización de P [tamaño del halo(mm)]	AIA (µg mL ⁻¹)	GA ₃ (µg mL ⁻¹)	ARA [§]
ACO-17B	6.35 C*	9.22C	3.42 B	140.45 C
ACO-21B	5.67 C	8.97C	2.95 BC	143.13 C
ACO-53	9.07 A	17.60A	4.52 A	210.02 A
ACO-106	7.92 B	12.55 B	2.75C	172.81 B
HSD [‡] (P≤0.05)	0.88768	3.07591	0.624364	21.5049

*Valores medios de tres repeticiones. Medias con diferentes letras son diferentes estadísticamente (Tukey, P<0.05).

§ARA: Ensayo de reducción de acetileno (nmol C₂H₄ por peso fresco de cultivo h⁻¹).

‡HSD: Diferencia Significativa Honesta.

6.4. Potencial para la Promoción del Crecimiento de Plantas por *Pseudomonas*

Además, se evaluó la eficiencia de las cepas de *Pseudomonas* como PGPB en ensayos de inoculación en plantas *A. americana*. La inoculación con cepas de *Pseudomonas* tuvo un efecto significativo en el crecimiento de plantas *A. americana* (Fig. 11). Las plantas inoculadas con la cepa ACO-17B registraron mayor peso que las que permanecieron sin inocular (Cuadro 9). Las plantas de agave inoculadas con las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 mostraron efectos similares al diámetro del tallo, en comparación con las plantas no inoculadas. El número de hojas obtenidas con ACO-17B fue significativamente diferente en comparación con el resto de los tratamientos. La longitud de la raíz fue mayor en las plantas inoculadas con las cepas ACO-17B y ACO-21B.

Cuadro 9. Parámetros de crecimiento de las plantas de *Agave americana* inoculadas con las cepas *Pseudomonas*.

Tratamiento	Peso fresco de planta (g)	Diámetro de tallo (cm)	Numero de hojas	Longitud de raíz (cm)
ACO-17B	4.69 A*	1.11 A	5.0 A	12.50 A
ACO-21B	4.18 B	1.11 A	4.5 AB	12.60 A
ACO-53	3.98 B	1.01 AB	4.0 B	11.15 AB
ACO-106	4.10 B	1.07 A	4.0 B	11.25 AB
KNO ₃ -N	3.54 BC	0.86 B	3.0 C	10.95 B
no-inoculadas	3.22 C	0.64 C	3.0 C	10.35 B
HSD [§] (P≤ (0.05))	0.575362	0.175213	0.529854	2.05075

*Valores medios de tres repeticiones. Las medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

§HSD: Diferencia Significativa Honesta.

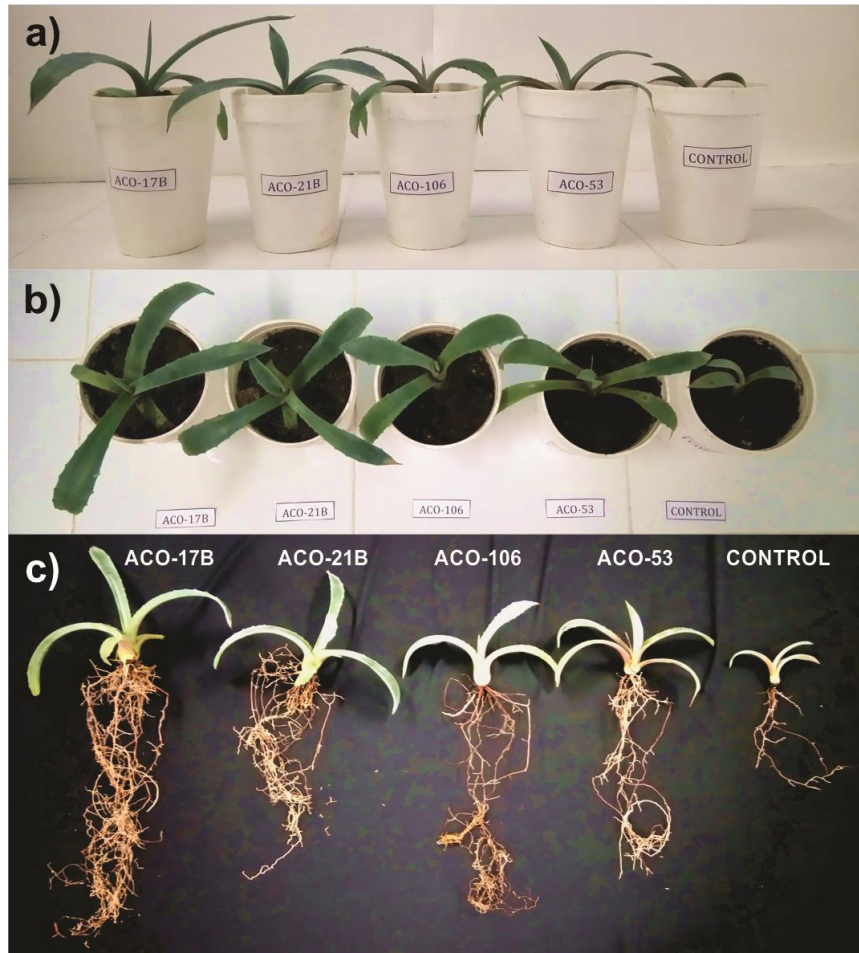


Figura 11. El efecto de las PGPB sobre el crecimiento de las plantas de *Agave americana*. a) Diferencias sobre el crecimiento (vista frontal) entre las plantas inoculadas y no inoculadas. b) Aspecto del crecimiento de las plantas inoculadas y no inoculadas (Vista superior). c) Volúmen del brote y la raíz de las plantas inoculadas y no inoculadas.

6.5. Actividad antifúngica

En cuanto al ensayo de antagonismo, las cuatro cepas de *Pseudomonas* mostraron una actividad antifúngica de amplio espectro contra hongos fitopatógenos (Cuadro 10). La cepa ACO-106 inhibió significativamente el crecimiento miceliano de *Fusarium oxysporum*, y también mostró antagonismo contra *Rhizoctonia solani*. La cepa ACO-53 mostró las zonas de inhibición más grandes contra *Fusarium solani*. *Fusarium verticillioides* fue significativamente inhibido por ACO-21B.

Cuadro 10. Actividad antifúngica de las cepas *Pseudomonas* aisladas de *Agave americana*.

Cepa	Hongos evaluados y diámetro de inhibición (mm)			
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
ACO-17B	24.6±0.57A*	20.6±1.52B	18.3±0.57C	33.6±1.52A
ACO-21B	21.0±1.0B	19.3±1.15BC	16.6±0.57C	25.6±0.57B
ACO-53	15.6±0.57C	17.6±0.57C	22.6±1.15B	24.6±0.57B
ACO-106	10.6±1.15D	24.6±0.57A	28.6±0.57A	18.6±0.57C
HSD § ($P \leq 0.05$)	2.2636	2.72051	1.99631	2.38604

*Valores medios de tres repeticiones. Las medias con diferente letra son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

§HSD: Diferencia Significativa Honesta.

VII. DISCUSIÓN

La investigación de las cepas de PGPB de diferentes plantas con potencial para ser usadas como inoculantes ha aumentado en los últimos años, y muchas están comercialmente disponibles. PGPB constituyen un grupo heterogéneo y beneficioso de microorganismos que pueden encontrarse en la rizosfera, en la superficie de las raíces o en asociación con la planta huésped. Varias especies de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de las plantas y del suelo han demostrado una alta eficiencia como biofertilizantes y también para el control biológico de enfermedades de las plantas causadas principalmente por hongos fitopatógenos (Laslo *et al.*, 2012, Bashan *et al.*, 2014). En este estudio, las cepas ACO-17B, ACO-21B, ACO-53 y ACO-106 aisladas de la rizósfera de *Agave americana* presentaron las mismas características fenotípicas de las especies de *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000). La producción de exopolisacáridos (EPS) fue una de las principales características que distinguieron estas cepas bacterianas. La cepa ACO-53, mostró el mayor nivel de producción de exopolisacáridos.

El EPS forma una capa protectora para las bacterias, que permite la tolerancia al estrés abiótico y también ayuda a los microorganismos a unir y colonizar irreversiblemente las raíces debido a la participación de una red de material fibrilar que conecta permanentemente las bacterias a la superficie de la raíz (Bashan *et al.*, 2014, Sandhya & Ali, 2015). Además, se produjo un pigmento fluorescente en medio King's B por las cuatro cepas. Los miembros de las *Pseudomonadas* producen un pigmento verde-amarillo fluorescente soluble en agua denominado pseudobactina o pideverdina. Esta característica se utiliza comúnmente para la identificación de especies de *Pseudomonas* (Santoro *et al.*, 2016). Además, las pruebas fisiológicas permitieron determinar otras características importantes en las cepas evaluadas. Estos resultados indicaron que las cualidades biológicas que diferencian estas cepas incluían su capacidad para crecer en un amplio rango de pH, así como su capacidad para tolerar diferentes concentraciones de NaCl y metales pesados (Al y Cu). Las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 lograron crecer en NaCl al 5,0%. Este resultado es de gran importancia porque la salinidad es uno de los factores ambientales más severos que impiden un alto rendimiento de los cultivos, y la mayoría de las plantas agrícolas son

sensibles a una alta concentración de sal en el suelo. Por lo tanto, PGPB actúan como una de las herramientas más eficaces para el alivio del estrés salino. PGPB, como *Pseudomonas fluorescens*, puede producir ácido oxálico, que también puede ser un posible mecanismo para reducir la toxicidad del Al (Appanna *et al.*, 2003). Además, estas cuatro cepas eran resistentes a varios antibióticos, lo que podría ser importante porque podría proteger a la planta contra los fitopatógenos y establecer un área en la rizósfera con una mayor capacidad de asimilar los nutrientes del suelo. Fue interesante que las cepas tuvieran la capacidad de producir sideróforos. También se sabe que las rizobacterias productoras de sideróforos imparten resistencia sistémica inducida a las plantas y supresión al suelo y han estado implicadas en el control biológico de varias enfermedades de las plantas (Saha *et al.*, 2016).

El análisis filogenético realizado con secuencias parciales del gen 16S ADNr reveló que las cuatro cepas se relacionaron con el género *Pseudomonas*. Las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 mostraron una similitud genética del 98,6% con la cepa tipo *P. plecoglossicida* FPC 951T (Nishimori *et al.*, 2000) y ACO-53 tiene un 99,0% con *P. putida* IAM 1236T (Anzai *et al.*, 2000). El gen 16S rDNA se utiliza comúnmente para la identificación taxonómica de las especies *Pseudomonas*. En base a los análisis filogenéticos del gen rRNA 16S, se identificaron cepas fluorescentes aisladas de suelo rizosférico como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mosselii*, *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. putida*, *P. fulva* y *P. fluorescens* (Naik *et al.*, 2008). En base a estos resultados, se consideró analizar la capacidad de solubilizar el fosfato para estas cuatro cepas debido al hecho de que se han realizado investigaciones con diferentes géneros de bacterias (Ambrosini *et al.*, 2016), donde principalmente especies de *Pseudomonas*, como *P. Fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. graminis* y *P. rhizosphaerae* como solubilizantes de fosfato (Jha *et al.*, 2009; Yunyoung *et al.*, 2015). También, la producción de AIA y GA₃ (Hayat *et al.*, 2010), que son de gran interés para mejorar el rendimiento en la agricultura, han sido resultados positivos que confirman que estas especies de *Pseudomonas* son consideradas promotoras del crecimiento de las plantas. Después de los resultados analizados indica que estas cuatro cepas tienen capacidad de producción de AIA y GA₃ y pueden ser consideradas como promotoras del crecimiento de las plantas.

Además, las especies de *Pseudomonas* han sido aisladas de diferentes especies de plantas u otras fuentes naturales y han mostrado un alto potencial de fijación de nitrógeno, y por lo tanto han mostrado otras características biológicas deseables para su uso como biofertilizantes (Bashan & De Bashan, 2005). Resultados similares han sido reportados por (De Jesús *et al.* 2014), que se refieren a la aparición y diversidad de bacterias diazotróficas en suelo de rizosfera y tejidos de raíces y hojas de plantas de *Agave sisalana*, así como para probar su potencial para la promoción del crecimiento de las plantas. Por lo tanto, las cepas PGPB de este estudio podrían constituir una alternativa como un biofertilizante de *A. americana*, con el fin de mejorar su crecimiento y desarrollo.

El principal mecanismo de actividad antagonista utilizado por *Pseudomonas* es la secreción de sideróforos (como pseudobactina), que tiene un efecto antagónico en hongos fitopatógenos debido a la competencia por el hierro (Jha *et al.*, 2009); Ambos microorganismos tienen la capacidad de secretar estas sustancias y la afinidad que presenta el Fe determina la actividad antagonista, este metal es importante para las células bacterianas porque es necesario activar la síntesis de propiedades antimicrobianas de los metabolitos secundarios (Ambrosi *et al.*, 2000). El *Pseudomonas* sp. La cepa Ps5, aislada del suelo rizosférico de diferentes cultivos, mostró actividad antifúngica de amplio espectro contra *Aspergillus*, una o más especies de *Fusarium* y *Rhizoctonia bataticola* (Ahmad *et al.*, 2008).

VIII. CONCLUSIONES

Esta investigación se encontró que las cuatro cepas bacterianas aisladas de la rizósfera del *Agave americano* se relacionaron con el género *Pseudomonas*. Las cepas ACO-17B, ACO-21B y ACO-106 mostraron una similitud genética de 98,6% con *P. plecoglossicida* y la cepa ACO-53 tuvo un 99,0% con *P. putida* IAM. Las cepas *Pseudomonas* demostraron ser capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fosfato, sintetizar auxinas (AIA), giberelinas (GA₃) y producir sideróforos. Además, demostraron actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides* y *Rhizoctonia solani*, lo que sugiere que estas cepas tienen un alto potencial para ser usadas como Bacterias Promotores de Crecimiento de Plantas (PGPB), en especial esta importante especie de agave.

IX. RECOMENDACIONES

Este trabajo permitió apreciar el potencial de cuatro cepas *Pseudomonas* y se logró determinar mediante pruebas in-vitro la capacidad antifúngica y el potencial como PGPB. Sin embargo, es necesario realizar ensayos a nivel de campo para poder evaluar este potencial biológico de las cepas. También se sugiere explorar más cualidades bioquímicas y moleculares de estas cepas *Pseudomonas*, en específico, las actividad enzimática, huellas genómicas y expresión genética relacionada con la biosíntesis de metabolitos y/o sustancias químicas involucradas con la capacidad antifúngica de estas cepas bacterianas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, G.K. 2006. Mycorrhizoremediation-an enhanced form of phytoremediation. J. Zhejiang Univ. 7:503-514.
- Ahmad, F., I. Ahmad & M.S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research 163(2): 173-181.
- Anzai Y, Kim H, Park, JY, Wakabayashi H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol 50: 1563-89. PMID 10939664.
- Arizaga S., Ezcurra E., Peters E., Ramírez de Arellano F., y Vega E. 2000. Pollinator ecology of *Agave macroacantha* (agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. America Journal of Botany 87(7):1004–1010.
- Ambrosi, C., L. Leoni, L. Putignani, N. Orsi & P. Visca. 2000. Pseudobactin biogenesis in the plant growth-promoting rhizobacterium *pseudomonas* strain b10: identification and functional analysis of the l-ornithine n5-oxygenase (psba) gene. Journal of bacteriology 182(21): 6233-6238.
- Ambrosini, A., R. De souza, L.M.P. Passaglia. 2016. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. Plant and soil 400(1): 193-207.
- Arnold, L. D., & Viswanatha. T.1983. The use of bis(mercaptoacetato-S,O) hydroxoiron (III) complex for the determination of hydroxamates. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 8:307-320.
- Appanna, V.D., R.D. Hamel & R. Lévasseur. 2003. The metabolism of aluminum citrate and biosynthesis of oxalic acid in *Pseudomonas fluorescens*. Current microbiology 47(1): 32-39.
- Ávila-Miranda, M.E., C. León-Campos, J.J. Peña-Cabriales, M.A. Rodríguez-Mendiola, N.A. Mancilla-Margalli, F. González-Pérez & C. Arias-castro. 2012. Genetic diversity and vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum* cause of wilt symptoms in agave (*Agave tequilana* weber var. Azul). Gayana Botanica 69: 40-48.

- Azcon B. J., Talón M. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. España. pp 522.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, J.E JR., Pereira, O. and Ara, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electr. J. Biotech.* 3:40-65.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.
- Bashan, Y., L.E. De-Bashan. 2005. Bacteria/plant growth-promotion. In *encyclopedia of soils in the environment*. Hillel, d, pp.103-115.oxford, uk.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., y de-Bashan, L. E. 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and fertility of soils.* 1-2.
- Bashan, Y. L.E. De-bashan, S.R. Prabhu, J.P. Hernandez. 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil* 378:1–33.
- Bashan, Y., y Holguin, G. 1993. Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. *Microbiology.* 139(2), 379-385.
- Barrero AF, Oltra JE, Cabrera E, Herrador MM, Rojas FJ, Reyes JF, Godoy F.1992. Gibelactol, a diterpenoid from *Gibberella fujikuroi*. *Nat. Prod. Lett.* 1: 155-160.
- Beale MH, Bearder JR, Down GH, Hutchison M, MacMillan J, Phinney BO.1982. The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 21: 1279-1287.
- Bhattacharyya, P.N. & D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World journal of microbiology and biotechnology* 28(4): 1327-1350.
- Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.
- Burriss RH. 1972. Nitrogen fixation assay—methods and techniques. *Methods Enzymol* 24:415-431.

- Camelo, M.; Vera, S.P.; Bonilla, R.R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12: 159-166.
- Da Mota F.F., E.A. Gomes, E. Paiva,, A.S. Rosado, L. Seldin. 2004. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 39:34–40.
- Dahllöf IF, Harriet Baillie, Staffan Kjelleberg. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity.
- De Jesús, S.A.F., M.C.Y. Santos, S.P. Oliveira, C.E. Barbosa, B.H. Ramos, S.A.P. Suarez, O.L. Muniz, J.T. De Souza & S.A.C. Fermino. 2014. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* perrine ex engelm): potential for plant growth promotion. *Plant and Soil* 385(1): 37-48.
- De La Torre-Ruiz, N., V.M. Ruiz-Valdiviezo, C.I. Rincón-Molina, M. Rodríguez-Mendiola, C. Arias-Castro, F.A. Gutiérrez-Miceli, H. Palomeque-Dominguez, R. Rincón-rosales. 2016. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Brazilian journal of microbiology* 47(3): 587-596.
- Delgado-Lemus, A., I. Torres, J. Blancas, A. Casas. 2014. Vulnerability and risk management of agave species in the tehuacán valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 10: 1-15.
- Dibut, A.B. y Martínez, VR. 2004. Biofertilizantes y Bioestimuladores. Métodos de inoculación. In: *Manual sobre Agricultura Orgánica Sostenible*. FAO.
- Díaz-de la Osa, A; Marulanda-Moreno, S; de la Fe-Pérez, Y; Hernández-Rodríguez, A; Restrepo-Franco, G M; Lucia-Baldani, V. 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 46(1) 63-76.
- Dixon, R. y Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2(8), 621-631.
- Domenech CE, Giordano W, Avalos J, Cerdá-Olmedo E. 1996. Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur. J. Biochem.* 239: 720-725.

- Döbereiner J, Marriel I, Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can J Microbiol. 22:1464-1473.
- Ergun N., Topcuoglu F., Yildiz A. 2002. Auxin (Indol 3- acetic acid), Gibberellic acid (GA₃), Abscisic Acid (ABA) and Citokynin (Zeatin) Production by some species of mosses and lichens. Turk Journal Botany (26): 13 -18.
- Esitken, A., H.E. Yildiz, S. Ercisli, D.M. Figen, M. Turan, A. Gunes. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. Scientia horticulturae 124 (1): 62-66.
- Felker, P., Medina, D., Soulier, C., Belice, G., Velarde, M. Gonzalez, C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp., *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. J. Arid Environ. 61:227-247.
- Fiske CH, Subbarow Y. A 1925 colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem.; 24:415-431.
- Fonseca-García, C., D. Coleman-Derr, E. Garrido, A. Visel, S.G. Tringe, L.P. Partida-Martínez. 2016. The cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. Frontiers in microbiology. 7:150. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00150.
- García-Mendoza, A.J. 2002. Distribution of the genus agave (agavaceae) and its endemic species in Mexico. Cactus and succulent journal 74: 177-187.
- García-Mendoza A. J. 2011. Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico. Instituto de Biología, Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- García-Mendoza A.J. 2004. "Distribution of the genus Agave (Agavaceae) and its endemic species in Mexico", in Cactus and succulent journal (US), num. 74, 177 -187 p.
- Gentry H. S.1982. Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Tucson.
- Goldstein, D. & Schlötterer, C. 1999. Microsatellites: Evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Gordon, S. A., Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology, 26(1): 192–195.

- Haas, D. and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Hasan H.A.H. 2002. Gibberellin and Auxin Production by Plant Root-Fungy and their Biosynthesis Under Salinity– Calcium Interaction. *RostlinnáVýroba.* (3) 101 -106.
- Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid, I. Ahmed. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60(4): 579-598.
- Hayman, D.S. 1982. Practical aspects of vesicular arbuscular mycorrhiza. In: *Advances in Agricultural Microbiology.* Subba-Rao, N.S. (ed). Oxford and IBH Pub. Co. Ltd., Mumbai, New Delhi.
- Hungría M., Andrade DS, Chuerie LM, Probanza A, Gutierrez-Mañero FJ, Megías M, 2001. Isolation and Characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L) rhizobia from Brazil. *Soil Biology Biochemistry* 32: 1515-1528.
- Igual, J., Valverde, A., Cervantes, E., y Velázquez, E. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie.* 21(6-7), 561-568.
- Jha, B.K., P.M. Gandhi, J. Cletus, G. Raman & N. Sakthivel. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. Plecoglossicida* and *P. Mosselii*. *World journal of microbiology and biotechnology* 25(4): 573-581.
- Katznelson H., Peterson, E. A., y Rouatt, J. W. 2011. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants. *Canadian Journal of Botany*, 40 (9): 1181-1186.
- Kennedy, I.R. 2001. Biofertilisers in action. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:825-827.
- Kim, E.C., Cha, C.Y. Kook, Y.H. 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 37:1714–1720.

- Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G. Zacchi, G. 2009. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol. Biofuels* 2:14-25.
- Kuiper, I., Bloemberg, G.V. Lugtenberg, B.J.J. 2001. Selection of a plant bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1197-1205.
- Kumar, G.P., N. Kishore, E.L.D. Amalraj, S.K. Mir Hassan Ahmed, A. Rasul, S. Desai. 2004. Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regulation* 67(2): 133-140.
- Kundu, B. S., Nehra, K., Yadav, R., y Tomar, M. 2009. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. *Indian Journal of Microbiology*, 49(2): 120-127.
- Laslo, É., É. György, G. Mara, É. Tamás, B. Ábrahám, S. Lányi. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop protection* 40: 43-48.
- Lindsay A.W., Sharp P.M. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol Biol Evol.* 23 (6): 1156-1168.
- Li-Ting, W., T. Chun-Ju, W. Yen-Chi, C. Ying-Bei, I. Fwu-Ling, W. San-Lang. 2010. *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov. isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2094-2098.
- Louden, B., Lynne, A. Haarmann, D. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education* 12(1): 51-53.
- Martínez D. & Garcia C. 2004. *Metabolismo y Modo de Acción de Fitohormonas.* Ediciones Universidad De Salamanca España pp 262.
- Martínez-Romero E., López-Guerrero M., Ernesto-Ormeño O., Carlos-Moles A., González-Monterrubio C. F., Ibarra-Rodríguez M. A., Campos-Hernández A. 2013. *Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura.* SAGARPA–COFUPRO– UNAM. México, D.F.

- Martínez-Natarén A., Adriano Anaya L., Figueroa Salvador M. 2005. Caracterización bioquímica e isoenzimática de cepas de *Azospirillum sp.* Área de Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas UNACH. Mexico.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Iimura, Y., Hayakawa, M. 2007. Stimulatory effect of indole-3- acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica*. 21, 32-39.
- Molloy, D.P. and Mayer, D.A. 2007. Overview of a novel green technology: biological control of zebra and quagga mussels with *Pseudomonas fluorescens*. Bacterial Project Overview. New York State Museum. <http://www.aquaticnuisance.org/wordpress/wp-content/uploads/2009/01/Dreissena-NovelGreen-Technology-for-Dreissena-Control-4-Malloy.pdf>.
- Mole, B. M.; Baltrus, D. A.; Dangl, J. L. Grant, S. R. 2007 “Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria”. *Trends in Microbiology*, v. 15 (8), pp. 363-371, ISSN 0966-842X, DOI 10.1016/j. tim.2007.06.005.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3):695-700.
- Naik, P. R., G. Raman, K. B. Narayanan, N. Sakthivel. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent *Pseudomonads* isolated from rhizospheric soil. *BMC microbiology*, 8(1): 230.
- Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170(1): 265–270.
- Nishimori, E., K. Kita-tsukamoto, H. Wakabayashi. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. Nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu *Plecoglossus altivelis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50: 83-89.
- Olsen G.J. & Woese CR. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J*; 7:13-23.
- Patten, C. L. Glick, B. R. “Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in development of the host plant root system”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 8, 8 de enero de 2002, pp. 3795-3801, ISSN 00992240, 1098-5336, DOI 10.1128/ AEM.68.8.3795-3801.2002, PMID: 12147474.

- Persello-Cartieaux, F.; Nussaume, L. Robaglia, C. 2003 "Tales from the underground: molecular". Plant, Cell Environment, v. (26) 2, pp. 189-199, ISSN 1365-3040, DOI 10.1046/j. 13653040.2003.00956.x.
- Prats-Pastor, G. 2006. Microbiología Clínica. Epidemiología microbiana. 1ª Ed. Madrid, España. Ed. Médica Panamericana. pp. 213-215.
- Ramazanzadeh R., Zamani S. and Zamani S. 2013. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. Iran J. Microbiol. 5(2): 126–131.
- Rhomer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H. 1993. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. Biochem. J. 295: 517-524.
- Rohmer M. 2003 Mevalonate independent Methyl erythritol Phosphate pathway for Isoprenoid Biosynthesis. Elucidation and Distribution. Pure Appl. Chem. 75:375-388.
- Roux V1, Raoult D. 1995. Phylogenetic analysis of the genus Rickettsia by 16S rDNA sequencing. Res Microbiol. 146 (5):385-96.
- Rodicio, MR & Mendoza MC. 2005. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Depto de biología funcional. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Vol. 22(4): 238-245.
- Rodríguez, H., T. Gonzalez, I. Goire, Y. Bashan. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp, Natur-wissenschaften (Berlin), 91(11):552-555.
- Ruiz-Sánchez, E., M.A. Mejía-Bautista, A. Serrato-Díaz, A. Reyes-Ramírez, Estrada-Girón, A.J. Valencia-Botín. 2015. Antifungal activity and molecular identification of native strains of *Bacillus subtilis*. Agrociencia 50: 133-148.
- Ruiz-Valdiviezo, V.M., L.M.C. Ventura-Canseco, L.A. Castillo-Suárez, F.A. Gutiérrez-Miceli, L. Dendooven, R. Rincón-Rosales. 2015. Symbiotic potential and survival of native rhizobia kept on different carriers. Brazilian Journal of Microbiology 46: 735-742.

- Ruíz Sonia, Adriano Lourdes, Ovando Isidro, Navarro Cuauhtémoc, Salvador Miguel. 2011. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. *African Journal of Biotechnology*. 10(47): 9624–9628.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van Der Lelie, D. Dow, J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature* 7:514525.
- Saha, M., S. Sarkar, B. Sarkar, B. K. Sharma, S. Bhattacharjee, P. Tribedi. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 23(5): 3984-3999.
- Sandhya, V. & Sk.Z. Ali. 2015. The production of exopolysaccharide by *Pseudomonas putida* GAPP45 under various abiotic stress conditions and its role in soil aggregation. *Microbiology* 84(4): 512-519.
- Santoro, M.V., P.C. Bogino, N. Nocelli, L. Del R. Cappellari, W.F. Giordano, E. Banchio. 2016. Analysis of plant growth-promoting effects of fluorescent pseudomonas strains isolated from mentha piperita rhizosphere and effects of their volatile organic compounds on essential oil composition. *Frontiers in microbiology* 7:1085. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01085.
- Schwyn, B., & Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 160:47-56.
- Sleigh J.W. & Cursons RT. 2000. Generic polymerase chain reaction followed by DNA sequencing as a means of diagnosing bacteraemia. *Anaesth Intensive Care*. 28:54-57.
- Souza, V., L.E. Eguiarte, J. Siefert, J.J. Elser. 2008. Microbial endemism: does phosphorus limitation enhance speciation?. *Nature Reviews Microbiology* 6: 559-564.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden, J. Remans, R. 2007. "Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling". *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4):425–448.
- Spaepen, S., J. Vanderleyden, R. Remans. 2011. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31:425-448.

- Srivastava A., Ahamad S. 2003. Screening of potential gibberellin producing *Fusarium* strains for the hybrid rice production. *Food, Agriculture & Environmental* 1:250-253.
- Tsavkelova, E. A.; Cherdyntseva, T. A.; Botina, S. G. y Netrusov, A. I. 2007 “Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin”. *Microbiological Research*, vol. 162, no. 1, pp. 69-76, ISSN 0944-5013, DOI 10.1016/j.micres.2006.07.014.
- Vega-Celedón P., Canchignia Martínez H., González M., Seeger M. 2016 Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria Universidad de La Habana. Cuba.1819-4087.
- Versalovic, J., T. Koeth, J.R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 19(24): 6823–6831.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletie, D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal amplication for phylogenetic study. *Bacteriology* 73(2): 697–703.
- Wilson L., Sharp P. 2006. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Mol. Biol. Evol.* 23(6):1156–1168.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*; 51:221-7.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87(12): 4576-4579.
- Yunyoung, K., J.K. Byung & S. Jae-Ho. 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas rhizosphaerae* IH5^T (=DSM 16299^T), a phosphate-solubilizing rhizobacterium for bacterial biofertilizers. *Journal of biotechnology* 193(10): 137-138.
- Zakharova, E., Shcherbakov, A., Brudnik, V., Skripko, N., Bulkhin, N. y Ignatov, V. 2001. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Biochemistry*, 259 (3): 572-576.

