

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INGENIERÍA**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“Diversidad de bacterias endófitas asociadas al agave azul:  
caracterización molecular del ADN 16S Ribosomal,  
identificación y su papel como microorganismos benéficos  
para el desarrollo de la planta”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Julia del Carmen Martínez Rodríguez**

**DIRECTORES**

**Dr. Tetsuya Ogura Fujii**

**Dr. Miguel Juan Beltrán García**

## CONTENIDO

ÍNDECE DE FIGURAS	2
ÍNDECE DE GRAFICOS	III
ÍNDICE DE TABLAS	2

### CAPITULO 1 BACTERIAS ENDÓFITAS CULTIVABLES

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCION	5
JUSTIFICACION	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	11
ANTECEDENTES	12
El “agave azul” y su importancia como cultivo	14
principales restricciones del cultivo: las	
enfermedades del agave	17
Reproducción	19
Propagación <i>in vitro</i> del agave azul	20
Microorganismos endófitos y sus aspectos	
benéficos en las plantas	23
Microorganismos endófitos facultativos	
y obligados	24
Mecanismos de transferencia de endófitos	
en las plantas	25

Colonización y sus efectos en las plantas	28
Mecanismos de promoción de crecimiento	30
Mecanismos directos promoción de crecimiento	30
Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento	34
Control biológico	35
MATERIALES Y METODOS	37
RESULTADOS	45
DISCUSIONES	59

## **CAPITULO 2 *Leuconostoc***

RESUMEN	72
INTRODUCCION	73
OBJETIVOS	75
ANTECEDENTES	76
Especies en la familia <i>leuconostocaceae</i>	77
El pulque	78
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , levano y su metabolismo	80
MATERIALES Y METODOS	85
RESULTADOS	90
DISCUSIÓN	106
CONCLUSION	115

## **CAPITULO 3 Bibliografía**

BIBLIOGRAFIA	117
--------------	-----

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul	14
<b>Figura 2.</b> Principales plagas del <i>Agave tequilana</i> weber var. azul.	18
<b>Figura 3.</b> Principales enfermedades en el <i>Agave tequilana</i> weber var. azul.	19
<b>Figura 4.</b> Proceso de propagación <i>in vitro</i> en <i>Agave tequilana</i> Weber var azul.	22
<b>Figura 5.</b> Plantas propagadas de <i>Agave tequilana</i> Weber var azul.	22
<b>Figura 6.</b> Colonizacion del endófito <i>Cronobacter saskazakii</i> en raíz de plantas de tomate	28
<b>Figura 7.</b> Promoción de crecimiento por endófitos en plantas.	31
<b>Figura 8.</b> Colecta del tejido vegetal de una plantación convencional de agave.	37
<b>Figura 9.</b> Cuantificación de la inhibición (antagonismo) de las cepas endófitas en la determinación cuantitativa.	43
<b>Figura 10.</b> Caracterización de la morfología de la colonia y tinción de Gram de aislados endófitos cultivables en la planta de agave.	45
<b>Figura 11.</b> Análisis del recuento poblacional de endofitos cultivables.	46
<b>Figura 12.</b> Análisis de restricción del 16s ribosomal del ADN (1500pb) con la enzima <i>Hae III</i> .	48
<b>Figura 13.</b> Diagrama de UPGMA que muestra la relación entre las cepas endófitas bacterianas analizadas por ARDRA.	50
<b>Figura 14.</b> Frecuencias de los géneros identificados	53
<b>Figura 15.</b> Análisis cualitativo de la actividad antagónica de las cepas	

Endófitas contra <i>Fusarium oxysporum</i> AC132.	56
<b>Figura 16.</b> Evaluación <i>in vitro</i> de la solubilización de fosfatos por <i>Cronobacter Sakazakii</i> y <i>Pseudomonas sp.</i>	57
<b>Figura 17.</b> Morfología microscópica de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> teñida sobre tejido de <i>Agave tequilana</i> Weber var azul.	77
<b>Figura 18.</b> Muestreo para la microbiología del tejido de la piña de agave.	86
<b>Figura 19.</b> Imagen de llenado de los posos de la galería de la cepa Identificada como Pich1 (21-07-2010).	87
<b>Figura 20.</b> Desarrollo de la bacteria <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (ATTC 10830a) y <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633).	90
<b>Figura 21.</b> Desarrollo de la bacteria <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en medio de cultivo agar MRS.	92
<b>Figura 22.</b> Morfología microscópica a la tinción de Gram de cepas bacterianas endófitas aisladas de la base de la hoja de agave.	94
<b>Figura 23.</b> Caracterización morfológica de las colonias en agar MRS-sacarosa y tinción al Gram de la cepa M2H-1.	96
<b>Figura 24.</b> Caracterización molecular de la bacteria <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99
<b>Figura 25.</b> Observación del bandeo de restricción de endófitas bacterianas en gel de agarosa 2.5% con la enzima <i>Hae III</i> y <i>Sae 2A</i> .	100
<b>Figura 26.</b> Alineamiento de secuencia del ARNr 16s para la identificación de género y especie	102

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Análisis del recuento poblacional de endofitos cultivables en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido de agave	58
<b>Gráfico 2.</b> Conteo en placa de unidades formadoras de colonia de bacterias por gramo de tejido (UFC/g).	93

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Géneros bacterianos comúnmente encontrados como endófitos en plantas y su clasificación en base al <i>phyllum</i> .	26
<b>Tabla 2.</b> Tipos de bandeos de restricción del ARNr del 16s de 1500 pares de base (pb) de las cepas aisladas.	49
<b>Tabla 3.</b> Identificación por secuenciación del ADN 16S ribosomal en la base de datos no redundante del GenBank (NCBI utilizando el programa BLAST).	52
<b>Tabla 4.</b> Resultados preliminares de ensayos en PCP <i>in vitro</i> de las bacterias endófitas de agave.	55
<b>Tabla 5.</b> Evaluación cuantitativa de inhibición (Actividad antagónica) de las cepas endófitas contra el hongo <i>F. oxysporum</i> AC132 <i>in vitro</i>	58
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de la diversidad morfológica de las cepas bacterianas endófitas.	95
<b>Tabla 7</b> Análisis de baterías bioquímicas de las cepas seleccionadas. Planta: * <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATTC 10830 <sup>a</sup>	97
<b>Tabla 8.</b> Resultados de del análisis de las secuencias parciales (Fw) en la base de datos no redundante del GenBank (NCBI utilizando el programa BLAST).	104

# CAPITULO 1

## **CAPITULO 1**

### **CULTIVABLE ENDOPHYTIC BACTERIA FROM LEAF BASES OF AGAVE TEQUILANA AND THEIR ROLE AS PLANT GROWTH PROMOTERS**

**Julia del C. Martínez-Rodríguez<sup>a</sup>, Marcela De la Mora-Amutio<sup>a</sup>, Luis A. Plascencia-Correa<sup>b</sup>, Esmeralda Audelo-Regalado<sup>b</sup>, Francisco R. Torres-Guardado<sup>b</sup>, Elías Hernández-Sánchez<sup>c</sup>, Yuri J. Peña-Ramírez<sup>d</sup>, Adelfo Escalante<sup>e</sup>, Miguel J. Beltrán-García<sup>b\*</sup> and Tetsuya Ogura<sup>b\*</sup>**

a) Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, campus Mexicali, Calle de la Normal S/N y Blvd. Benito Juárez, Col. Insurgentes Este, 21280, Mexicali, México

b) Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, 45129, Zapopan, Jalisco, México. E-mail: [mbeltran71@hotmail.com](mailto:mbeltran71@hotmail.com), [togura@uag.mx](mailto:togura@uag.mx); Tel. (+52) 33 36488824 Ext. 32433

c) Colegio de Postgraduados Carretera México-Texcoco km 36.5, 56230, Texcoco, Estado de México

d) El Colegio de la Frontera Sur A.C. Unidad Campeche. Av. Rancho Polígono 2A Ciudad Industrial. 24500, Lerma, Campeche, México

e) Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001, Col Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

\*Corresponding authors

*Parts of the results presented in this chapter have been published in Brazilian Journal of Microbiology ID: BJM-2014-0093 Section Environ Microbiol.*

## RESUMEN

El *Agave tequilana* Weber var. 'Azul' es una planta que se cultiva para la producción de tequila, inulina y jarabe. Diversas bacterias habitan en los tejidos vegetales y desempeñan un papel crucial para la salud de las plantas y el crecimiento de las mismas. En este estudio se identificaron bacterias endofíticas cultivables fueron aisladas de bases de las hojas de 100 plantas de *Agave tequilana* saludables. La población de bacterias endofitas presentes en el tejido haciende por arriba de un millonde UFC / g de tejido en la planta fresca. La identificación por secuenciación del gen 16S rDNA mostro un 99-100% de homología con otras secuencias de *Acinetobacter sp.*, *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter hormaechei*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Gluconobacter oxydans*. Las cepas bacterianas endofitas fueron confirmadas los beneficios para la planta como promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) por su capacidad para la fijación de nitrógeno, la producción de auxina, la solubilización de fosfato, o antagonismo contra *Fusarium oxysporum* AC132. *E. casseliflavus* JM47 y *K. oxytoca* JM26 secretada las mayores concentraciones de AIA. El endófito *Acinetobacter sp.* JM58 exhibió los valores máximos para la fijación de nitrógeno y el índice de solubilización de fosfato (PSI). La inhibición al hongo fitopatógeno se mostró en la *Pseudomonas sp.* JM9p y *K. oxytoca* JM26. Estos endófitos bacterianos pueden ser prometedores para su uso como bio-inoculantes para el cultivo de agave.

## ABSTRACT

*Agave tequilana* Weber var. 'Azul' is grown for the production of tequila, inulin and syrup. Diverse bacteria inhabit plant tissues and play a crucial role for plant health and growth. In this study culturable endophytic bacteria were extracted from leaf bases of 100 healthy *Agave tequilana* plants. In plant tissue bacteria occurred at mean population densities of one million CFU/g of fresh plant tissue. Endophytic strains were isolated and 16s rDNA sequences shared high homology (99-100%) with other known sequences. Bacterial endophytes were identified as *Acinetobacter* sp., *A. baumannii*, *A. bereziniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter hormaechei*, *Bacillus* sp. *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *Gluconobacter oxydans*. Isolates were confirmed to be plant growth promoting bacteria (PGPB) by their capacities for nitrogen fixation, auxin production, phosphate solubilization, or antagonism against *Fusarium oxysporum* AC132. *E. casseliflavus* JM47 and *K. oxytoca* JM26 secreted the highest concentrations of IAA. The endophyte *Acinetobacter* sp. JM58 exhibited the maximum values for nitrogen fixation and phosphate solubilization index (PSI). Inhibition of fungi was found in *Pseudomonas* sp. JM9p and *K. oxytoca* JM26. Bacterial endophytes show promise for use as bio-inoculants for agave cultivation. Use of endophytes to enhance cultivation of agave may be particularly important for plants produced by micropropagation techniques, where native endophytes may have been lost.

## INTRODUCCION

El agave desde hace muchos años ha sido de gran interés para la industria mexicana ya que se obtienen fermentados y destilados a partir de esta planta como son el pulque, el mezcal y el tequila, con reconocimiento Nacional e Internacional, siendo el tequila el producto de mayor consumo. En los últimos años se han requerido millones de plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) para la elaboración de tequila y se incrementara en función del propio incremento de la producción de tequila (CRT, 2014).

De acuerdo con el Consejo Regulador del Tequila (2014), se estimó que en el 2013 se produjeron 229 millones de litros de tequila de los cuales se exportaron 171 millones de litros a 120 países. En los últimos 10 años, las bondades de la planta se han aprovechado también para la obtención de inulina (un polímero de fructosa) a partir del jugo de agave, la cual tiene propiedades benéficas (prebióticas) para humanos y animales, así como para producir miel mediante la hidrólisis ácida de la inulina. La gran demanda de la planta ha propiciado como consecuencia el aumento de problemas fitosanitarios que incluyen plagas y enfermedades provocadas por insectos, hongos y bacterias, como la marchitez del cogollo por el hongo *Fusarium oxysporum*, la pudrición del agave por la bacteria *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) y daños en la planta por el coleóptero: el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*) (Solis-Aguilar *et al.*, 2001; Jimenez-Hidalgo *et al.*, 2004; Vega-Ramos, Uvalle-Bueno, y Gómez-Leyva, 2013).

Las pérdidas son cuantiosas, siendo los sectores social y económico los más afectados. Por ejemplo: el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*)

es una plaga que afecta al agave en todo su proceso de producción causando de manera directa o indirecta la muerte de las plantas y, en su caso, deterioro en la calidad de la piña, cuyos daños han llegado a ser superiores al 80% en las plantaciones de agave. Tan solo en 2013, 50 millones de plantas estaban infectadas, con un costo de inversión para el combate de esta plaga de 11 millones de pesos, aportados por el Gobierno federal, más recursos de las principales tequileras: Cuervo, Sauza y Herradura (Figuroa-López, 2013). Aunado a esto, mediante muestreo se han registrado infestaciones del 85% de *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* en plantaciones de agave. Sin duda el picudo y las enfermedades del agave provocadas por los patógenos: *Fusarium spp*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Cercospora agavicola* y/o *Pectobacterium carotovora*, han afectado en los últimos 15 años al cultivo, especialmente en los años recientes y que actualmente existen otros 90 millones de plantas susceptibles de ser afectadas (SAGARPA, 2013), que de no aplicarse medidas fitosanitarias inmediatas, la cadena agave tequila, tendrá daños y pérdidas permanentes. Hasta ahora las soluciones planteadas son el uso de transgénicos resistentes a herbicidas, sequías y plagas, programas de mejoramiento genético y el excesivo uso de funguicidas como ocurre en los cultivos de importancia, el Maíz y el trigo, y en último caso el levantamiento de los cultivos a destiempo. Esto como consecuencia acarrea el aumento en costos de producción y por ende los precios altos al consumidor, sin olvidar el problema a futuro del desabasto.

Los microorganismos endófitos son bacterias y hongos que colonizan y habitan los tejidos internos de las plantas (raíz, hojas y tallos) sin causar un daño aparente, y que además generan una simbiosis con la planta en la que

los microbios se benefician de los nutrientes de la planta y a su vez ayudan a la planta a tolerar factores medioambientales como sequias, irradiación ultravioleta, la fijación atmosférica del nitrógeno, la producción de fitohormonas y en el control de enfermedades por (Dai, Liu, y Wang, 2014).

El entendimiento de cómo están compuestas las comunidades microbianas en las plantas de agave y los efectos benéficos potenciales de estos aún no ha sido muy explorado y no del todo conocida; ejemplo de esto, es el bajo número de publicaciones serias en revistas nacionales e internacionales.

En el tallo de *Agave tequilana* habitan numerosas bacterias reportadas como benéficas para la planta (Martínez-Rodríguez, *et al.*, in press) por su capacidad de fijación de nitrógeno, solubilidad de fosfatos, síntesis de reguladores de crecimiento vegetal y secreción de inhibidores de crecimiento contra *Fusarium oxysporum* AC 132 del agave. Desde un punto de vista la utilización de las bacterias endófitas como bio-inoculantes en los cultivos del agave es una medida ventajosa para el desarrollo de estrategias biotecnológicas de interés para la cadena productiva agavera y de igual manera para otros cultivos de importancia social y económica para nuestro País.

## JUSTIFICACIÓN

El agave (*Agave tequilana* Weber variedad azul) es un cultivo de gran impacto en lo económico y social para México y el segundo cultivo más importante para el Estado de Jalisco, cuyo valor comercial genera cerca de 860 millones de dólares en divisas al año a través de la exportación de tequila al mundo. Esto a su vez genera impuestos IEPS (impuesto especial sobre productos y servicios) de más de \$2,700 millones de pesos al año, dando 30,000 empleos, de los cuales el 80% se encuentran directamente en el campo.

De acuerdo a estadísticas actuales emitidos por el Consejo Regulador del Tequila, A.C. (CRT 2014), la producción anual del 2013 abasteció a la industria con cerca de un millón de toneladas de “piñas” de agave que se utilizaron para la producción 226.5 millones de litros de tequila de los que 172 millones de litros fueron exportados a 120 países diferentes.

Las estadísticas anteriores muestran la importancia económica del agave para nuestro País y principalmente para el Estado de Jalisco. En un documental titulado: “Agave, un cultivo con potencial” del periódico El economista” (Ojeda-Ledesma, 2012) destaca una de las principales ventajas de este cultivo, que es la poca cantidad de agua requerida por la planta para su desarrollo. Adicionalmente, existe una creciente demanda de ingredientes derivados del agave como la inulina y el jarabe de agave, con alto valor agregado por su aplicación a productos con propiedades prebióticas. Pero eso no es todo, existe también la posibilidad de producir biocombustibles como el etanol a partir de este cultivo. En particular, de acuerdo con el boletín

informativo “La situación de los biocombustibles en México y el mundo”, elaborado por FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura) en el 2011, se tiene evidencia respecto de que los mayores niveles de producción de etanol expresados en litros por hectárea al año se obtienen a partir del agave si se compara el rendimiento con el de cultivos como caña de azúcar, maíz, sorgo dulce y yuca (Ojeda-Ledesma, 2012).

A pesar de la relevancia ecológica, cultural y económica de los agaves, existen en la actualidad pocos estudios que den cuenta de las relaciones de simbiosis que estas plantas establecen con los microbios.

Este proyecto buscó, a través de la caracterización e identificación de las diversas cepas bacterianas endófitas asociadas a la planta, evaluar el potencial de estos endófitos como microorganismos benéficos para el desarrollo de la planta.

## HIPÓTESIS

Existe una diversidad de bacterias endófitas en equilibrio simbiótico con los tejidos de la planta de agave, esto sugiere que las bacterias endofíticas pueden generar algún tipo de beneficio para la planta como la promoción de crecimiento la capacidad de fijar el nitrógeno, la solubilización de fosfatos y producción de ácido indol acético, además de la protección contra el ataque de patógenos como hongos o bacterias.

## OBJETIVO GENERAL

Aislar, caracterizar e identificar la diversidad endofítica bacteriana cultivable aislada de la hoja de agave (*A. tequilana* weber var. Azul) de una plantación convencional.; y la evaluación *in vitro* de su actividad biológica como promotoras del crecimiento vegetal y como antagonistas contra *Fusarium oxysporum* (AC132) fitopatógeno de agave.

### Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar bacterias endófitas cultivables de hojas de agave (*A. tequilana* Weber var azul) en medios de cultivo nutritivos.
2. Determinar el número de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de tejido analizado mediante conteo en placa.
3. Tipificar y agrupar el producto amplificado del ADN del gen 16s ribosomal por el análisis de ARDRA (Análisis de Restricción del ADN Ribosomal del 16S Amplificado) de las cepas aisladas.
4. Identificar las cepas bacterianas endófitas aisladas mediante la secuenciación del ADN del gen 16S ribosomal.
5. Determinar la actividad biológica de las cepas aisladas de agave como promotoras del crecimiento vegetal *in vitro*.
6. Determinar la actividad antagónica *in vitro* de las bacterias endófitas seleccionadas contra el patógeno de agave *Fusarium oxysporum* (AC132).

## ANTECEDENTES

**El Agave: generalidades.** El género *Agave*, cuyo significado en griego es “noble” o “admirable” fue dado a conocer a la ciencia por Carlos Linneo en 1753, regionalmente es llamado “Maguey” en honor de la diosa azteca Mayahuel. En voz náhuatl México significa “en el centro del maguey”. El agave o maguey es una planta que retiene agua y conserva el suelo, pertenece al grupo de las monocotiledóneas y es originario del continente americano, cuyas especies se distribuyen desde Dakota del Norte en Estados Unidos, hasta Bolivia y Paraguay (García-Mendoza, 1995),. menciona que en México se encuentra el mayor número de especies, conociéndose hasta la fecha 288, de las cuales 151 son endémicas. La mayoría de los géneros de la familia presentan biología reproductiva de tipo iteróparas (policárpicas) y los individuos se pueden reproducir cada año, otras del tipo semélperas (monocárpicas) produciendo solo una inflorescencia espectacular en su vida, para después morir. Desde hace aproximadamente 9.000 años han sido utilizados por los habitantes de Mesoamérica en la producción de azúcares y Fibras (Gentry,1982).

Las plantas de agave representan uno de los principales cultivos industriales en México, básicamente por los distintos tipos de bebidas fermentadas que se obtienen de ellas, como el pulque, que es una bebida alcohólica fermentada tradicional mexicana no destilada. Para su elaboración, se colecta la savia o aguamiel (nombrada así debido a su sabor dulce) de diversas especies de magueyes “pulqueros” principalmente *Agave salmiana* y *A. mapisaga* (Sánchez-Marroquín, 1967). El “destilado” derivado de los agaves

se conoce como “mezcal” (Gentry, 1982). El mezcal se fábrica con la *piña* del agave (se le llama así porque su forma es muy similar a una piña). Cuando la planta llega a su madurez (de 6 a 8 años) y antes de la floración se cosecha y se cortan las hojas dejando solamente la piña. No todas las especies de maguey son aceptables para el mezcal, deben usarse exclusivamente *Agave angustifolia* (maguey espadín), *A. esperrima* (maguey de cerro o maguey bruto o maguey cenizo), *A. weberi* (maguey de mezcal), *A. potatorum* (maguey de mezcal) y *A. salmiana*. Una variedad de mezcal es el tequila, bebida que adquiere su nombre del pueblo donde se produce, y cuyo proceso se ha industrializado totalmente, siendo esta situación la que impone la gran diferencia entre el tequila y el artesanal Mezcal. La especie más industrializada en México es el “Agave azul” (*Agave tequilana* Weber variedad azul) que por más de 200 años se ha utilizado para la producción de tequila,

El *A. tequilana* Weber var. azul presenta ciertas características que la hacen diferente a otras plantas de agave, es una planta carnosa, fibrosa de color azul o verde grisáceo, originado por un alto contenido de ceras que impiden que la planta pierda agua. Sus hojas son rígidas con espinas en las orillas de color rojizo (Valenzuela-Zapata, 1994). Llegada a su etapa de maduración, de 6 a 8 años, almacena inulina en el tallo en concentraciones de 25 a 35%.

El metabolismo de estas plantas es denominado CAM (Metabolismo del Ácido de las Crasuláceas), el cual les permite evitar la pérdida de agua y aprovecharla de forma eficiente (Nobel, 1988).



**Figura 1.** Planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Planta de 3 años de edad, cultivada en el rancho “El copal” 2011. Amatitán Jalisco. México.

En Jalisco además del tequila, se obtienen otras bebidas destiladas de agave, de importancia regional como la “raicilla” obtenida de la lechuguilla (*Agave maximiliana*) y el licor de agave de las especies *Agave angustifolia* o *A. rhodacantha*.

### **El “agave azul” y su importancia como cultivo.**

Los reportes más antiguos sobre la existencia del *Agave tequilana* Weber variedad azul y sus diferentes usos se remontan a la época precortesiana, figuran en varios códices prehispánicos que se mantienen hasta la fecha como fuentes históricas de referencia (Lamas, 2004) entre el principal uso de la planta se describe la producción de jugos fermentados, entre ellos el “tequila”. Este hecho está plenamente fundamentado por diversos historiadores

locales, nacionales y extranjeros (Mata, 1980; Bruman, 2000; Serra *et al*, 2004), de manera que los procesos tecnológicos básicos de transformación de la piña del *Agave tequilana* Weber var. azul, en la actual bebida etílica “tequila”, son de origen prehispánico (Lamas, 2004). Hoy la tecnología para el manejo de la planta de agave requiere de una base de conocimientos científicos que permita replantear sus expectativas de orden comercial, productivo, sanitario, ambiental y social. Ha sido relevante el avance tecnológico desde la siembra en campo de forma convencional o por propagación *in vitro* (clonal), y el manejo de la materia prima (“la piña”) para la obtención del tequila y la reciente generación de nuevos productos como inulina y miel de agave (jarabe de alta fructosa). Las razones básicas que influyen en la existencia de la planta de *A. tequilana* Weber var azul y el reconocimiento nacional e internacional hoy en día están en relación a la inulina, principal carbohidrato de reserva en la piña, donde sus propiedades peculiares dan una riqueza especial a esta planta (Ogura y Kojima 2007).

El cultivo de *A. tequilana* Weber var. azul se localiza en 180 municipios de cinco Estados de la República Mexicana que forman parte de la Denominación de Origen del Tequila (DOT) entre ellos: Jalisco, Michoacán, Tamaulipas, Nayarit y Guanajuato. Solamente en esos estados y sus municipios se puede utilizar la materia prima para la elaboración del Tequila (De acuerdo con la definición prevista en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005). La Industria Tequilera Mexicana produce actualmente 229 millones de litros de tequila por año, exportándose aproximadamente el 56% de este producto a más de 120 países (CRT 2014). A partir del reconocimiento Internacional otorgado en a México 1974 sobre la protección al Tequila como

Denominación de Origen (SCFI 1997), los Estados incluidos en la DOT, están protegidos por esta norma, lo cual ha generado una oportunidad económica y social sin precedentes para los productores de esas regiones además, de fuentes de ingreso a 70ml familias mexicanas (CRT 2014). Debido a la creciente demanda de producción de tequila, el *A. tequilana* se ha visto afectado por problemas fitosanitarios que reducen este cultivo, entre ellos plagas y enfermedades, principalmente por insectos y patógenos como bacterias y hongos.

En México las pérdidas ocasionadas por microorganismos fitopatógenos, en los cultivos de importancia agronómica van del 30% al 100% dependiendo del tipo de planta y el patógeno que las afecte. Los cultivos con mayor importancia tanto agrícola como económica para el País son el maíz, el chile, tomate, café, papa, banano, algodón y diversos granos y cereales entre ellos el trigo. En México aproximadamente 16 millones de hectáreas son cultivadas, de las cuales cerca del 50% son destinadas al cultivo de maíz, por lo que las pérdidas en este cultivo tienen un alto impacto social- económico. El cultivo de papa tiene en México una gran importancia económica, ya que es de los pocos cultivos que se desarrolla en casi todo el territorio nacional. Actualmente se cultiva en veintitrés Estados de la República, pero sólo seis aportan el 66% de la producción total (64 mil hectáreas), aproximadamente. Por otro lado, en México, el trigo representa el 21% del consumo de granos básico, ubicado en el segundo lugar después del maíz, con 52kg consumo per cápita y con un volumen de ventas en la industria que estará creciendo entre 2% y 5%. La papa, el maíz y el trigo son los cultivos en los cuales pueden ser fuente de estudio en los siguientes proyectos de investigación por parte de ambos grupos

de investigadores con el mayor interés en la búsqueda de alternativas biotecnológicas de control con el estudio de microorganismos endófitos.

### **Principales restricciones del cultivo: Las enfermedades del agave**

Desde hace tres décadas, el cultivo del agave azul ha atravesado una crisis fitosanitaria debido a dos factores principales: la incidencia de enfermedades asociadas a insectos, hongos y bacterias y debido a la poca variabilidad genética, todo ello como consecuencia de la falta de ordenamiento en los cultivos y de la falta de información adecuada para seleccionar los métodos de control más adecuados para combatir las plagas (Dominguez *et al.*, 2008). Se han reportado un gran número de insectos que atacan al agave de los cuales, los de mayor importancia son: el escarabajo rondon (*Strategus aloeus*) (Pérez-Domínguez, 2010) y el picudo del agave (*Scyphophorus acupunctatus*), que atacan la piña (Solís- Aguirre *et al.*, 2001); piojo harinoso (*Pseudococcus sp*), escama armada (*Acutaspis agavis*), y barrenador de las pencas (*Agathymus rethon*), como causantes de daños importantes en el follaje (Salas-Araiza *et al.* 2008); y gallina ciega (*Phyllophaga sp*) con grandes consecuencias en la raíz. Los métodos de control más utilizados es el químico, a base de insecticidas comerciales (Pérez y Rubio, 2007).



**Figura 2.** Principales plagas del *Agave tequilana* weber var. azul. **A:** gallina ciega, **B:** piojo harinoso, **C:** escama armada, **D:** barrenador de la penca, **E:** escarabajo rondon, y **F:** picudo. Manejo del cultivo de *A. tequilana* en temporal, (Medina, 2007).

Las principales enfermedades a las que hoy en día se enfrenta este cultivo incluyen: la pudrición del cogollo, causada por la bacteria *Erwinia carotovora* nombrada actualmente como [Pectobacterium carotovorum](#) (Jiménez-Hidalgo, et al., 2004); la necrosis foliar, cuyo agente causante es la bacteria *Cercospora agavicola* (Ayala-Escobar, et al., 2005); y la marchitez vascular provocada por *Fusarium oxysporum* (Ávila-Miranda et al., 2012).



**Figura 3.** Principales enfermedades en el *Agave tequilana* weber var. azul. Manejo del cultivo de *A. tequilana* en temporal (Medina, 2007).

## Reproducción

Para asegurar su supervivencia en su hábitat, la planta presenta dos mecanismos naturales de propagación: sexual, mediante semilla, que son plántulas que emergen de la inflorescencia (en la inflorescencia se producen las cápsulas con las semillas, una planta puede llegar a producir unas 100,000 semillas); y asexual, a través de vástagos, mejor conocidos como “hijuelos”, los cuales emergen de los rizomas de la planta “madre”. Este último, es el mecanismo utilizado de manera tradicional por los agricultores de *A. tequilana* para la propagación de la planta en los campos de cultivo llamado siembra “convencional”. Así, cuando el hijuelo alcanza el tamaño adecuado, se extrae y se siembra de forma independiente (Torres-Morán et al., 2010) debiendo darse cuidados como fertilización, control de malezas y prevención de enfermedades

(Luna-Hernández, 1998). Que dependiendo del manejo agronómico y de las condiciones ambientales puede llegar a producir hijuelos o rizomas, en uno a tres años. Las partes principales del agave o maguey son: raíz, hijuelo o rizoma, cogollo o meristemo, piña o bola, penca u hoja, espina o puya y escapo o quiote.

La práctica convencional de propagación del agave azul mediante hijuelos se ha convertido en un vector de enfermedades, que ha provocado la escasez de plantas para la producción de tequila en los campos de cultivo (Torres-Morán et al., 2010). Una alternativa es la aplicación de las técnicas de propagación y el mejoramiento genético derivadas de la biotecnología vegetal, siendo la micropropagación la que aporta mayores ventajas, ya que mantiene las características genotípicas del progenitor, además; la multiplicación sucede en lapsos cortos y en espacio reducidos, obteniendo plantas sanas y libres de patógenos, en comparación a la multiplicación tradicional. Adicionalmente, la biotecnología aporta otras técnicas de propagación que pueden resultar importantes para el mejoramiento y conservación de las plantas de agave principalmente la especie de *A. tequilana* (Domínguez et al., 2008). Durante los últimos años el cultivo de tejidos ha emergido como una potente herramienta para la propagación de varias especies de agave. (Angeles-Espino et al., 2012) (Angeles-Espino et al., 2012; De-la-Peña et al., 2012; L Portillo, Olmedilla, y Santacruz-Ruvalcaba, 2012).

### **Propagación *in vitro* del agave azul**

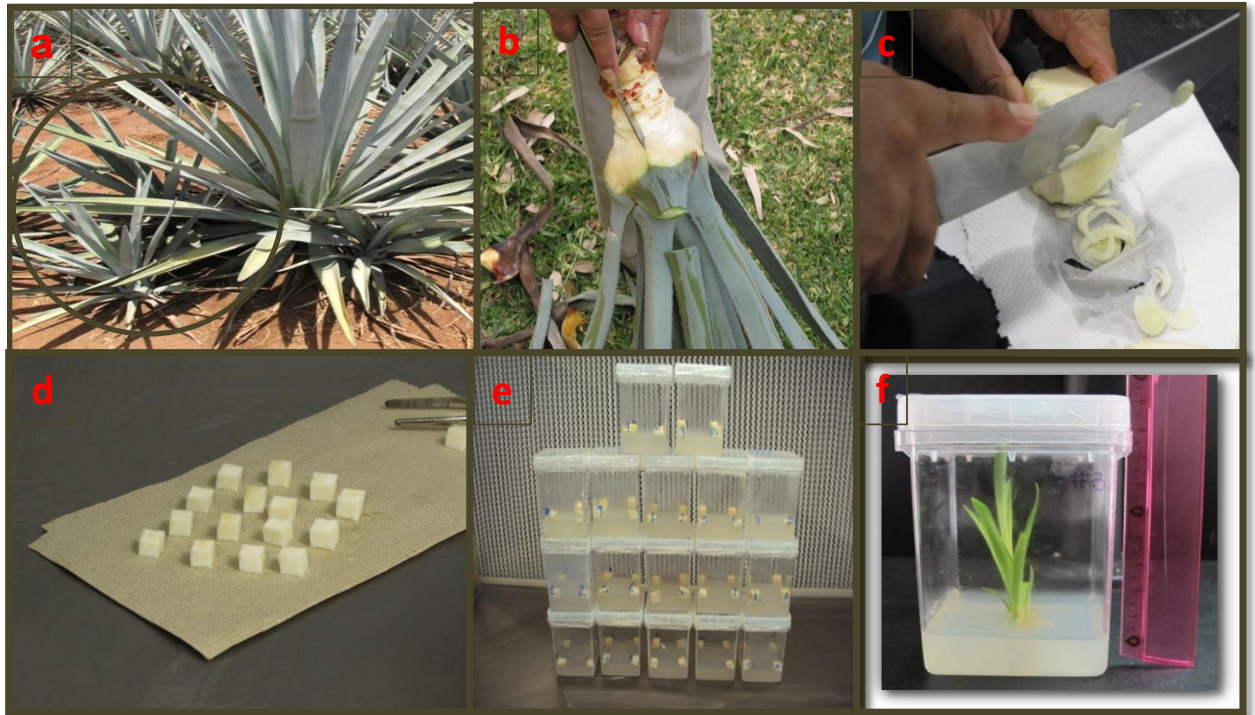
En la actualidad se utiliza la propagación *in vitro* de esta especie con el fin de generar plantas genéticamente uniformes y libres de patógenos (Torres-

Morán et al., 2010). Aunque con esta práctica se logra la producción masiva de plantas libres de patógenos, la pérdida de diversidad genética puede generar que la especie se vuelva más susceptible al ataque de enfermedades. Es importante mencionar que los costos de producción son elevados en comparación con la propagación convencional de hijuelos: de 15 a 20 pesos por planta micropropagada contra 2 pesos por planta convencional, por lo que sólo algunas compañías productoras de tequila lo están implementando con el fin de elevar la producción y de manera indirecta, como investigación científica. El proceso de propagación *in vitro* comprende varias etapas: i). Selección de explantes (tejido vegetal del cual se obtendrán los clones), ii) Establecimiento de un cultivo aséptico, iii) Multiplicación de propágulos o clonas; y iv) Enraizamiento y aclimatación de las plántulas.

La selección de las plantas para el proceso de la propagación clonal inicia con la búsqueda de “plantas elite” que deben ser seleccionados con los siguientes criterios: buen estado físico y apariencia sana (visible), sin presencia de enfermedades, síntomas de marchitez o presencia de insectos, Tamaño sobresaliente respecto a las demás plantas del mismo predio.

El mayor reto consiste en la esterilización de los explantes, pues la gran cantidad de nutrientes añadidos al medio de cultivo, favorece el libre desarrollo de bacterias y hongos que pueden dañar de manera irreversible al explante (Srivastava, *et al.*, 2010). Diversos estudios se han realizado con el fin de encontrar la técnica y sustancias como antibióticos y desinfectantes que eliminan los microorganismos epífitos y endófitos del material de clonación (Reed, *et al.*, 1995; Portillo et al., 2007; Srivastava, *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha observado que esto disminuye la aclimatación de las plantas al pasar a

fase *ex vitro*. La sobrevivencia de las plantas micropropagadas en dicha fase se atribuye principalmente a la capacidad de la plántula de formar raíces. Dicha formación de raíces se relaciona con bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal (Ovando *et al*, 2007).



**Figura 4.** Proceso de propagación *in vitro* en *Agave tequilana* Weber var azul. **a)** Selección de hijuelos en campo. **b y c)** Obtención de la yema apical. **d)** Corte del explante para su establecimiento. **e)** Multiplicación de brotes *in vitro*. **f)** Plántula de 12 semanas.



**Figura 5.** Plantas propagadas de *Agave tequilana* Weber var azul. **g)** adaptación en invernadero. **H)** Establecimiento en vivero. **I)** Plantación de dos años.

## **Microorganismos endófitos y sus aspectos benéficos en las plantas.**

Los microorganismos endófitos pueden definirse como aquellos hongos y bacterias capaces de colonizar el tejido interno de las plantas sin mostrar señales externas de infección o algún efecto negativo hacia su hospedante (Schulz y Boyle, 2006). Sin embargo, muchos estudios actuales han demostrado claramente que los microorganismos endófitos incrementan enormemente el potencial agronómico de las plantas. La diversidad de los endófitos garantiza que existan interacciones compatibles con todas las plantas de importancia agrícola incluyendo las monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se ha propuesto por los expertos que las 300,000 especies de plantas existentes en la tierra pueden albergar uno o más microorganismos endófitos (Rodríguez et al., 2008). Es claro que la adaptación de las plantas colonizadas por microorganismos endófitos incrementa los distintos niveles intra e interespecíficos de competencia entre ellos. La colonización intercelular le concede a las plantas condiciones favorables para desarrollarse y llevar a cabo todos sus procesos, y a los microorganismos, un nicho (sitio de colonización) que facilita la obtención de nutrientes como carbohidratos, aminoácidos y sales inorgánicas que sirven para soportar su crecimiento hasta que la planta cumpla con su desarrollo de vida. Los endófitos por lo tanto se vuelven endosimbiontes y llegan a crear una asociación mutualista. En biología, el mutualismo es, por definición, el tipo de relación inter-específica, en el que ambas especies resultan beneficiadas. Se excluyen a aquellos microorganismos los cuales mantienen interacciones restringidas con las plantas, por ejemplo los epifitos del rizoplano o de la filósfera, a los estados de latencia de endófitos colonizadores, así como bacterias diazotróficas que forman nódulos en las

raíces y los tallos, aunque existen bacterias endófitas diazotróficas que no forman nódulos (Germano, Menna, Mostasso, y Hungria, 2006; Gyaneshwar et al., 2011). Pero a pesar de esto existen bacterias endófitas que se distinguen de otras endófitas gracias a su peculiar comportamiento con la planta, y algunas no inducen respuesta hipersensible en la planta, indicando que no las reconoce como patógenos. Estas colonizan activamente principalmente el tejido de la filósfera (hojas) y la rizósfera (raíz) estableciendo asociaciones de larga duración, incluso de por vida, pues se benefician como ya se ha mencionado de nutrientes producidos por la planta (Hartmann, et al., 2008). Además, los endófitos son capaces de provocar cambios fisiológicos drásticos que modulan el crecimiento y desarrollo de la planta (Conrath, 2006), controlando el crecimiento de diversos hongos incluyendo los patógenos, además de otras bacterias e incluso especies de nematodos (Bacon y Hinton, 2002; Hallmann, Berg, y Schulz, 2006).

### **Microorganismos endófitos facultativos y obligados**

Los endófitos obligados dependen completamente de la planta hospedera para su multiplicación y supervivencia, y su transmisión hacia otras plantas está dada de manera vertical así como por vectores; mientras que los endófitos facultativos tienen alguna etapa en su ciclo de vida en la cual viven fuera de la planta hospedera (Hardoim, van Overbeek, y Elsas, 2008). Se han reportado al menos 50 diferentes tipos de bacterias endófitas con diferentes tipos de hospederos dentro de los cuales se encuentran géneros patógenos para los humanos como *Salmonella enterica*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, entre otras (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Muchos de los microorganismos endófitos pertenecen a

géneros comunes encontrados en suelo como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Lodewyckx, 2002).

Aunque las poblaciones de bacterias endófitas son menores que las de la rizósfera se pueden encontrar múltiples géneros y especies de bacterias endófitas en una sola planta huésped y aun no se sabe si estos géneros y especies interactúan entre ellos (Mercado-Blanco y Prieto, 2012).

La comunidad endofítica es una estructura dinámica influenciada por factores tanto bióticos como abióticos, siendo el hospedante uno de los factores con mayor influencia. Ya que las bacterias endófitas dependen de los nutrientes que le aporta su hospedero, cualquier factor que afecte la nutrición de la planta, afectará como consecuencia a la comunidad endofítica presente (Berg y Hallmann, 2006).

### **Mecanismos de transferencia de endófitos en las plantas**

Existe una gran diversidad de especies endófitas bacterianas asociadas con una gran diversidad de plantas, en las cuales hay una variedad de géneros bacterianos que han sido reportadas como endófitos, tanto del *Phyllum* Proteobacterias que representa una gran diversidad de tamaños y formas de bacterias que juegan roles importantes en los ambientes naturales como el agua y el suelo; como el *Phyllum* Firmicutes, que incluye bacterias con formas bacilares esporuladas y cocos no esporulados Gram positivos; y del *Phyllum* Acinobacterias, que son bacterias Gram positivas filamentosas (Dai et al., 2014). En la Tabla 1 se enlistan algunos géneros de bacterias comúnmente encontrados como endófitos en plantas.

**Tabla 1.** Géneros bacterianos comúnmente encontrados como endófitos en plantas y su clasificación en base al *phylum* (Lodewyckx et al., 2002)

1. Proteobacterias	Géneros
<b>Subdivisión</b>	
<b>Alfa</b>	<i>Agrobacterium, Alcaligenes, Azospirillum, Beijerinckia, Bradyrhizobium, Nitrobacter, Rhizobium, Sphingomonas, Zymomonas.</i>
<b>Beta</b>	<i>Aquaspirillum, Burkholderia, Chomobacterium, Neisseria, Nitrosomonas, Ralstonia, Spirillum, Zoogloea.</i>
<b>Gamma</b>	<i>Acinetobacter, Azotobacter, Citrobacter, Escherichia, Erwinia, Enterobacter, Halomonas, klebsiella, Serratia, Pantoea, Pseudomonas, Vibrio, Xanthomonas.</i>
<b>2. Firmicutes</b>	<i>Bacillus, Enterococcus, Staphylococcus.</i>
<b>3. Actinobacteria</b>	<i>Corynebacterium, Arthrobacter, Streptomyces, Actinomyces.</i>

La asociación simbiótica se considera ancestral y no un producto derivado de la evolución, protegidas por nichos como los espacios intercelulares. Ahora bien, las bacterias no son exclusivamente intercelulares, pueden existir asociaciones intracelulares, como el xilema, aunque este sitio no se considera el ideal para mantener endófitos por contener nutrientes en grandes cantidades. Por el tipo de nicho, el papel de las bacterias sería limitado quizás a la bioremediación de xenobióticos que afectan el desarrollo de la planta (Backman y Sikora, 2008). Como se ha mencionado las bacterias endófitas se asocian como endosimbiontes biotróficos y esas bacterias pueden ser obligadas o facultativas, tener a miles de plantas hospedantes, sin embargo algunos endófitos se restringen a ciertas familias de plantas.

De manera general, las bacterias endófitas tienen su origen en las comunidades de la rizósfera y el filoplano o filósfera, así como en semillas o

tejido vegetal. Además de introducirse a la planta a través de aperturas naturales o heridas causadas por nematodos u otros microorganismos, también se abren camino al interior utilizando enzimas hidrolíticas como celulasas y pectinasas. Estas enzimas también son producidas por patógenos, pero a pesar de los avances en la investigación requiere un mayor conocimiento referente a su regulación y expresión para poder distinguir las que provienen de endófitos y las sintetizadas por patógenos (Hardoim et al., 2008). Otro mecanismo de transferencia de endófitos sucede por herencia a través de las semillas, pues se ha visto que albergan diversos endófitos, los cuales permanecen en la nueva planta cuando la semilla germina (Coombs y Franco, 2003).

En un estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio se aisló a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* como endófita en plantas de *A. tequilana* *Weber var Azul* cultivadas de forma convencional, mientras que en las plantas micropropagadas no pudo aislarse. Este resultado nos hace suponer que *L. mesenteroides* se transmite por herencia de la planta madre a sus hijuelos, pero en el proceso de micropropagación son eliminadas. Sin embargo, aún no se conoce con certeza como se inicia la infección de la planta, para su posterior colonización. Los pocos estudios existentes sugieren que esta empieza a partir de rupturas o heridas en las raíces de plántulas recién germinadas. La infección aérea toma lugar a través de las estomas y otros poros naturales, pero aún no se ha demostrado con seguridad que sean una puerta natural para la infección de las bacterias, sin embargo no se descarta.

## Colonización y sus efectos en las plantas.

Recientemente el proceso de colonización ha adquirido importancia entre la comunidad científica para entender el fenómeno de simbiosis de los endófitos con la planta y todo lo que deriva en pro del desarrollo de la planta, de tal forma que la colonización endofítica es considerada un signo de fortaleza en las plantas (Zuccaro, Lahrmann, y Langen, 2014).

Las raíces de las plantas son el principal sitio en el que inicia la colonización por hongos y bacterias. En el caso de las bacterias el proceso ocurre en varias etapas.

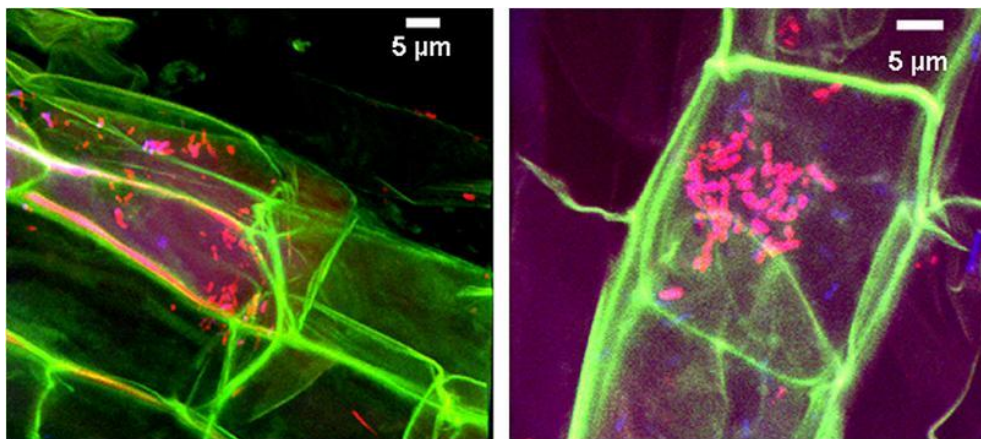


Figura 6. Colonización del endófito *Cronobacter saKazakii* en raíz de plantas de tomate. Imágenes confocal fluorescente *in situ* (Schmid et al., 2009).

La primera etapa consiste en la movilización de la bacteria del suelo hacia la raíz de la planta. Esto sucede pasivamente debido al flujo del agua en el suelo, o activamente debido a una inducción específica del movimiento flagelar causada por compuestos secretados por la raíz (Quimiotaxis). En la segunda etapa sucede el contacto físico entre la bacteria y la superficie de la raíz, en el que se presenta una adherencia no específica. La tercer etapa incluye el desarrollo de interacciones específicas entre bacteria-célula de raíz debido a la secreción de exudados por la inducción de expresión de

determinados genes en ambos participantes, conocido como fenómeno de anclaje. El anclaje produce una relación permanente entre los dos organismos, sin embargo ocurre exclusivamente en la superficie de las células de los pelos radiculares. En la cuarta etapa sucede la penetración de las bacterias ancladas, la cual se lleva a cabo a través de las pequeñas lesiones que ocurren de forma natural debido a los propios fenómenos de crecimiento que se ocasionan en las uniones epidérmicas y superficies de las células de la raíz o por la capacidad celulolítica, pectinolítica, de exoglucanasas y poligalacturonasas de los microorganismos. (Compant, et al 2011).

La penetración de las bacterias al interior de los tejidos vegetales no garantiza su permanencia, por lo que una vez que se encuentran en el interior las bacterias deben lograr la última fase de la colonización: el establecimiento. En esta fase, usualmente las bacterias benéficas pueden colaborar al mantenimiento de la salud de las plantas colonizadas, principalmente a través de la producción de compuestos reguladores y fitohormonas como el ácido indolacético (IAA), acetoina (3-hidroxi-2-butanona), 2-3-butanodiol, o bien, metabolizar compuestos como ácido fenilacético (PAA), gamma-aminobutyrate (GABA) o precursores de etileno 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) (Brader, et al., 2014). Cambios en la fisiología de las plantas puede llevar a modificaciones de la población de endófitos, alterando la colonización. Un régimen de fertilización con alto contenido de nitrógeno modifica el patrón de colonización, debido a una disminución en la cantidad de sacarosa disponible, que es usada como fuente de carbono por los microorganismos (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Varios estudios de colonización demuestran la permanencia y migración de las bacterias y hongos a través de

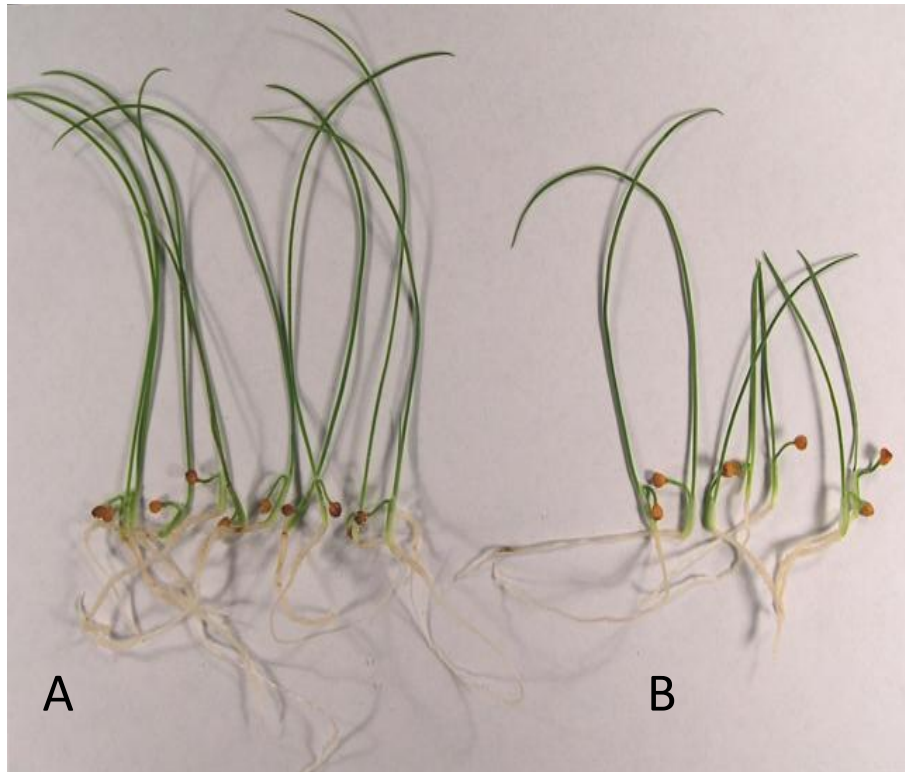
los tejidos de las mismas. Esto abre líneas de estudio que servirán para entender como las plantas obtienen fuentes de nitrógeno en ambientes muy limitados de materia orgánica.

### **Mecanismos de promoción de crecimiento**

Las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento de las plantas por mecanismos directos e indirectos. Los microorganismos endófitos son capaces de provocar cambios fisiológicos drásticos que modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas; muchas veces los efectos benéficos de los endófitos son mayores a los producidos por las bacterias de la rizósfera (Hardoim et al., 2008). Los mecanismos bioquímicos que ejercen un beneficio sobre la planta huésped han sido ampliamente estudiados y en términos generales se dividen en mecanismos directos, como aumentar la disponibilidad de nutrientes; e indirectos, que le permiten diferentes grados de resistencia a patógenos.

### **Mecanismos directos de promoción de crecimiento.**

Niveles adecuados de nutrientes como el nitrógeno, fosforo y hierro son fundamentales para tener plantas saludables y por consiguiente que la producción de un cultivo se vea favorecida.



**Figura 7.** Promoción de crecimiento por endófitos: **A.** Plantas con inóculos de endófitos **B.** Plantas sin endófitos.

Desde hace varios años se sabe que distintas especies de bacterias endófitas tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, sintetizar sideróforos para secuestrar hierro del suelo y proveer a las plantas de ese elemento, además de sintetizar fitohormonas, las cuales pueden mejorar o incrementar el crecimiento de las plantas. También poseen mecanismos de solubilidad de minerales como el fósforo con el fin de hacerlo biodisponible para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

#### **a) Fijación de nitrógeno.**

A pesar de que la atmósfera contiene un 78% de nitrógeno constituye un factor limitante del crecimiento de las plantas debido a que el nitrógeno existe como di-nitrógeno ( $N_2$ ), no asimilable por las plantas, por lo que se requiere que organismos procariontes como las bacterias, cianobacterias o actinomicetos lo

fijen. La fijación se da por la conversión de  $N_2$  en amoníaco ( $NH_3$ ) o nitratos ( $NO_3$ ) que son las formas asimilables por las plantas. El primer paso de la fijación depende de la enzima nitrogenasa de bacterias llamadas diazotróficas, esta reacción es demandante de energía ya que se requiere cerca de 25 moléculas de ATP para fijar una molécula de  $N_2$  a  $2NH_3$ . Por lo que el nitrógeno, es uno de los nutrientes limitantes que juega uno de los papeles más importantes en el rendimiento de la producción de los cultivos. A nivel mundial, el uso de fertilizantes nitrogenados ha aumentado significativamente y con esto su acumulación en el ambiente. El incremento en el uso de fertilizantes químicos tiene consecuencias negativas como el aumento en la contaminación por nitrógeno y fósforo de cuerpos de agua adyacentes a las zonas de cultivo conduciendo a su eutrofización. La fijación biológica de  $N_2$  y la solubilidad de fosfatos por bacterias son alternativas biológicas a los productos químicos que pueden ayudar a hacer más productiva y sustentable la agricultura (Govindarajan, et al., 2008). **b) Solubilización de fosfatos.**

Más allá de contribuir con la nutrición de la planta por la descomposición de la materia orgánica del suelo, algunas bacterias proveen de nutrientes específicos a las plantas. El fósforo (P), después del  $N_2$ , es otro elemento que limita el desarrollo de las plantas. El P en forma de fosfato ( $PO_4$ ) está presente en los suelos, en forma insoluble. Por otra parte, ante la escasez de sales de fosfato como fertilizantes, se está usando fosfato de rocas como una alternativa para las plantas, sin embargo su aplicación sólo es efectiva en suelos ácidos. Algunas bacterias pueden solubilizar fosfatos inorgánicos al liberar ácidos orgánicos como el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico o mineralizan fosfatos orgánicos al secretar enzimas fosfatasas. Ejemplo de estos son bacterias de

los generos *Azotobacter*, *Bacillus*, *spp.*, *Enterobacter agglomerans*, *E. ausburiae*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *Paenibacillus telluris*, *Rhizobium*. Algunos hongos del genero *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* han demostrado su capacidad de solubilizar el fosfato de rocas.

### **c) Estimulación del crecimiento.**

Las auxinas son una clase de reguladores de crecimiento de plantas, son compuestos conocidos por incrementar la elongación celular y promover la división de células vegetales. Diversos microorganismos como hongos, bacterias y levaduras son capaces de producir estos compuestos indólicos y tener un efecto en el desarrollo de las plantas (Nassar, El-Tarabily y Sivasithamparam, 2005).

La auxina más común secretada por los endófitos es el ácido 3-indol-acético (AIA), que participa en el desarrollo de las raíces, crecimiento, diferenciación celular, promueve el fototropismo positivo y retarda la caída de las hojas, flores y frutos inmaduros. Bacterias del genero *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* son capaces de inducir el crecimiento de plantas como el arroz, trigo, maíz, caña de azúcar, chicharos, por medio de la producción de AIA. Por otra parte, la producción de enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilasa-desaminasa (ACC-desaminasa) contribuye con la promoción del crecimiento de las plantas a través de la ruptura del ACC, un intermediario de la síntesis de etileno que inhibe el crecimiento de la raíz (Vessey, 2003). *B. pumilus*, *E. cloacae*,

*Pseudomonas* y *Burkholderia* son ejemplos de bacterias que producen esta enzima.

La inoculación de bacterias endófitas con mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal, trae consigo beneficios como una disminución en los costos de producción debido a que no es necesaria la compra y aplicación de grandes cantidades de fertilizantes químicos, por lo que ayudan a mantener un equilibrio en el ecosistema.

### **Mecanismos indirectos de promoción de crecimiento.**

Las bacterias endófitas son capaces de disminuir o prevenir los efectos de los organismos fitopatógenos por medio de la secreción de antibióticos o enzimas que interfieren con la integridad de las membranas celulares de hongos fitopatógenos. Por otra parte, muchas bacterias pueden inducir resistencia tanto local como sistémica de la planta ante la presencia de un patógeno; estas habilidades son consideradas como formas indirectas de promoción de crecimiento vegetal (Lodewyckx *et al.*, 2002). Las plantas que tienen relaciones simbióticas activan la defensa sistémica más rápidamente ante el ataque de un patógeno que aquellas que no tienen esta relación endófito-planta (Berg & Hallmann, 2006).

### **Control biológico.**

Las bacterias y los hongos que co-habitan en los tejidos de las plantas secretan sustancias que controlan su desarrollo. Es indudable que se debe mantener un equilibrio en donde ambos tipos de microorganismos resulten beneficiados. Tampoco se conoce cuáles son las condiciones que provocan la

ruptura del equilibrio entre ellos con consecuencias negativas. Sin embargo, está bien establecido que los microorganismos endófitos pueden ser antagónicos a los agentes patógenos por colonizar los mismos nichos y por la secreción de moléculas “antibióticas” o de enzimas extracelulares como quitinasas, proteasas, lipasas y glucanasas, que degradan las paredes celulares de los hongos.

Los microorganismos no solo ejercen un efecto directo sobre el patógeno, sino que también pueden influir de forma indirecta en la planta u otros miembros de la comunidad microbiana a través de un fenómeno denominado “Quorum sensing” (Brader, Compant, Mitter, Trognitz, & Sessitsch, 2014b) en el cual la secreción de moléculas como la acil-homoserina lactona (AHL) o péptidos autoinductores (PAI) modifican el comportamiento de las bacterias benéficas. Por ejemplo, *Pseudomonas aureofaciens* produce fenazina, un potente antimicrobiano en respuesta a la AHL producida por otras bacterias (Schilirò, Ferrara, Nigro, y Mercado-Blanco, 2012). Las bacterias endófitas en las que se han demostrado efectos de control biológico son las especies de *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*, y *aureofaciens*), especies de *Bacillus* (*amyloliquefaciens*, *cereus*, *licheniformis*, *pumilus* y *subtilis*), así como *B.cepacia*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Serratia* y *Streptomyces*.

El incremento en la demanda de alimentos libres de pesticidas, sumado a un incremento en el número de habitantes a nivel mundial, requiere que exista un control de enfermedades que reduzca las pérdidas en la producción de los cultivos a causa de los microorganismos patógenos. El control biológico

es una alternativa amigable con el ambiente ante el uso de pesticidas para el control de enfermedades en plantas, desafortunadamente se continúa usando el control químico por encima del control biológico. El control biológico enfocado al uso de microorganismos nativos de cada cultivo parece ser una buena alternativa en comparación con el excesivo uso de agentes químicos.

## MATERIALES Y METODOS

### Muestreo de plantas.

Las plantas de *A. tequilana* fueron obtenidas de una plantación experimental denominada "Las Majadas" (propiedad de Brown-Forman, Casa Herradura) cultivada de forma convencional dentro de la Denominación de Origen del Tequila (DOT) y localizada en el Estado de Nayarit, México( 21 ° 30'45 "N, 104 ° 37'16 " W), .. De las 400 plantas de 6.5 años de edad cultivadas en el predio, se muestrearon un total de 100 plantas, seleccionando al azar diez plantas de cada zurco,(T1-T10) (Fig. 6). Cada piña fue pesada y se registró el número de °Bx de cada una para conocer la concentración de azúcares en la piña.



**Figura 8.** Colecta del tejido vegetal de una plantación convencional de agave. **a.** Corte vertical de la piña. **b.** Muestreo de la base de la hoja. **c.** Traslado del tejido.

En condiciones asépticas las "piñas" fueron divididas verticalmente en dos partes. 0.5 a 1Kg de tejido de la base de la hoja (Fig. 6b) se seleccionó para extracción de endófitos. . Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio (figura 6c).

## **Aislamiento y Caracterización de bacterias endófitas cultivables de plantas de agave (*A. tequilana* Weber var azul)**

Para el aislamiento de las bacterias cultivables, se extrajo el jugo del tejido de la base de las hojas: de las 10 piñas muestreadas en cada zurco se tomaron 100 g de cada piña y se licuaron en una licuadora industrial de 5 litros, limpia y tratada con una solución de hipoclorito de sodio al 5% a partir del producto comercial Clorox. El tejido (1kg) fue licuado por 5 minutos y posteriormente se exprimio para obtención del jugo y se filtró con gasa estéril., Se realizaron diluciones seriales en solución fisiológica estéril (NaCl 0.85%) hasta  $1 \times 10^{-6}$ . Un mililitro de la última dilución se inoculó por triplicado sobre cajas de Petri con agar tripticaseína de soya (40 g/L, Bioxon), agar para métodos estándar (23.5 g/L, Bioxon) y agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, 70 g/L, DIFCO) adicionado con 25% de sacarosa como medio selectivo para la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. Las cajas con agar tripticaseína de soya se incubaron a 30°C durante 24-48 horas en condiciones aerobias, y las cajas con agar MRS se incubaron a 30°C en anaerobiosis por 48 horas. Se determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo de tejido (UFC/g) y se seleccionaron las diferentes colonias de acuerdo a la morfología colonial presentada para su aislamiento mediante al menos 4 pases consecutivos en el mismo medio del que fueron cultivadas al inicio.

### **Caracterización de las cepas aisladas**

Se realizaron frotis de cada colonia perfectamente aislada para determinar la morfología microscópica y la reacción a la tinción de Gram, así

como la prueba de catalasa. Este análisis también sirvió para evaluar la pureza de cada cepa.

Las cepas fueron mantenidas en viales de vidrio con 30g/L de peptona de caseína, 3g/L de NaCl y 14g/L de agar bacteriológico a temperatura ambiente.

### **Identificación y Caracterización molecular mediante el análisis del ADN del gen 16s ribosomal.**

**Extracción de ADN genómico.** Cada cepa fue cultivada en caja Petri en agar soya tripticaseína (40g/L) durante 24 horas. Se extrajo el ADN bacteriano de cada cepa utilizando el kit de extracción ADN genómico microbiano de la marca MoBio (12224-250), siguiendo la metodología descrita por el fabricante.

### **Análisis de restricción del amplificado del ADN del 16s ribosomal (ARDRA) e identificación de las cepas bacterianas endófitas.**

La región 16S del ADN ribosomal de cada bacteriana aislada fue amplificado utilizando un cebador directo específico fD1 secuencia (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y cebador inverso específico rD1 secuencia (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3') (Weisburg, et al., 1991) para amplificar un fragmento de 1500 pares de bases correspondiente al ADNr 16S usando un kit de PCR rápida [Pyrostart Master Mix # K0211 - Fermentas] bajo las siguientes condiciones: 95°C-2min, 35 ciclos de 94°C-1min; 55°C-1min; 72°C-2, y 72°C 4min. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador modelo NyxTechnik, Inc. A6. Se realizó el análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA) a todas las cepas cultivadas utilizando la enzima de

restricción *Hae III* [Fast ( BsuRI ) # FD0154 - Fermentas ], durante 5 min a 37°C. Los productos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 2,5 % en un tampón TBE 1X (Trisma, borato, EDTA, solución concentrada 10 veces) durante 3 horas a 3,2 V/cm, el cual fue teñido con GelRed (nucleic acid gel stain, Hayward, CA). El patrón de restricción de ADN se visualizó a 312 nm con un UV- transilluminator (Apolo), los aislamientos se agruparon en función de sus patrones de ARDRA y los fragmentos del ADNr 16S correspondientes a cada tipo de restricción fueron seleccionados para la identidad del producto amplificado.

### **Identificación de los Productos de PCR por secuenciación.**

Para la identificar las bacterias endófitas seleccionadas, se usaron los primers rD1 y RF1. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit de purificación de la Marca Roche (#11732 676 001) y enviados para la secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de las secuencias se hizo a través del programa Bioedit. Las secuencias de ADN resultantes se sometieron a la base de datos de nucleótidos no redundantes en GenBank utilizando el programa BLAST para determinar su identidad. Las secuencias identificadas fueron depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), con los siguientes números de acceso consecutivo: KC461186 a KC461198

**Análisis filogenético.** Un alineamiento múltiple de los fragmentos de las secuencias del ADNr 16S y la fecha de referencia de la base de datos de GenBank se realizó usando el programa CLUSTALW. El cálculo de matriz de

distancia de las tasas de sustitución de nucleótidos y los árboles filogenéticos se construyeron con el modelo de Kimura 2 y utilizando el software MEGA 3.1.

## **Evaluación de las bacterias endófitas cultivables de agave como promotoras del crecimiento vegetal. Ensayos *in vitro*.**

### **a. Fijación de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno se determinó después de un ensayo estándar descrito previamente por Turner, and Gibson (1980). Tres repeticiones de viales inoculados con cultivos puros, y sus respectivos controles de medios de cultivo estériles fueron inyectados con 0,25 ml de acetileno puro (10% del volumen del vial), y se incubaron a 30°C durante 24h. Se tomaron muestras del espacio aéreo de cada vial a las 24 h y 48 h después de la inoculación. La reducción de acetileno se detectó por análisis de cromatografía de gases utilizando un Cromatógrafo de Gas Autosystem (Perkin-Elmer Inc) equipado con una columna Porapack N (Alltech Associates, PA, EE.UU.), y un detector de ionización de flama (FID).

### **b. Ensayo de ácido indol acético (AIA).**

La producción de AIA se determinó de acuerdo con un método modificado de Sawar y Kremer (28) con la suplementación de L-triptófano 5 mM. Los aislados se incubaron a 30°C durante 24 horas en placas Petri con agar de soya tripticaseina (AST) al 50%. Una suspensión bacteriana a  $OD_{600} = 0,1$ , fue hecha. Se inocularon 100  $\mu$ l en un vial con 5 ml de caldo de soya tripticaseina suplementado con triptófano 50 mM. Los cultivos se incubaron durante 96 horas a 30°C. Las células bacterianas se retiraron entonces del medio de cultivo por centrifugación a 6000 rpm durante 15 min a temperatura

ambiente. El sobrenadante se mezcló vigorosamente con 4 ml del reactivo de Salkowski. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora y se determinó la absorbencia en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de AIA de cada cepa se determinó mediante la extrapolación con una curva estándar de 1, 10, y 100 ppm de AIA (Sigma-Aldrich).

### **c. Determinación del índice de solubilidad de fosfatos (ISP)**

La solubilización de fosfatos fue ensayada por el método descrito por Nautiyal, (1999) utilizando el medio NBRIP por sus siglas en inglés (National Botanical Research Institute's phosphate) adicionado con 1,5% de agar bacteriológico (DIFCO). Cada cepa se inoculó en el centro de la placa y se incubaron a 30°C durante 7 días. La capacidad de las cepas para solubilizar fosfatos se evaluó mediante la determinación de la relación del diámetro total del halo de solubilización y el diámetro de la colonia (Premono, EM., *et al* 1996).

### **Evaluación de las bacterias endófitas probando su actividad de antagonismo (inhibición) contra el hongo fitopatógeno del agave**

#### ***Fusarium oxysporum* AC132. Ensayos *in vitro*.**

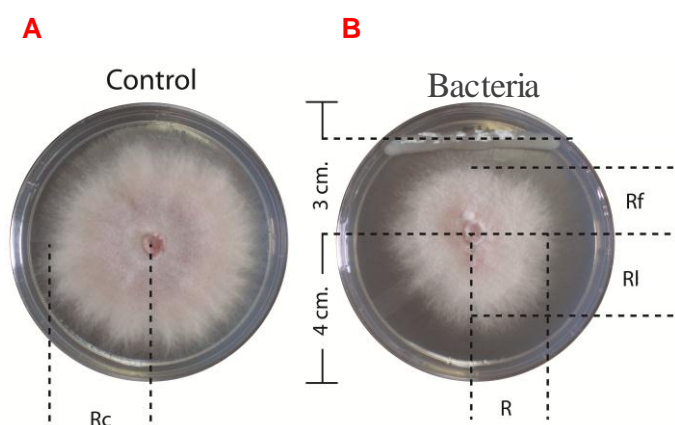
La cepa AC132 de *Fusarium oxysporum*, fue donada por el Dr. Xavier Uvalle de Agave azul, Agricultura y Servicios SA de CV, la cual fue reportada en 2013 como una cepa patógena para las plantaciones de agave (Vega-Ramos *et al.*, 2013). El hongo fue utilizado en los ensayos de antagonismo. La cepa *F. oxysporum* AC132 fue incubada en agar papa dextrosa (APD, Difco) a temperatura ambiente por 7 días.

### a) Prueba de inhibición cualitativa.

Tres cepas de bacterias endófitas diferentes, fueron inoculadas en una placa de APD a 3 cm del centro. Un inoculo del micelio de 7 milímetros de diámetro del hongo fue cortado de la periferia del crecimiento de 7 días y fue colocado en el centro de la placa de acuerdo como reporta Sivanantham *et al.* (2013). Las placas se incubaron a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad hasta que el micelio alcanzó el anillo bacteriano. Las bacterias que reducen el crecimiento micelial del hongo fueron seleccionadas para la siguiente fase que consistió en la determinación cuantitativa de la inhibición.

### b) Prueba de inhibición cuantitativa.

La inoculación en forma de línea recta de la cepa endófitas, fue sembrada a 3 cm del centro de la placa como muestra la figura 7. El micelio del hongo en una rodaja de 7 mm de diámetro fue inoculada al centro de la placa. El tratamiento control se incubó en ausencia de bacterias. Las placas se incubaron a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad por 12 días.



**Figura 9.** Cuantificación de la inhibición (antagonismo) de las cepas endófitas en la determinación cuantitativa. **A.** Control de *F. oxysporum* cepa AC132, **B.** Prueba con la bacteria endófitas.

La medición del radio del desarrollo del hongo hacia el frente ( $R_f$ ) de la línea bacteriana, el radio de crecimiento lateral ( $R_l$ ) y el radio de crecimiento total ( $R$ ) fueron determinados al igual que el radio de crecimiento del tratamiento control ( $R_c$ ). Las mediciones fueron realizadas a los cinco, ocho y doce días de incubación. La inhibición fue calculada en base a cinco repeticiones. Los resultados del antagonismo de cada bacteria fueron expresados en porcentajes de inhibición de la siguiente manera:

$\% If = [1 - (R_f - 0.35)/(R_c - 0.35)] \times 100$ , en donde,  $\%If$  es igual al porcentaje de la inhibición frontal del desarrollo del micelio del hongo con respecto a la línea de inoculación de la bacteria.

$\% IL = [1 - (R_l - 0.35)/(R_c - 0.35)] \times 100$ , el porcentaje de inhibición lateral del desarrollo del micelio.

$\%IP = [1 - (R_p - 0.35)/(R_c - 0.35)] \times 100$ , el porcentaje de inhibición posterior del desarrollo del micelio del hongo. Donde 0.35 es el radio de la rodaja de inóculo del Hongo.

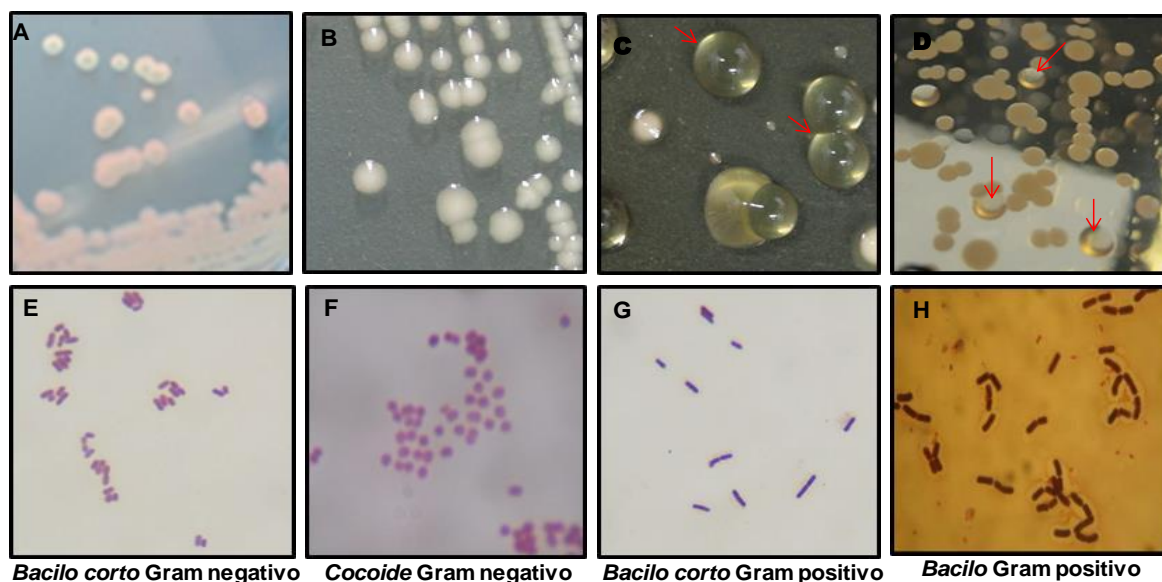
### **Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron con Statgraphics Centurion XVI.1 (StatPoint Technologies, INC). Los datos se analizaron mediante análisis unidireccional de varianza (ANOVA). Las medias se determinaron mediante la prueba de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS

### Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas cultivables en plantas convencionales de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

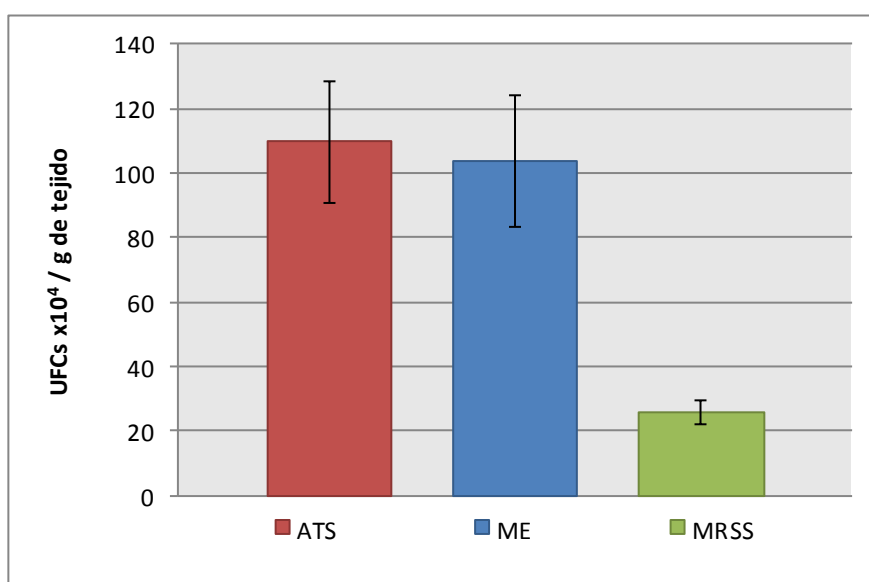
Un total de 270 bacterias fueron aisladas de la base de las hojas de agave. Se seleccionaron 65 cepas mostraron colonias morfológicamente distintas y fueron caracterizadas por tinción de gram (Fig. 10) y catalasa (Anexo X). Se logró observar la presencia de diferentes grupos bacterianos. El agar ATS mostro que el mayor número de aislados cultivados presenta un 85.94% de bacterias Gram negativas (Fig. 10A, 10B, 10E y 10F) y un 14.06% de bacterias Gram positivas (Fig.10C 10D, 10G y 10H), además se analizó que el 71.40% de los aislados corresponde a una morfología bacilar y el 28.50% a cocoide, sin embargo, la predominancia corresponde a bacilos cortos con un 68.8% (Fig. 10E y 10G).



**Figura 10.** Caracterización de la morfología de la colonia y tinción de Gram de aislados endófitos cultivables en la planta de agave. **A:** colonia circular rosada; **B:** circular, blanca convexa; **C** y **D:** Colonia típica a *L. mesenteroides* en agar MRS 25% de sacarosa, grande circular, transparente nombrada gota de lluvia. **E-H,** morfología a la tinción de Gram.

En cambio para el agar MRSS se observaron colonias circulares cristalinas en forma de gotas de agua (Fig. 10C y 10D) formadas por bacilos cortos gram positivos y catalasa negativos. La identidad de la bacteria fue confirmada mediante pruebas bioquímicas del sistema API y mediante la secuenciación del 16s del ADN ribosomal (resultados expresados en el capítulo de *Leuconostoc mesenteroides*).

**Recuento bacteriano de endófitos cultivables en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido de la planta de agave (UFCs/g).**



**Figura 11.** Análisis del recuento poblacional de endófitos cultivables en unidades formadoras de colonias por gramo de tejido de agave (UFCs/g) en agar tripticaseína de soya (ATS), agar para métodos estándar (ME) y agar MRSS (Agar MRS suplementado con 25% de sacarosa).

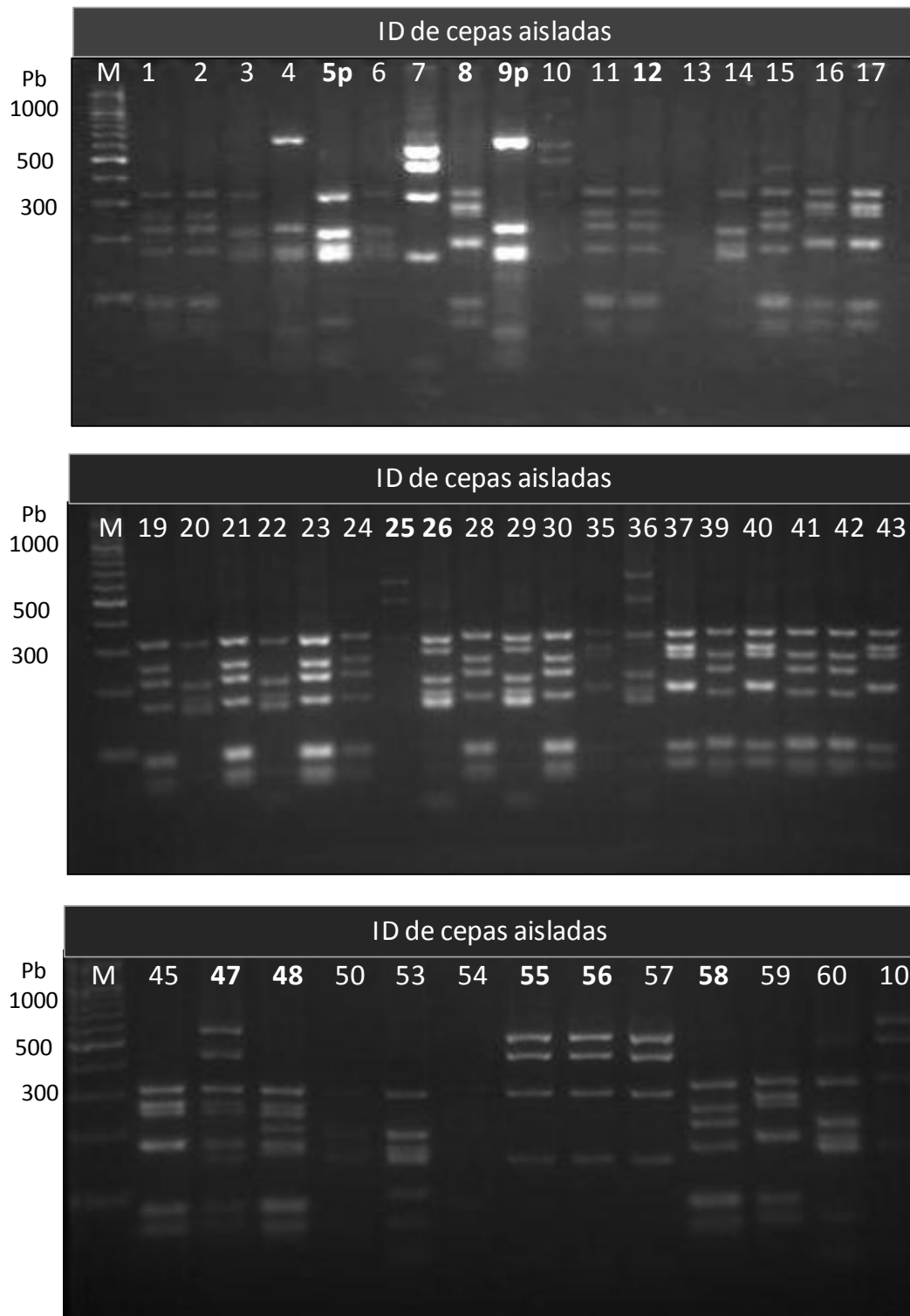
La cuantificación de las unidades formadoras de colonias en un gramo de tejido (UFCs/g) de la planta fue realizada, el cuál fue mediante el método de recuento en placa para los tres medios seleccionados para este estudio (ATS, ME y MRSS). Una primera cuantificación mostró una carga de endófitos cultivables incontables mayor a 100,000 UFC/g de tejido en los medios ATS y MS, por lo que fue necesario repetir el conteo con un mayor número de

diluciones. El resultado del análisis presenta una carga promedio de endófitos cultivables de  $109.6 \times 10^4 (\pm 18.94)$  y  $103.7 \times 10^4 (\pm 20.23)$  UFC/g de tejido en el medio ATS y ME respectivamente (Figura 11). Estos resultados muestran la presencia del desarrollo bacteriano en la planta, considerando que las plantas colectadas manifestaron un tamaño y peso normal a alto para la edad del cultivo y la baja incidencia de enfermedades en el predio seleccionado donde fue llevada la colecta de estas plantas. Sin embargo, el análisis no muestra una diferencia significativa de las poblaciones de endófitos presentes entre los medios de ATS y ME.

En el agar MRSS se obtuvo una carga bacteriana de  $25.69 \times 10^4 (\pm 3.66)$  UFC/g de tejido, lo que representa un 25% de la población de endófitos cultivables totales en un gramo de tejido, y muestra la presencia de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* como un endófito.

### **Caracterización molecular mediante el análisis de restricción del ADN 16S ribosomal amplificado (ARDRA).**

Las 65 cepas de endófitos aisladas fueron caracterizadas por ARDRA. En la figura 11 se muestra el análisis de restricción (ARDRA) para 49 cepas bacterianas, cuyas bandas fueron comparadas entre sí y clasificadas en grupos de acuerdo a los patrones de bandeo que presentaron (Tabla 2).



**Figura 12.** Análisis de restricción del 16s ribosomal del ADN (1500pb) con la enzima *Hae III*. que muestra el patrón de bandeo de las cepas aisladas. **a**(1-17), **b**(19-30 y 35-43) y **c**(45-60). Bandedos no definidos (13, 36,54)

La restricción con la enzima *Hae* III generó 6 tipos de patrones de restricción (Tabla 2). los tipos I, V, y VI generaron el mayor número de bandas, por otro lado, los tipos II, III, y IV presentaron 4 bandas. El patrón tipo I presentó el mayor número de aislados (15) el, seguido por el tipo V que agrupó a 9 aislados de los 65 analizados (tabla 2).

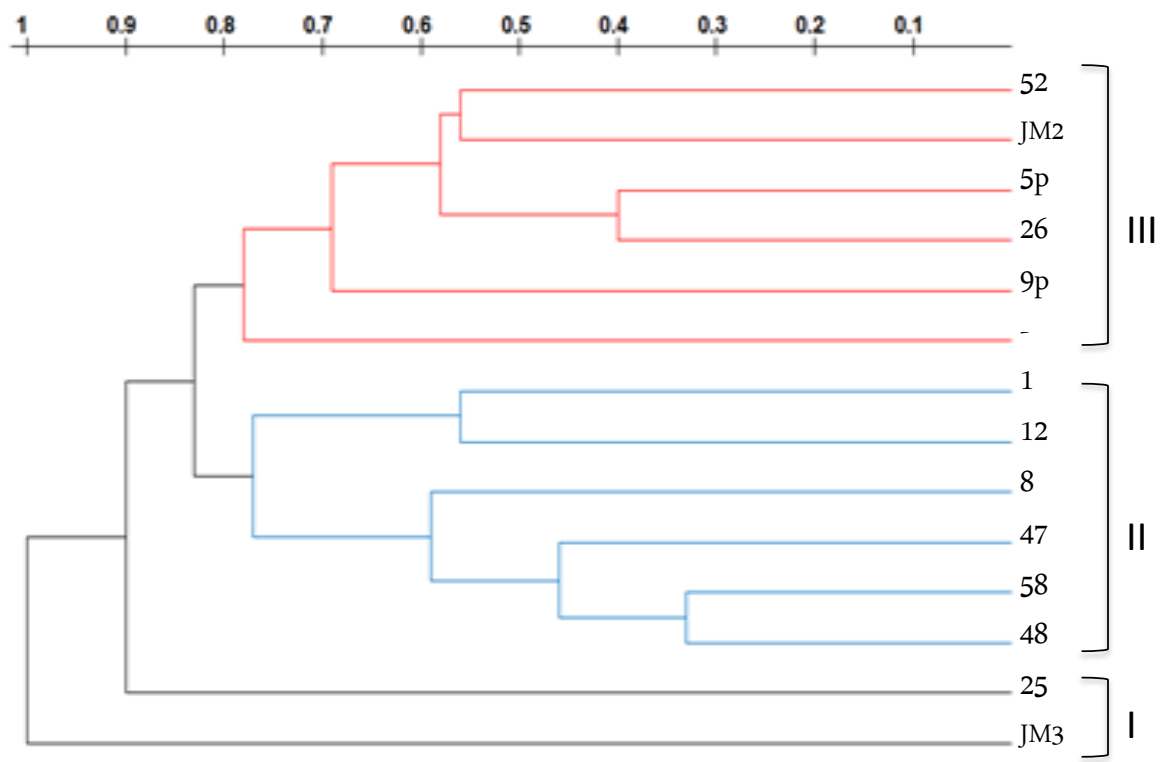
**Tabla 2.** Tipos de bandeos de restricción del ARNr del 16s de 1500pares de base (pb) de las cepas aisladas.

Tipo	Bandeos de restricción	# bandas	Total Pb	ID aislados
<b>I</b>	100-180-240-280-330	5	1130	1,2,11,12,15,19,21,23,24,28,30,39,41,42,58
<b>II</b>	180-190-220-330	4	910	3,5p,6,14,20,22,50,60
<b>III</b>	180-190-230-670	4	1270	4 y 9p
<b>IV</b>	170-330-450-550	4	1500	7,10,25,55,56,57
<b>V</b>	100-200-290-300-320	5	1210	8,16,17,35,37,40,43,45,59
<b>VI</b>	180-200-220-300-310	5	1210	26 y 29

El menor agrupamiento con solo dos cepas bacterianas corresponden al bandeos de restricción tipo III y VI.. La restricción con esta enzima generó un total de 242 bandas para todas las cepas evaluadas, de las cuales 17 bandas fueron polimórficas.

A partir de los diferentes tipos de restricción de los 65 endofitos caracterizados se realizó la construcción de un árbol a distancia mediante el agrupamiento con el método UPGM (Unweighted Pair Group Method with

Arithmetic Mean) (Fig. 13), este agrupamiento generó un cladograma en el cual se evidencia que todas las cepas evaluadas por el análisis de restricción del ADN 16 s ribosomal (ARDRA) formaron tres grupos (I, II y III). Los grupos II y III representan a los endófitos aislados en el medio ATS y ME, mientras que el grupo I corresponden al desarrollo en el medio MRSS. De manera general se observó que el mayor coeficiente de similitud se encuentra representado por el grupo I (cepa 25 y JM3) con aproximadamente 0.90, y las cepas 48 y 58 exhiben un coeficiente de similitud de aproximadamente 0.34 que forman parte del grupo II (Fig. 13).



**Figura 13.** Diagrama de UPGMA que muestra la relación entre las cepas endófitas bacterianas analizadas por ARDRA con la enzima *Hae* III..

### **Secuenciación molecular del ADN 16S ribosomal del amplificado.**

Para la identificación de las cepas aisladas, se seleccionaron 13 cepas de entre los 6 grupos generados a partir del análisis de ARDRA.

Las secuencias completas de ADN resultantes se sometieron a la base de datos de nucleótidos no redundantes en GenBank utilizando el programa BLAST para analizar su identidad. El alineamiento múltiple de los aislados del ADNr 16S y las secuencias de 16S rDNA de referencia de la base de datos de GenBank se realizó mediante la aplicación de clustal W en el programa MEGA. Mientras que, el análisis filogenético encontrado de las secuencias del ADNr 16S demostró una alta similitud con los aislados o clones ambientales previamente obtenidos a partir de diversas fuentes y depositados en la base de datos del GenBank, la topología del árbol filogenético reveló que la agrupación de las secuencias del 16S rDNA de las bacterias endófitas de agave comparadas con las referencias fueron correlacionadas con la posición filogenética de cada secuencia (Anexo X árbol). Todas las secuencias se registraron en la base de datos del GenBank y sus números de acceso se muestran en la tabla 3.

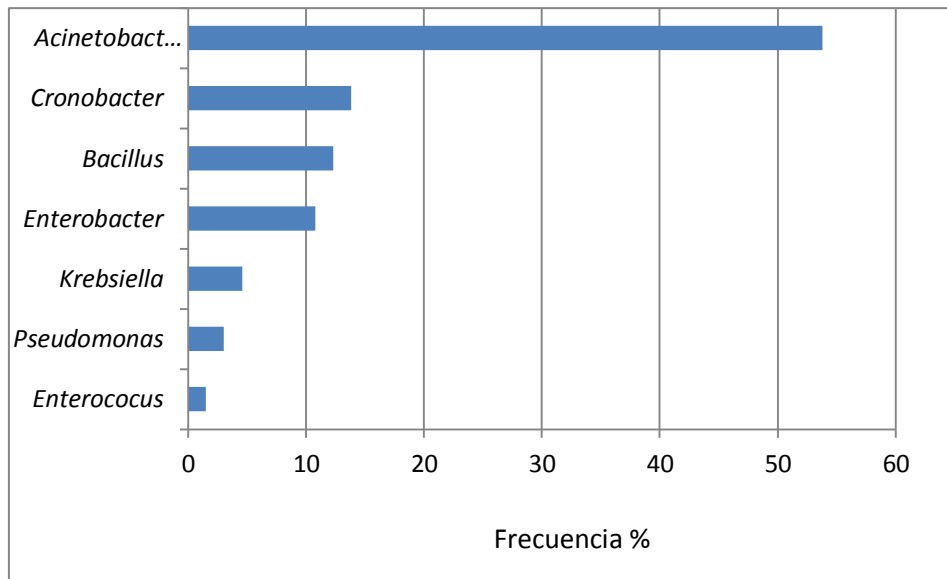
En la Tabla 3 se muestran los resultados de la identificación de los aislados seleccionados. El análisis de resultados mostró que el 85.94% de los endófitos aislados de agave en este estudio corresponden a la clase de *Proteobacterias* (Gram negativas), representadas por los géneros: *Acinetobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Klepsiella* y *Pseudomonas* como se expresa en la tabla 4. La presencia de la clase *Bacilli* fue confirmada en un 14.06% con los géneros de *Bacillus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*. Entre las especies identificadas destacan *Acinetobacter*

*baumanii* (ID: 12 y 48), *A. bereziniae* (8), *Cronobacter sakasaki* (5p), *Enterobacter hormaechei* (52), *Enterococcus casseliflavus* (47), *Klebsiella oxytoca* (26), *Gluconobacter oxydans* (JM2) y *Leuconostoc mesenteroides* (JM3). No se logró identificar las especies de los géneros *Acinetobacter sp* (58), *Bacillus sp* (25 y 56) y *Pseudomonas sp* (9p).

**Tabla 3.** Identificación por secuenciación del ADNr 16S en la base de datos no redundante del GenBank (NCBI utilizando el programa BLAST). Resultados de secuenciación completa utilizando el juego de primers fd1+ rd1.

No.	ID cepa	Identificación de Género y especie	Closest NCBI Match	% de identidad	*Clase	# de acceso al Gen Bank
1	48	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JN669227.1	100	$\gamma$ -proteobacteria	KC461189
2	12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	JN411371.1	99	$\gamma$ -proteobacteria	KC461187
3	8	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	JX035952.1	100	$\gamma$ -proteobacteria	KC461186
4	58	<i>Acinetobacter sp</i>	EF509830.1	100	$\gamma$ -proteobacteria	KC461191
5	25	<i>Bacillus sp</i>	JN797617.1	100	Bacilli	KC461194
6	56	<i>Bacillus sp</i>	JX402432.1	100	Bacilli	KC461193
7	5p	<i>Cronobacter sakazakii</i>	GU227692.1	99	$\gamma$ -proteobacteria	KC461197
8	52	<i>Enterobacter hormaechei</i>	GQ157222.1	100	$\gamma$ -proteobacteria	KC461190
9	47	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AB681222.1	100	Bacilli	KC461188
10	26	<i>Klebsiella oxytoca</i>	HQ189749.1	99	$\gamma$ -proteobacteria	KC461192
11	9p	<i>Pseudomonas sp</i>	FM997697.1	100	$\gamma$ -proteobacteria	KC461198
12	JM2*	<i>Gluconobacter oxydans</i>	JN004201.1	100	$\alpha$ -proteobacteria	KC461196
13	JM3*	<i>L. mesenteroides</i> subsp. Mesenteroides	HM218680.1	100	Bacilli	KC461195

\*Endofitos aislados en MRS suplementado con 25% de sacarosa



**Figura 14.** Frecuencias de los géneros identificados

Los resultados muestran que el género *Acinetobacter* exhibió la frecuencia de aparición más alta (53.8%), y *Cronobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Enterococcus* en conjunto representan el 46.2% de todos los aislamientos cultivados en el medio de AST como muestra la figura 14.

**Evaluación de la actividad antifúngica (antagónica) y selección de los endófitos con actividad en la promoción de crecimiento en la planta (PCP). Análisis de la actividad promotora de crecimiento vegetal y de antagonismo contra *F. oxysporum* AC132 de los aislados bacterianos.**

En este trabajo se determinó la fijación de nitrógeno, la producción de AIA y solubilización de fosfato en todas las cepas identificadas. Como se muestra en el tabla 4, el análisis propone que las cepas pueden tener actividad como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV).

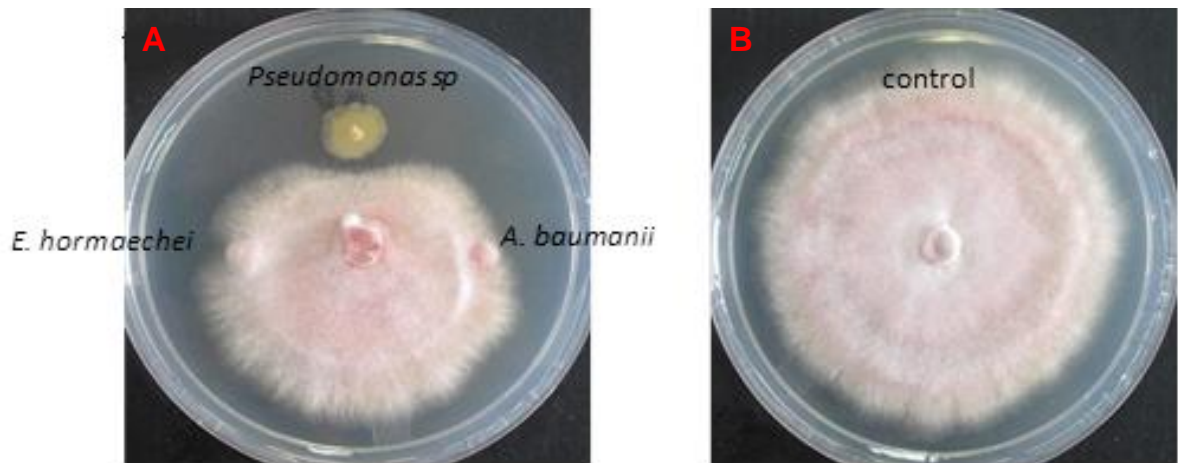
La bacteria *C. sakasakii*, presenta capacidad de fijación de nitrógeno, producción de indol acético y disolución de fosfatos. *K. oxytoca* y *Pseudomonas sp.* mostraron capacidad de producción de indol acético y disolución de fosfatos respectivamente (Fig. 13). Solo *Pseudomonas sp.* presentó la mayor actividad antagónica contra *F. oxysporum* AC 132 (Fig.12). Todas las cepas del genero *Acinetobacter* aisladas son capaces de fijar el nitrógeno, producir AIA y solubilizar el fosfato *in vitro*. Aun cuando las tres cepas de *A. baumannii*, *A. bereziniae* y *Acinetobacter sp* pertenecen al mismo género, su capacidad para fijar el nitrógeno varía dentro de los resultados obtenidos (Tabla 4). El resultado expresa que la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, que no ha sido reportado como un PCV hasta el momento, ha demostrado ser una cepa con capacidad de fijación de nitrógeno (Tabla 4). El endófito *Enterobacter hormaechei* mostró poca habilidad para la fijación de nitrógeno, nula actividad en la producción de ácido indol acético, pero una buena capacidad de solubilización de fosfatos.

**Tabla 4.** Resultados preliminares de ensayos en PCP *in vitro* de las bacterias endófitas de agave.

<b>Bacterias Endófitas</b>	<b>Fijación de N<sub>2</sub></b>	<b>AIA</b>	<b>Disolución PO<sub>4</sub><sup>---</sup></b>	<b>antagonismo <i>Fusarium oxysporum</i></b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	++	++	++
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	++	-	++	+
<i>Acinetobacter sp.</i>	+++	++	+	+
<i>Cronobacter sakazakii</i>	+++	+++	+++	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>	+	-	+++	++
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+++	+++	+
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	+++	++++	++++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	++	+++	-	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	++	+++	+	+
<i>Bacillus sp.</i>	+	-	+++	++

nd: no determinado, - negativo, + respuesta baja, ++ media, +++ Fuerte, ++++ muy fuerte

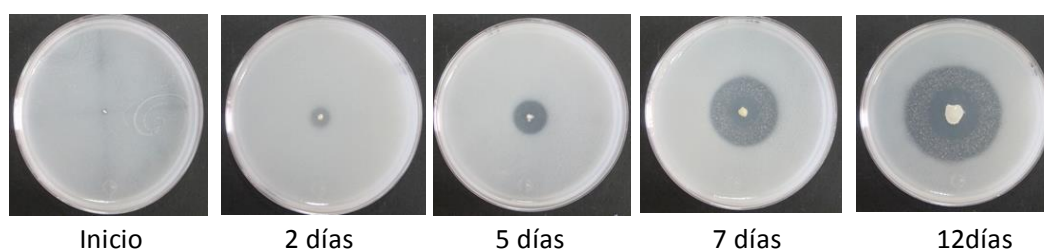
En general, muchos endófitos poseen la capacidad de solubilización de fosfatos, que puede no ser importante una vez colonizando el interior de la planta. Sin embargo, durante su etapa como bacteria epífita de la rizósfera esta capacidad de solubilizar fosfatos quizá sea su principal función para beneficio de la planta antes de ingresar y colonizarla



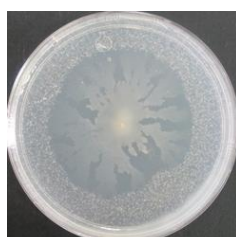
**Figura 15.** Análisis cualitativo de la actividad antagonística de las cepas endófitas contra *Fusarium oxysporum* AC132 a los 7 días de incubación. **A.** Ensayo con tres cepas bacterianas endófitas. **B.** Crecimiento del hongo control.

Los resultados en esta prueba sugieren que la cepa de *Pseudomonas sp* (Tabla 4) es el antagonista más eficaz contra *F. oxysporum* AC 132, además de ser productora de AIA, y de solubilizar el fosfato (Fig. 16). Se podría considerar como un posible agente de control biológico prometedor para controlar el ataque de *Fusarium sp* a la planta de agave. *Enterococcus casseliflavus*, mostró la mayor producción de AIA de entre las cepas analizadas (tabla 4).

**A** *Cronobacter sakazakii*



**B** *Pseudomonas sp*



12 días

**Figura 16.** Evaluación *in vitro* de la solubilización de fosfatos por: **A.** *Cronobacter Sakazakii* al 2<sup>o</sup>, 5<sup>To</sup>, 7<sup>mo</sup> y a 12 días de incubación y **B.** *Pseudomonas sp* a los 12 días.

<b>Actividad de promoción de crecimiento<sup>a</sup> (DS)</b>				
<b>ID</b>	<b>Bacterias endófitas</b>	<b>% de fijación de N<sub>2</sub><sup>b</sup></b>	<b>Producción de AIA<sup>c</sup> (ppm)</b>	<b>Indice de Solubilidad de fosfatos<sup>d</sup></b>
12	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.16 (0.04)	4.1 (0.07)	8.9 (0.2)
8	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	0.30 (0.11)	3.0 (0.06)	4.7 (0.4)
58	<i>Acinetobacter sp.</i>	1.31 (0.36)	5.7 (0.62)	9.7 (2.6)
25	<i>Bacillus sp.</i>	0.14 (0.04)	1.2 (0.17)	0
5p	<i>Cronobacter sakazakii</i>	1.07 (0.61)	3.1 (0.15)	4.3 (0.2)
47	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0.50 (0.06)	16.7 (1.04)	6.3 (0.2)
52	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0.08 (0.00)	7.2 (1.01)	3.8 (0.8)
26	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.13 (0.08)	14.4 (0.56)	3.4 (0.5)
9p	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.16 (0.04)	2.8 (0.44)	2.5 (0.04)
JM3	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	0.53 (0.16)	1.7 (0.01)	0

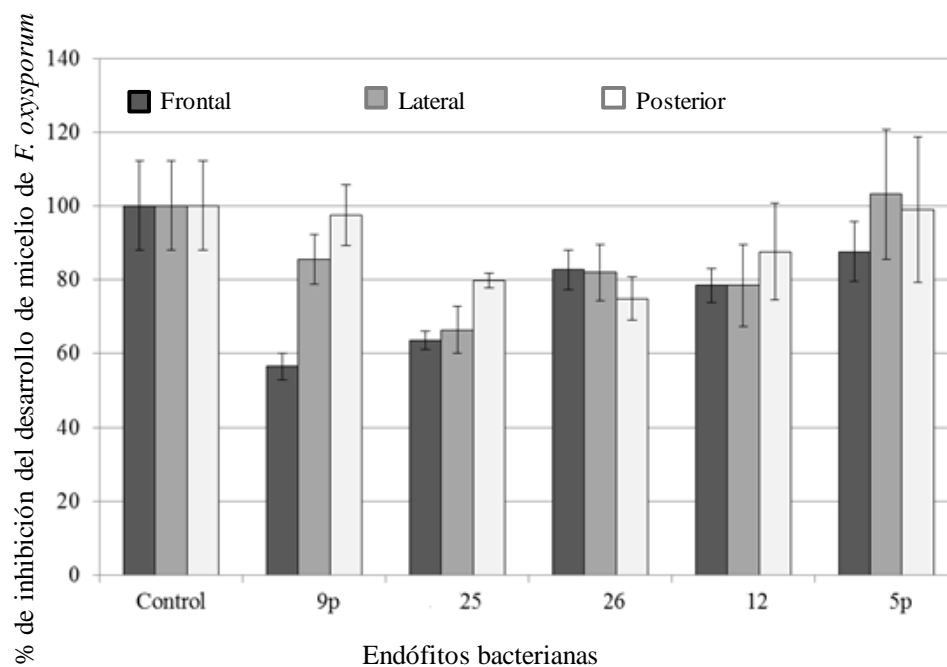
<sup>a</sup> Ensayo por triplicado. La desviación estándar en paréntesis (DS).

<sup>b</sup> Cálculo del radio etileno/acetileno x 100 del área del pico.

<sup>c</sup> Concentración del ácido indol acético en partes por millón.

<sup>d</sup> ISP: = (diámetro de la colonia + diámetro del halo de solubilización)/diámetro de la colonia

Cinco cepas bacterianas endófitas de este estudio que mostraron antagonismo positivo fueron ensayadas de acuerdo a la determinación descrita por Fokkema, N.J. (1973) para cuantificar la respuesta antagónica de las bacterias contra *F. oxysporum* AC132 mediante la medición del crecimiento radial del micelio hacia el frente, hacia los lados y hacia atrás a partir del disco con micelio de *Fusarium* (figura 9).



## DISCUSIONES

El *Agave tequilana* o agave azul se ha convertido en un recurso natural de gran importancia para México, pero a pesar de que el agave se cultiva desde hace más de 200 años, no existen escritos que evidencien las relaciones simbióticas mutualistas que estas plantas forman con los microorganismos, principalmente bacterias endófitas, y como es adquirida la simbiosis por transmisión vertical u horizontal. Esto permitira la evaluación del potencial para detener el ataque contra cepas patógenas de hongos como *Fusarium oxysporum* o bacterias como *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovora*), que son dos de los principales microorganismos que generan severas devastaciones en los campos de cultivo y por ende importantes pérdidas económicas.

Los resultados de esta investigación en base a 100 plantas de *A. tequilana* pone de manifiesto que la planta alberga un número importante de bacterias endófitas asociadas a la base de la hoja de agave, con una densidad poblacional de bacterias cultivables de  $11.0 \times 10^5 (\pm 1.9)$  y  $10.4 \times 10^5 (\pm 2.0)$  UFC/g en agar tripticaseína de soya (ATS) y agar para métodos estándar (ME) respectivamente (no se encontró una diferencia significativa entre ambos medios de cultivo). (Quecine et al., 2012a), reportó una densidad poblacional de bacterias endófitas cultivables dentro de la rizósfera de  $8.6 \times 10^5$  UFC/g, en raíz, de  $7.1 \times 10^5$  UFC/g, y en los tejidos internos aéreos de plantas de caña de azúcar de  $2.2 \times 10^3$  UFC/g con una concentración de azúcares del 10%, muy similar al encontrado en el tejido de agave. Estos datos demuestran la capacidad de colonización de las bacterias en los tejidos internos de la planta, sin alterar su equilibrio, pues ninguna de las plantas muestreadas presentó

síntomas de daño por plagas o enfermedades. En la determinación de azúcares reductores en hoja de agave encontramos hasta un 10-15% de azúcares simples como fructosa, glucosa y sacarosa, que son la principal fuente de carbono para el desarrollo de los microorganismos, esencial para permitir la colonización de poblaciones microbianas.

(Bacon, Hinton, Mitchell, Snook, y Olubajo, 2012) han dedicado sus investigaciones en el estudio de la colonización de endófitos en diversos nichos en las plantas, localizándose preferentemente en los espacios intercelulares del tejido cortical de la raíz y en el parénquima de los tejidos foliares. Ellos describen que son sitios en los cuales circulan muchas sustancias que son aprovechadas por los endófitos como nutrientes: sacarosa, glucosa y fructuosa principalmente, además de compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos de cadena corta como malato, entre otros, proteínas solubles, fitohormonas como auxinas, ácido absicico y citocininas, y minerales como el calcio. De la misma forma, (Mercado-Blanco y Prieto, 2012) proponen que la colonización bacteriana por endófitos está muy relacionada con la capacidad de estimular el crecimiento de la planta a través de diferentes mecanismos, entre los cuales están su capacidad de solubilizar fosfatos, de fijar nitrógeno, de producción de ácido 3- indol-acético (AIA), como la de reducir o prevenir la infección por patógenos. Es muy probable que esto esté sucediendo en la planta de agave, pues en su ciclo de vida de 8 a 10 años, seguramente existe un constante equilibrio simbiótico bacteria-planta. Este es el primer estudio en que se reporta el aislamiento, la caracterización e identificación de bacterias endófitas en agave.

El número de cepas aisladas inicialmente en este estudio comprendió un total 350 bacterias, pero en este trabajo nos enfocamos a 65 bacterias endófitas provenientes del tejido de la hoja. Los microorganismos predominantes en este estudio fueron de la clase Proteobacterias (Gram negativas) con un 85.9% y el resto a la clase Bacilli (phylum: Firmicutes: Gram positivas) con el 14.1%. Las asociaciones de las plantas y las bacterias ocurren tanto en los Firmicutes (Gram positivas) como en las  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -Proteobacterias (Gram negativas), más allá de sus diferencias morfológicas y especializaciones bioquímicas que promueven beneficios derivados de la asociación. (Dai et al., 2014).

La diversidad endófitas bacteriana presente en las plantas analizadas de agave indica una heterogeneidad endofítica centrada en 7 géneros bacterianos: *Acinetobacter* (53.8%) que presenta la frecuencia más alta, *Cronobacter* (13.8%), *Bacillus* (12.3%), *Enterobacter* (1.5%), *Klebsiella* (4.6%) y *Pseudomonas* (3%). Por lo anterior, se ha considerado a estos géneros como los grupos dominantes en las plantas de agave. Romero, Marina, y Pieckenstain, 2014, compararon las comunidades bacterianas endófitas de hoja y rizosfera del tomate concluyendo que los endófitos de hoja están representados en un 90% por Proteobacterias y que difirieron de las bacterias rizosféricas. Probablemente esto sucede por la especialización de las bacterias en la colonización de cada tipo de tejido, como las bacterias encontradas en la base de las hojas de en nuestro estudio.

La presencia de los géneros: *Acinetobacter*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, y *Enterococcus*, en las hojas apoyan la idea de que la colonización de diferentes tejidos dentro de la planta sucede

al desplazarse los endófitos desde la raíz hasta las hojas (Gan, et al., 2014; Krishnan, et al., 2012; Malfanova, et al., 2013; Wang et al., 2013).

En la caracterización molecular por el análisis de ARDRA (Análisis de Restricción del DNA 16S Ribosomal Amplificado) el mayor número de cepas endófitas se encontró formando parte de los bandeos tipo I y V, que corresponden al género *Acinetobacter*. Wang et al., 2013 trabajó un consorcio bacteriano con el uso del análisis por ARDRA que las identificó a partir de los bandeos de restricción, entre las que destacan *Pseudomonas sp*, y en baja frecuencia a *Acinetobacter sp*. Sin embargo, el análisis permite caracterizar solo en género, limitándose a la identificación de cada especie, aunque se logra destacar que los bandeos fueron evidentes para cada grupo de las endófitas bacterianas observadas.

En conclusión la restricción con la enzima *Hae III* generó un total de 242 bandas para las cepas evaluadas, de las cuales 17 bandas fueron polimórficas, significándose la heterogeneidad encontrada. Debido a estos resultados el análisis del patrón de bandeo permite diferenciar de manera parcial cada aislamiento, por lo que el ARDRA es una herramienta que aporta ventajas en la caracterización molecular de cepas bacterianas endófitas, antes de la identificación por secuenciación.

Interesantemente Hernández-Rodríguez et al., 2012 lograron aislar la comunidad bacteriana del suelo (rizósfera y fuera de la rizósfera) de tres especies de cactus (*Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*), de zonas semiáridas de México. Encontraron que los grupos bacterianos más abundantes corresponden a Proteobacterias, Actinobacterias

y Firmicutes. La presencia de los géneros de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, fue reportada en el estudio, similar a lo encontrado en el nuestro.

Como ya se ha venido mencionando, numerosas investigaciones atribuyen propiedades a los microorganismos endófitos y han sido ampliamente estudiadas en diferentes cultivos como: caña de azúcar, maíz, trigo, banano, papa, tomate, entre una diversidad de plantas. Se sabe también que los beneficios de los endófitos sobre las plantas incluyen principalmente la promoción del crecimiento y la defensa ante el ataque de patógenos (Bacon y Hinton, 2002; Bulgari et al., 2012; Cereus, et al., 2011; Mercado-Blanco y Prieto, 2012). Considerando estos dos factores, se analizaron las propiedades benéficas de las cepas endófitas bacterianas encontradas en la planta de agave: la capacidad de fijación de nitrógeno, la producción de ácido indol acético y la solubilización de fosfatos como indicadores de la promoción de crecimiento. La inhibición (antagonismo) *in vitro* fue estudiada frente al hongo patógeno *Fusarium oxysporum* AC132 aislado de una plantación de *Agave tequilana* proporcionado por el Dr. J. Xavier Uvalle-Bueno de Azul Agricultura y Servicios S.A. de C.V. y actualmente referenciado en el trabajo de (Vega-Ramos et al., 2013).

De las trece cepas endófitas identificadas, las bacterias pertenecientes al género *Acinetobacter* destacan por su potencial en el ensayo de solubilización de fosfatos siendo *A. baumannii* y *Acinetobacter* sp. las más eficaces. Se sabe que el fósforo es uno de los nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo y reproducción de las plantas, el cual es absorbido por la planta como ion fosfato. (Shi, Lou, y Li, 2011) en su investigación destaca la

inoculación de *Acinetobacter johnsonii* en remolacha de azúcar analizando la capacidad de la cepa para solubilizar fosfatos y observó un aumento en el nivel de fósforo en la planta, encontrando mayor crecimiento en la misma. Sin embargo, *Cronobacter sakazakii* (JM5p) mostró actividad moderada en los ensayos para solubilización de fosfatos, producción de AIA y fijación de nitrógeno. Schmid et al., 2009 reporta diferencias entre cuatro cepas de *C. sakazakii* en la producción de AIA y la disolución de fosfato. En particular *C. sakazakii* antes llamada *Enterobacter sakazakii* ha sido aislada como endófito del cactus *Mamillaria fraileana* con actividad para solubilizar fosfato inorgánico (Lopez, Bashan, y Bacilio, 2011).

*Klebsiella oxytoca* JM26 mostró ser una de las más productoras de AIA ( $14,4 \pm 0.56$  ppm), y está considerada como una endófito diazotrófica debido a que produce altos rendimientos de AIA y fija nitrógeno. Sin embargo, en este trabajo *K. oxytoca* no destaca en la actividad para fijar el nitrógeno. Existen múltiples evidencias de las propiedades benéficas de las bacterias del género *Klebsiella* en la promoción de crecimiento en plantas (Taylor, Adachi, Nakatani, & Mochida, 2011).

*Enterobacter hormaechei* JM52 mostro capacidades para producir ácido indol acético y solubilización de fosfatos, sin embargo baja capacidad de fijar el nitrógeno. Thokchom, Kalita, y Talukdar (2014) la propone como un endófito promotor del crecimiento en plantas de mandarina y además concluye que puede ser una bacteria prometedora como bioinoculante en edades tempranas en plantas de estos cítricos.

Este es el primer informe de *Enterococcus. casseliflavus* como endófito, debido a que fue la cepa con mayor producción de AIA con  $16.7 \pm 1.04$  ppm en este estudio. La bacteria aún no ha sido reconocida como un endófito de planta, sin embargo, se le ha relacionado en varias ocasiones con la filósfera, y se considera como un importante simbiote de la rizosfera en plantas (Ulrich, Stauber, & Ewald, 2008).

*Fusarium oxysporum* es un hongo ascomiceto ampliamente estudiado por causar daños graves a una extensa variedad en cultivos de interés agronómico, y plantas ornamentales de todo el mundo (Inami et al., 2014). El patógeno entra en las plantas huésped a través de las raíces y causa infección sistémica progresiva por daño vascular, marchitamiento y finalmente la muerte de la planta. (Inami et al., 2014; Sharma et al., 2014), *F. oxysporum subsp. cubense* es el agente causal en el marchitamiento en banano y uno de los más severos, limitando la producción del cultivo con graves pérdidas económicas en todo el mundo (Guo et al., 2014).

La planta de Agave (*A. tequilana* Weber var azul) no es la excepción, se estima que más del 40% de los plantíos son infectados por este hongo, sin embargo puede dar lugar hasta el 100% de pérdidas en los cultivos cuando las condiciones son favorables para el fitopatógeno (Vega-Ramos et al., 2013, Gómez-Ortiz et al, 2011). La importancia de este hongo es que ha adquirido resistencia a los fungicidas químicos, provocando inversiones cuantiosas en los tratamientos para erradicarlo.

Sin embargo, el control sobre los organismos patógenos mediante la acción de bacterias endófitas puede ser específico para un fitopatógeno o para diferentes patógenos.

Cinco de nuestras cepas bacterianas aisladas: *Acinetobacter bereziniea* (JM8), *Cronobacter oxytoca* (JM26), *Cronobacter sakasaki* (JM5p), *Bacillus sp* (JM25) y *Pseudomonas s.* (JM9p) mostraron antagonismo (inhibición) contra la cepa patógena *F. oxysporum* AC132 de agave en nuestros ensayos *in vitro*. *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* mostraron ser los más eficientes en la inhibición del crecimiento del hongo mientras que las otras mostraron una actividad de moderada importancia.

Varios estudios recientes han reportado el efecto antagónico de bacterias contra hongos fitopatógenos. Gopalakrishnan et al. (2011) reporta a *K. oxytoca* y *Pseudomonas sp.*; Rameshkumar et al. (2012) a *Pseudomonas*, Rokhbakhsh-Zamin et al. (2011) a *Acinetobacter*, incluyendo *A. baumannii*; y Schoebitz et al. (2009) reporta a *Enterobacter ludwigii*. Resulta interesante que *A. baumannii* JM12 aislada de agave no inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* AC132, Rokhbakhsh-Zamin et al. (2011) reporta que *A. baumannii* es un antagonista fuerte contra *F. oxysporum* MCTT 284 aislada de la rizosfera de la planta *Pennisetum glaucum*. Estos hallazgos sugieren que el modo de acción ejercida y o el tipo de metabolito antifúngico producido por las cepas aisladas varía, y aun si son diferentes taxonómicamente una de la otra. Las bacterias *Pseudomonas sp* (JM9p) y *Bacillus sp* (JM25) que inhibieron más eficaz el crecimiento del hongo experimentaron una zona de inhibición en la caja Petri lo suficientemente grande para evitar el contacto físico con el hongo (fig. 15), lo

que sugiere que las cepas podrían estar secretando metabolitos de control biológico al medio de cultivo, tanto volátiles como solubles en el agar. (Lamsal, Kim, Kim, y Lee, 2012) discute en su reporte que *B. subtilis* producen algunos compuestos volátiles que activan la ruta de resistencia sistémica inducida en plantas. Además, especies de *Bacillus* aisladas de la rizósfera del suelo se han reportado como antagonistas al controlar varios patógenos de plantas transmitidos por el suelo.

El crecimiento hacia adelante se vio suprimido significativamente en la presencia de los cinco aislados ensayados ( $p < 0,05$ ). *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* mostraron el desarrollo frontal más bajo del hongo con un 50 y 58% de inhibición, respectivamente. Sin embargo, el crecimiento micelial trasero de *Pseudomonas sp.* fue prácticamente el mismo que el del control (97%), sugiriendo que la inhibición se da principalmente por compuestos difusibles en el medio de cultivo. De forma interesante, las cepas *K. oxytoca* (JM26) y *Bacillus sp.* (JM25) inhibió el crecimiento del patógeno en la misma medida para las tres direcciones (frontal, laterar y trasera), lo que nos lleva a pensar en una participación de compuestos volátiles con efecto inhibidor del crecimiento del fitopatógeno.

En cambio, *Bacillus sp.* (JM25), mostró una inhibición trasera significativa. Además de *A. bereziniae* (JM8) y *C. sakazakii* (JM5p) probablemente inhiben el crecimiento de hongos por compuestos volátiles y no volátiles. Algunos estudios han mostrado el papel de los compuestos volátiles por endófitos en la inhibición de patógenos fúngicos (Edward, et al., 2013; Tenorio-Salgado, et al., 2013). La aplicación de controles biológicos en cultivos

ha ido incrementando, siendo *Bacillus* y *Pseudomonas* los agentes más ampliamente estudiados, y son la base de muchos productos comerciales que actualmente se encuentran disponibles en el mercado.

Es una hipótesis razonable que las bacterias se mantienen como endófitos en piñas de agave, ya que son benéficos para las plantas de múltiples maneras y aumentan la capacidad de las plantas para crecer y sobrevivir.

Recientemente, la técnica de reproducción clonal (micropropagación) en el agave azul está siendo explotada con el fin de mantener los cultivos libres de contaminación por fitopatógenos. Sin embargo, durante el procedimiento para reproducción de la plántula existe la posibilidad de eliminación de endófitos beneficiosos, que podrían ser heredadas a través de rizomas en los procesos naturales o por el cultivo tradicional con hijuelos. Es posible que las técnicas de micropropagación puedan reducir los niveles de poblaciones de endófitos con la consecuencia de que las plantas se vuelven menos resistentes al estrés biótico y abiótico manteniéndolas dependientes de los agroquímicos. Se necesitan más estudios para determinar si la pérdida de los endófitos se produce durante el proceso de la micropropagación y evaluar formas de restituir los microorganismos endófitos perdidos en las plantas micropropagadas.

Finalmente un mejor conocimiento en el estudio de las comunidades endófitas microbianas asociadas con la planta de agave (*A. tequilana* Weber variedad azul) pueden proporcionar las bases para el desarrollo de estrategias biotecnológicas para el manejo de enfermedades, que aprovechen las

poblaciones de endófitos nativos para promover la salud de las plantas y el suelo favoreciendo el control de las enfermedades, aplicándolos como agentes biológicos usados en combinación con dosis bajas de agroquímicos.

## CAPITULO 2

## **Capítulo 2**

### **Characterization endophytic bacteria *Leuconostoc mesenteroides* of plants of *Agave tequilana* weber var blue.**

**Julia del C. Martínez-Rodríguez<sup>a</sup>, Marcela De la Mora-Amutio<sup>a</sup>, Esmeralda Audelo-Regalado<sup>b</sup>, Yanett I. Gallegos-Díaz<sup>c</sup>, Alan Ibarra-Arias<sup>b</sup>, Luis A. Plascencia-Correa<sup>b</sup> Adelfo Escalante<sup>d</sup>, Miguel J. Beltrán-García<sup>b\*</sup> and Tetsuya Ogura<sup>b\*</sup>**

a) Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, campus Mexicali, Calle de la Normal S/N y Blvd. Benito Juárez, Col. Insurgentes Este, 21280, Mexicali, México

b) Departamento de Química, Instituto de Ciencias Exactas y Terrestres, Universidad Autónoma de Guadalajara, Av. Patria 1201, Col. Lomas del Valle, 45129, Zapopan, Jalisco, México. E-mail: [mbeltran71@hotmail.com](mailto:mbeltran71@hotmail.com), [togura@uag.mx](mailto:togura@uag.mx); Tel. (+52) 33 36488824 Ext. 32433.

c) Biofertilizantes Mexicanos. Río de janeiro 590, Col.Latinoamericana, Saltillo. Coahuila.

d) Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001, Col Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

\*Corresponding authors

*The manuscript presented in this chapter is in preparation and will be submitted for publication in Microbial Biotechnology report*

## **Caracterización de *Leuconostoc mesenteroides* como endófito de plantas de agave (*A. tequilana* Weber var azul): aplicación industrial de los hallazgos.**

### **RESUMEN**

Entre septiembre de 2010 y mayo de 2011 se realizaron muestreos de plantas de propagación convencional (hijuelos) y cultivadas *in vitro* (micropropagadas) en un predio de la empresa Brown Forman-Casa Herradura denominado "El Copal". Se registraron los pesos de las piñas y se aisló *Leuconostoc mesenteroides* (*Lm*). Para aislar esta bacteria se usó el medio selectivo: Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con sacarosa. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) con un resultado de 2-4 UFC de *Lm* por gramo de tejido de la piña. Los tejidos utilizados para el aislamiento fueron: base del cogollo, base de la hoja y centro de la piña. Los resultados del análisis para el *Leuconostoc mesenteroides* muestran que la base de la hoja tiene el mayor número de bacterias por gramo de tejido. No se encontró a *L. mesenteroides* en la base del cogollo. Se obtuvieron 31 cepas, que fueron identificadas bioquímicamente por el sistema API 50 CHL, con un 99% de identidad para la bacteria. De forma adicional, todas las cepas se identificaron por secuenciación del ADNr 16S mostrando una identidad del 100% a *Leuconostoc mesenteroides*. La presencia de esta bacteria en tejidos sanos de agave muestra que *L. mesenteroides* es un endófito en la planta.

## INTRODUCCIÓN

El sector del Agave, tequila y productos derivados del agave como la inulina y el jarabe de agave (miel), están tomando gran impacto económico en Jalisco y en México. Existe una creciente demanda de ingredientes derivados del agave, con alto valor agregado por su aplicación en productos con propiedades nutracéuticas y funcionales.

En las plantas de agave los principales carbohidratos son las inulinas la cuales se encuentra entre un 25 a 30% del peso total de la piña con un 7% de sustancias no solubles y el resto es agua (65%). Las piñas de agave son exprimidas para la obtención de un jugo rico en inulina de fácil extracción, esto está facilitando al aumento acelerado de industrias por la obtención de inulina y el jarabe de agave como productos comerciales. La empresa IMAG (inulina y miel de agave S. A. de C. V.) obtiene un promedio a 100,000ml litros de jugos por día de los cuales son destinados a producir inulina y jarabe (30 toneladas diarias) (Fuente: IMAG 2013) sumando a esto existe otras 20 plantas productoras de inulina y de jarabe de agave que están absorbiendo una cantidad considerable e importante de plantas agave.

Sin embargo, la creciente industria llega a presentar problemas que tienen que ver con los microorganismos procedentes de la piña de agave. En años recientes la empresa IMAG presento en su jugo extraído la dificultad para filtrar y presento una consistencia viscosa, buscando solucionar se encontró que el problema venia de las piñas, analizando el tejido vegetal se observó pegajoso, y el estudio microbiológico mostró una bacteria que fue identificada a *Leuconostoc mesenteroides* descrita como enemiga número uno de los

ingenios azucareros por producir dextranos sustancias no solubles y pegajosas. Sin embargo, en la producción de inulina y miel de agave la presencia de un acontecimiento similar al de los ingenios azucareros se piensa en formación de levanos compuestos análogos a las dextranas producidas por esta bacteria.

Es conocido que *L. mesenteroides* está presente en los procesos de obtención del pulque a partir del agua miel de algunas especies de agave (*A. americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*) en el típico sabor y la consistencia viscosa de la bebida (Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008). Metabólicamente *L. mesenteroides* produce sustancias tipo levanos en presencia de la sacarosa por las enzimas como levansucrasas que catalizan la polimerización de fructosa a levano ((Lewis, Sm, & Series, 1967; Morales-Arrieta, Rodríguez, Segovia, López-Munguía, & Olvera-Carranza, 2006; Olvera, Centeno-Leija, & López-Munguía, 2007) Es una posibilidad que la babosidad y viscosidad del pulque atribuido a *L. mesenteroide* se deba a la síntesis del levano de alto peso molecular (2000 a 3000 KDa) (Muñoz-Gutiérrez, Rodríguez-Alegría, y López Munguía, 2009).

En el trabajo de investigación un objetivo planteado fue determinar a la bacteria en la piña de agave, formulándonos las siguientes preguntas ¿cual es el alcance de la bacteria en la planta: ¿es un endófito? ¿un patógeno? o ¿un saprofito? ¿es transmitida verticalmente desde la planta madre? Sin embargo, hemos considerado que puede llegar a ser una bacteria protagónica para la industria de la inulina y jarabe de agave.

## OBJETIVO GENERAL

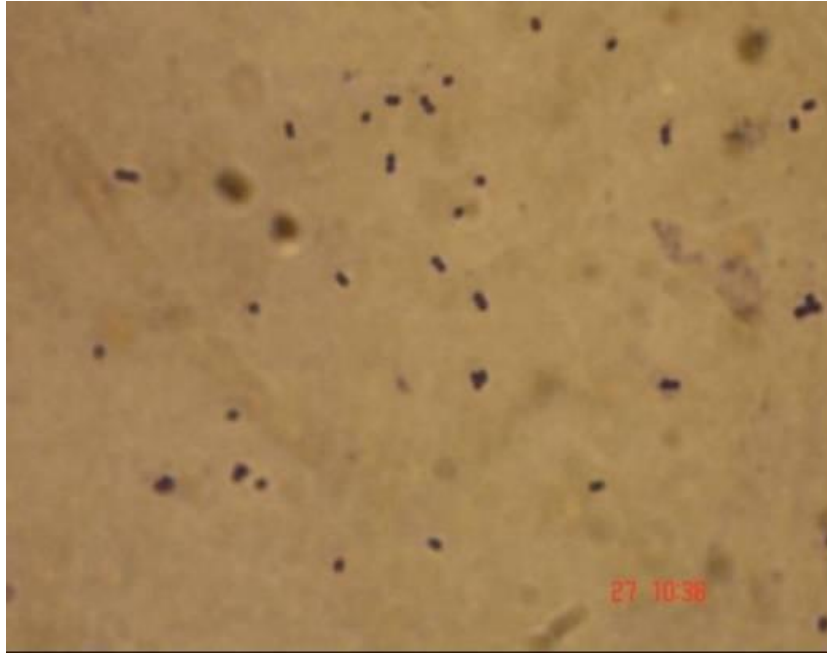
Aislar y caracterizar a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en plantas de agave (*Agave tequilana* Weber var. *Azul*) cultivadas mediante propagación convencional (a partir de hijuelos) y en plantas cultivadas por propagación *in vitro*. Así como la tipificación e identificación molecular de las cepas por el análisis de restricción y secuenciación del ADN 16s ribosomal.

### Objetivos particulares

1. Aislar a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en tejidos de agave, y su caracterización en el medio de cultivo MRS implementado con sacarosa.
2. Determinar la carga bacteriana por gramo de tejido mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/g) en placa.
3. Identificar las cepas bacterianas aisladas mediante una galería bioquímica del sistema API 50CH para *Lactobacilos*.
4. Caracterizar molecularmente las cepas aisladas mediante el Análisis de Restricción del ADN Ribosomal 16s (ARDRA)
5. Identificar las cepas caracterizadas por la secuenciación del ADN ribosomal16s (1500pb)

## ANTECEDENTES

*Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* y *Fructobacillus* son géneros relacionados entre sí por ser bacterias ácido lácticas. En base a la secuenciación del ARNr 16S, Collins y colaboradores (1993) propusieron que *Leuconostoc paramesenteroides* y especies afines del género *Lactobacillus* como *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minor* y *L. viridescens* fueran reclasificados al género *Weissella*. Sin embargo, Dicks y colaboradores (1995) asignaron a *Leuconostoc oenos* al género *Oenococcus*. Endo y Okada (2008) proponen asignar varias especies de *Leuconostoc* al reciente género *Fructobacillus* pero Schleifer (2009), propone asignar a *Leuconostoc*, *Weissella* y *Oenococcus* (incluyendo las especies sinónimas de *Fructobacillus*), en la familia recientemente formada de *Leuconostocaceae*. Los miembros de esta familia muestran mayor similitud al género *Lactobacillus*: todos son Gram-positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y se caracterizan por ser heterofermentativas del ácido láctico. Las diferencias entre los géneros se deben a su morfología microscópica, es decir, la forma de las bacterias vistas al microscopio, todas las especies de *Leuconostoc* y *Oenococcus* exponen morfología ovoide (bacilos ovalados o cocobacilos por la similitud a cocos), mientras que los miembros del género *Fructobacillus* tienen forma de barra cilíndrica o de bastón. Para las especies *Weissella* se presentan dos morfologías: ovoide (cocobacilo) y vara (bastoncillo).



**Figura 17.** Morfología microscópica de *Leuconostoc mesenteroides* teñida sobre tejido de *Agave tequilana* Weber var azul.

### **Especies en la familia *Leuconostocaceae***

Según la información mostrada por en el manual de Bergey's (<http://www.bergey's.org>) el género *Leuconostoc* está representado por 23 especies y cuatro subespecies de *mesenteroides*. Sin embargo, varios de los nombres de las especies son sinónimos del género *Leuconostoc* como por ejemplo *L. argentinum* y *L. lactis* o *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* y *L. cremoris*) o dentro de diferentes géneros como por ejemplo *L. pseudoficulneus* y *F. pseudoficulneus*, *L. paramesenteroides* y *W. paramesenteroides*, *L. oenos* y *O. oeni*.

Para fines de estudio la mayor importancia de *Leuconostoc* reside en que es un género relacionado con el deterioro de productos como la carne, el pescado y el azúcar de la caña (Quecine et al., 2012b); así como en el aspecto de uso para fines industriales, involucrada en procesos de fermentación

principalmente la láctea *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. lactis* y *L. pseudomesenteroides* son los principales responsables de la producción del aroma en las fermentaciones lácteas (Farrow *et al.*, 1989). Además, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* es uno de los elementos más importantes de las fermentaciones vegetales al estar implicado en la fermentación de los granos de café; y como iniciador junto con *L. fallax* de la fermentación del chucrut (del francés, *choucroute*) o col agria, muy utilizada en la gastronomía Alemana. Además, *L. mesenteroides*, *L. citreum*, *L. gelidum* y *L. kimchii* son especies dominantes en la fermentación temprana del kimchi (col china), además el *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* juega un papel clave en las fermentaciones de masa fermentada (Schleifer, 2009).

La mayor parte de cepas de *Leuconostoc* industrialmente relevantes se pueden clasificar como *L. mesenteroides* o *L. pseudomesenteroides* (Pedersen, *et al.*, 2014).

## **El Pulque**

En 1953 Sánchez-Marroquín (1967), investigador mexicano reconocido por sus aportaciones científicas, describe sus estudios de la microbiología del “pulque”, una bebida fermentada tradicionalmente mexicana que es obtenida de algunas plantas de Agave. El pulque es una bebida alcohólica (4-7° G.L) obtenida de la fermentación del aguamiel (savia del maguey), el cual es un líquido azucarado, incoloro, con cierto olor herbáceo, y sabor dulce agradable; siendo los principales magueyes productores de éste: *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana* (García-Garibay y

López- Munguía, 1993). Se ha encontrado que la diversidad bacteriana en el aguamiel está compuesta en gran parte por bacterias ácido lácticas tales como: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchi* y *L. citreum* (Escalante et al., 2008), siendo *L. mesenteroides* reportada previamente en el pulque (Sánchez-Marroquín, 1967; García-Garibay y López Munguía, 1993); mientras que *L. kimchi*, *L. citreum* y *Lactococcus lactis* que se encuentra en menor proporción, son bacterias que se han reportado por primera vez. Además en el aguamiel también se han encontrado bacterias como *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter sp.* y *Acinetobacter radioresistens*, las cuales son atribuidas a la contaminación del aguamiel por acumulación de éstos en las plantas del agave (Escalante, et al., 2008). Sin embargo es importante destacar a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, como un endófito en las plantas de agave. Carr et al., 2002 destaca en su estudio el uso de esta bacterias en la fermentación de azúcares como la glucosa, fructosa y la sacarosa, y destaca su capacidad para producir eficientemente CO<sub>2</sub>, D(-) ácido láctico, glucanos (como dextranos) y fructanos (como levanos) a partir de la sacarosa, compuestos presentes en el pulque además participar en la viscosidad que presenta el pulque y la cuál cree que está relacionada con la producción de exopolisacáridos (levanos y dextranos) por la bacteria. Uno de los parámetros utilizados para detener el proceso de la fermentación del “pulque” es la presencia de la viscosidad producida por el *L. mesenteroides*, así como la determinación en la cantidad de alcohol, producida por levaduras y la bacteria *Zymomonas mobilis* durante la fermentación (Escalante et al., 2004).

Tradicionalmente, el pulque era una bebida azteca restringida para propósitos medicinales y festivos. Sin embargo, para 1920 el pulque era la

bebida más popular en México, sobre todo entre los trabajadores obreros. Hoy en día, el tequila es más famoso como la "bebida nacional" de México, pero en el período crítico de la construcción de la nación mexicana (1920-1946), el pulque fue "la bebida nacional" de México por sus raíces de origen indígena y por capacidad de connotar la mexicanidad.

En la actualidad, el pulque es una de las tres bebidas tradicionales mexicanas junto con el tequila y el mezcal, todas elaboradas a partir de plantas de agave. El pulque es considerada la más antigua de las tres bebidas pues su producción data desde tiempos prehispánicos y a diferencia de las otras bebidas, no puede ser exportada en grandes cantidades debido a que continúa fermentándose en el envase, además de que es considerada la más antigua de las tres bebidas con una amplia cantidad de historias empíricas, y ampliamente repetidas que datan desde tiempos prehispánicos (Vaughn y Glenna, 2006).

### ***Leuconostoc mesenteroides*, levano y su metabolismo.**

*Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria que se caracteriza por producir exopolisacáridos como dextranos a partir de la sacarosa. En la década de los 40s, fue descubierta la enzima capaz de catalizar esta reacción, siendo aislada y nombrada como dextransacarasa (Dols, Chraibi, Remaud-Simeon, Lindley, & Monsan, 1997). En años más recientes, los reportes de los científicos señalan a *L. mesenteroides* como productor de compuestos del tipo levano favorecido por un sistema de enzimas especializadas denominadas levansacarasas [fructosiltransferasas (FSFs)], que catalizan la polimerización de fructosa a levanos (Kang et al., 2005; Morales-Arrieta et al., 2006; Olvera et al., 2007). Los levanos son polímeros conformados por unidades de fructosa

acopladas entre sí por uniones tipo  $\beta$ - (1, 2) y ramificaciones de tipo  $\beta$ - (2, 6) de alto peso molecular. Las cepas de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y *L. mesenteroides* ATCC 8293 forman levanos de peso molecular entre 2200 y 3000 KDa respectivamente (Muñoz-Gutiérrez et al., 2009) pero existe una variedad de microorganismos que sintetizan levanos entre las que destacan especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, los cuales han sido estudiados por formar la placa dental bacteriana de la boca, la cual consiste en este tipo de polimeros (Abo, H., et al 1991).

Aunque son pocos los estudios que se han dedicado a comprender la formación de los levanos por *Leuconostoc mesenteroides*, se conoce que la sacarosa es el único inductor de señalización conocido para el encendido de las enzimas glucosiltransferasas para la síntesis de dextranos y fructosiltransferasas para síntesis de levanos, las cuales se cree que están limitadas a la fase logarítmica del crecimiento de la bacteria (Dols et al., 1997). Otros estudios hacen referencia a la inducción de estas enzimas por la acumulación transitoria de fructosa que conduce a mayores tasas de crecimiento específico en presencia del aporte de oxígeno permitiendo la síntesis de ATP adicional.(Dols et al., 1997), mencionan que muchas especies de *Leuconostoc* prefieren fructosa que glucosa para el crecimiento, sin embargo, se reporta una conversión parcial de fructosa a manitol. El manitol es un producto de deterioro importante (junto con los dextranos) del metabolismo de sacarosa y fructosa de *L. mesenteroides* a partir de la caña de azúcar y la remolacha azucarera (Eggleston, Yen, Alexander, y Gober, 2012) En los ingenios azucareros la determinación de manitol es esencial como indicador de la presencia de *L. mesenteroides* como bacteria perjudicial de la

industria del azúcar debido a que sintetiza dextrano a partir de la sacarosa de la caña (Eggleston y Legendre, 2003).

La contaminación bacteriana durante las fermentaciones para la obtención de etanol combustible, tiene graves consecuencias económicas para los productores, debido a que las bacterias y sus metabolitos a menudo tienen un efecto perjudicial sobre el rendimiento fermentativo de la levadura. Los contaminantes son bacterias comúnmente ácido lácticas (LAB), que comprenden cepas tanto homo como heterofermentativas, dentro de estas últimas las más perjudiciales se incluye a *L. mesenteroides* (Basso, et al. 2014 ).

El género *Leuconostoc* se ha clasificado dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL) aunque esto ha generado controversia entre los científicos debido a las características peculiares de la bacteria y a los procesos heterofermentativos en los que participa. Es una bacteria productora de exopolisacáridos encontradas comúnmente en alimentos fermentados incluyendo vinos, licores azucarados (como el pulque) y quesos.

Uno de estos exopolisacáridos es conocido como levano. El levano es un polímero de fructosas unidas por enlaces B 2,6 sintetizado por una amplia gama de microorganismos y un número limitado de especies de plantas como carbohidrato de almacenamiento. La síntesis de levano contribuye a la formación del polisacárido extracelular (EPS) de la matriz y juega un papel importante en la formación de bio-películas microbianas. El levano pertenece a un grupo más grande de polímeros comercialmente importantes denominados

fructanos, que se utilizan como una fuente de fibra prebiótica, también se hace la mención de tener efectos antitumorales en humanos (Leibovici, et al., 1986)

Las diferencias de la producción entre los diferentes exopolisacáridos (EPS) que produce la bacteria se basa en la masa molecular, las uniones glicosídicas y el grado de ramificaciones, estos son parámetros que determinan las propiedades funcionales entre ellos. Está muy documentado que los (EPS) tienen numerosas aplicaciones, principalmente para la salud de humanos y animales en la industria farmacéutica, en los alimentos como agentes de textura o de interés nutricional como prebióticos, además actualmente han ido tomando mucho beneficios dentro de los procesos biotecnológicos (Waters, et al., 2013).

Se debe destacar que con esta investigación ha surgido un campo de estudio importante basado en la presencia de *L. mesenteroides* como contaminante en la industria productora de inulina y miel de agave.

Existen varias especies de agave cuya piña es fuente rica de Inulina un poli-fructano y debido a sus propiedades fisicoquímicas es altamente soluble en agua habilitando su extracción. En el Estado de Jalisco, se cultiva el *Agave azul* (*Agave tequilana* Weber var. azul) con fines de producción de tequila, sin embargo la demanda en muchos casos lleva a la sobreproducción de la planta, esto influyó a nuevas aplicaciones tecnológicas en alternativas de uso a la planta como la creación de un sector productor o derivados de agave como la producción de la inulina y el jarabe de agave (miel). La importancia actual de la inulina se debe a sus propiedades prebióticas, ya que es una fibra soluble no digerible, que influyen positivamente en la salud del consumidor (Niness, 1998;

Roberfroid, 2005). Sin embargo las industrias Jaliscienses productoras de inulina y miel de agave enfrentan problemas por el crecimiento de microorganismos que deterioran la inulina y miel.

Solamente se ha podido relacionar a *L. mesenteroides* con el agave debido a su presencia en la fermentación del aguamiel para la producción de pulque (Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008; Escalante et al., 2008) y recientemente la hemos aislado de jarabe de agave, por lo que nuestro interés consistió en investigar si esta bacteria es un endófito natural de esta planta y el papel que juega tanto para la planta como para la industria de la inulina y el jarabe de agave.

## MATERIAL Y METODOS

### **Plantas de Agave.**

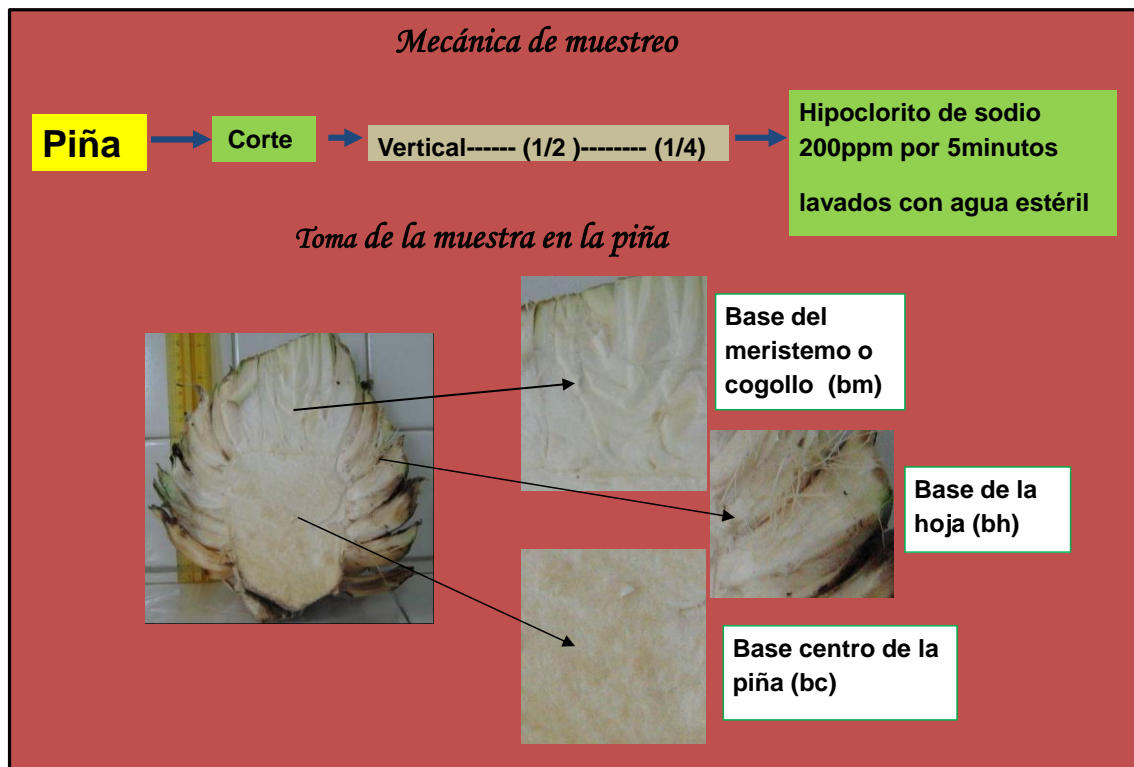
Se recolectaron al azar 20 plantas de agave de dos a tres años de edad: 10 cultivadas de forma convencional y 10 plantas por micropropagación clonar en tres puntos clave esquematizando una figura triangular en una plantación del 2010, con ubicación en la zona centro de Amatitán, Jalisco propiedad de la empresa Brown Forman-Casa Herradura. Las plantas fueron jimadas, y trasportadas al laboratorio para su proceso.

### **Selección del medio de cultivo.**

En un experimento previo se utilizó el medio de agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) adicionado con sacarosa al 20, 30, 40 y 50% (p/v) y azul de bromofenol (50 ppm) para la selectividad y desarrollo del genero *Leuconostoc*. Como cepa testigo se utilizó *Leuconostoc mesenteroides* (ATTC 10830a) adquirida de la Colección Nacional Mexicana de Cepas Microbianas del CINVESTAV, México, DF., y una cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Las condiciones de cultivo fueron en anaerobiosis a 30°C por 48 horas, revisando el crecimiento cada 24 horas.

### **Aislamiento y caracterización de cepas.**

Cada piña colectada fue lavada con agua corriente. En condiciones asépticas, la piña fue dividida en forma vertical como se indica en la figura 18 seleccionando representativamente un cuarto de piña (5kg). Cada muestra se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio 2% por 5 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril



**Figura 18.** Muestreo para la microbiología del tejido de la piña de agave.

En campana de flujo laminar, se cortaron y se pesaron 5g del tejido desinfectado de la base del cogollo, hoja y centro de la piña, respectivamente. El tejido fue triturado en mortero estéril con 5ml de solución fisiológica (NaCl 0.85%) estéril. Para realizar el conteo en placa se hicieron diluciones seriales utilizando solución fisiológica estéril. Se tomó 1ml de cada dilución y se colocó en una placa de Petri con agar MRS adicionado con 25% de sacarosa por triplicado. Las placas se incubaron a 30°C en anaerobiosis durante 48 horas y se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC/g).

La caracterización de las cepas consistió en la observación de la morfología de la colonia, la morfología microscópica mediante la tinción al Gram, prueba de catalasa y el cambio de color del medio de cultivo por la producción de ácido. El muestreo del tejido en la planta fue realizado en tres

sitios diferentes de la piña identificados como base de la hoja (bh), base del meristemo o cogollo (bm) y base centro de la piña (bc).

### **Identificación de las cepas por galería bioquímica del sistema API.**

Las cepas presuntivas resultantes fueron analizadas para su identificación por el sistema API para *Lactobacilos* 50CHL v 5.1. El análisis se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología y sanidad de la Universidad de Guadalajara.



**Figura 19.** Imagen de llenado de los posos de la galería de la cepa identificada como Pich1 (21-07-2010).

## **Análisis de restricción del ADN del gen 16s ribosomal (ARDRA) e identificación por secuenciación de las cepas caracterizadas**

Treinta cepas fueron seleccionadas en base a la caracterización morfológica de las presuntas colonias de *Leuconostoc* cultivadas en en agar MRS adicionado con sacarosa y a los resultados del análisis de la identificación del sistema API 50CHL. Los métodos moleculares establecidos fueron realizados bajo las mismas condiciones del procedimiento del capítulo anterior de bacterias endófitas cultivables (capitulo 1, página 37). La región 16S rDNA de cada bacteria fue amplificada por PCR punto final para generar un fragmento de 1,500 pares de bases utilizando un primer específico [fD1 secuencia (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3')] y un primer inverso específico [rD1 secuencia (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3')] (Weisburg, Barns, Pelletier, y Lane, 1991). La preparación de los amplificados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final fue realizada mediante un kit [Pyrostart Master Mix # K0211 - Fermentas] y la amplificación se llevó bajo las siguientes condiciones: 95°C-2min, 35 ciclos de 94°C-1min; 55°C-1min; 72°C-2, y 72°C 4min, con un termociclador modelo NyxTechnik, Inc.

Se realizó el análisis de restricción del ADN ribosomal 16s amplificado (ARDRA) utilizando dos enzimas de restricción: (1) *Hae III* [Fast (BsuRI) #FD0154- Fermentas] y (2) *Sau 3AI* [Fast (Bsp1431) #FD0784-Fermentas ]. Los productos de la restricción fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % durante 3 horas a 3,2 V/cm, y las bandas se visualizaron con el reactivo Gelred (nucleic acid gel stain, Hayward, CA).

Los productos amplificados por PCR fueron purificados usando el kit de purificación de la Marca Roche (#11732 676 001) y enviados para la secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de las secuencias se hizo a través del programa Bioedit. Las secuencias de ADN resultantes se sometieron a la base de datos de nucleótidos no redundantes en GenBank utilizando el programa BLAST para determinar su identidad.

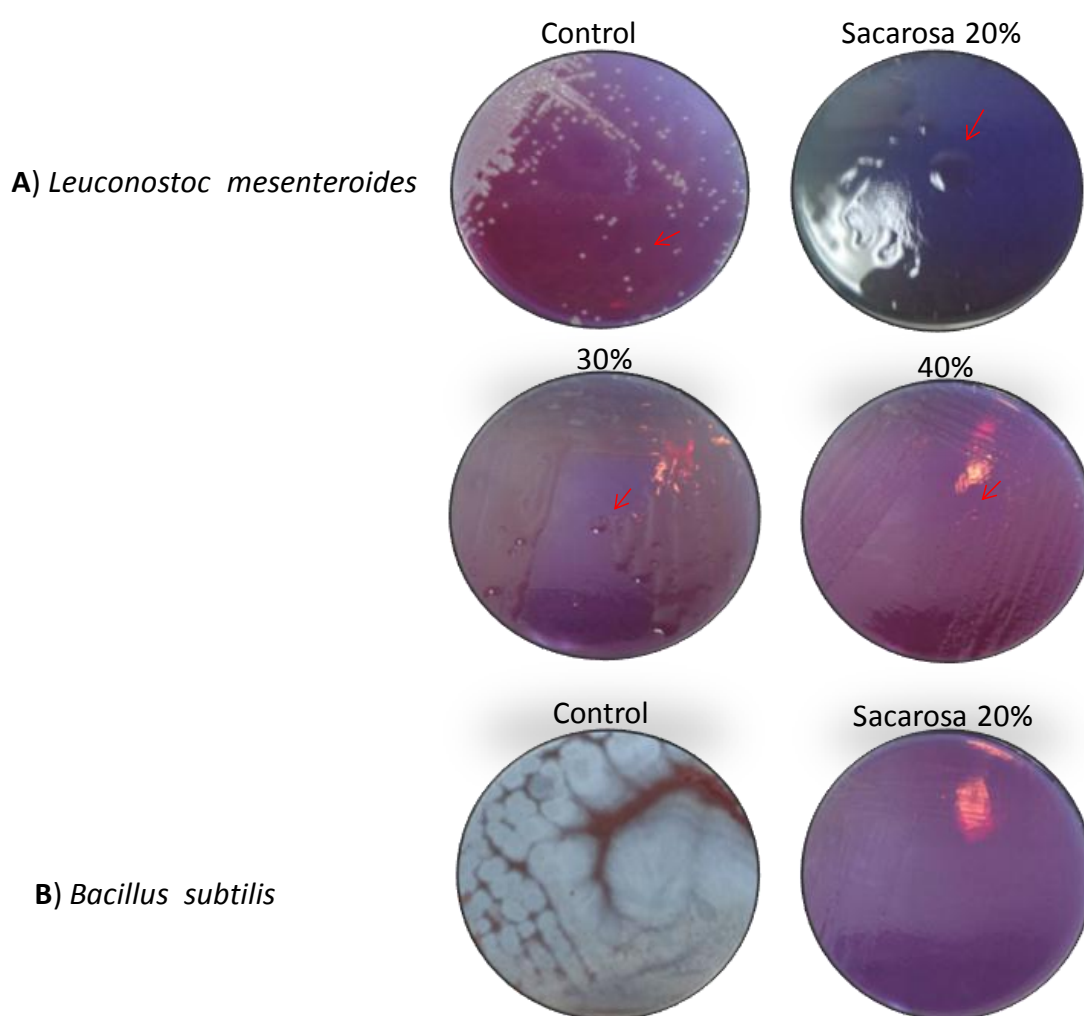
### **Aislamiento y caracterización en jugo e inulina de agave.**

Fueron proporcionadas muestras de jugo de agave e inulina líquida de un proceso de obtención de miel e inulina de agave de la Empresa Inulina y Miel de agave (IMAG S. A.), para el aislamiento y caracterización de la bacteria *L. mesenteroides* y determinar la presencia de la bacteria en el proceso de producción de esta industria.

## RESULTADOS

### Aislamiento y caracterización a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en tejidos de agave.

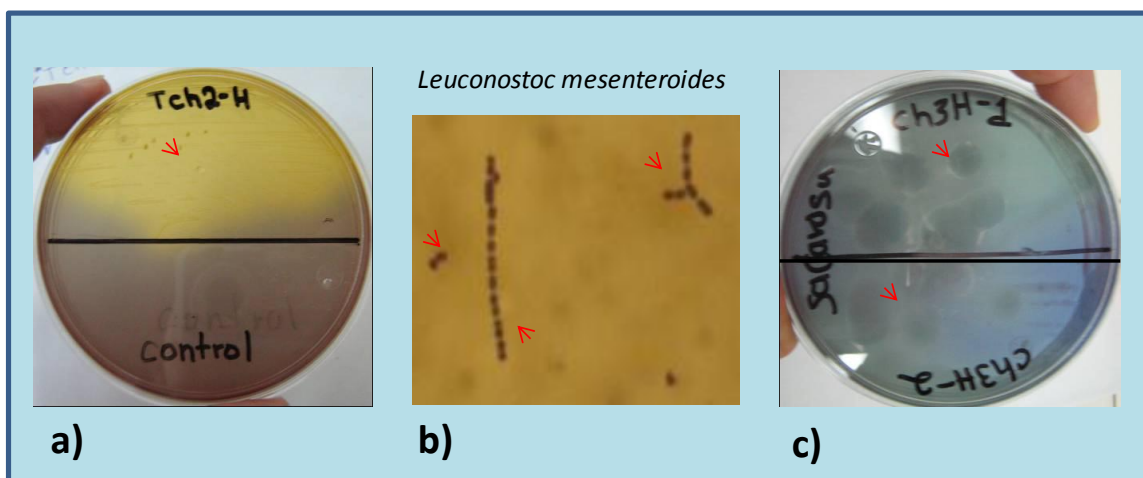
La adición de sacarosa al agar MRS dio como resultado un medio de cultivo con propiedades selectivas para aislar *Leuconostoc mesenteroides*. La bacteria fue capaz de crecer eficientemente en medio con concentración de hasta 40% de sacarosa figura 20.



**Figura 20.** Desarrollo de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 10830a) en medio de cultivo agar MRS (De Man Robosa y Sharpe), azul de bromofenol (50ppm), adicionado con sacarosa: **A)** *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC ) y **B)** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

En la figura 20 se muestra el crecimiento en placa la cepa de *L. mesenteroides* (ATCC 10830a) en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa en el medio. La observación de colonias grandes semi-transparentes mucoides y viscosas en el medio adicionado con sacarosa 20, 30 y 40% características de *Leuconostoc sp* a diferencia de la placa control, que mostró el desarrollo de colonias pequeñas, blanquecinas. La consistencia de las colonias mucoides se establece que es indicativo de la formación de exopolisacáridos (EPS) por la bacteria. La inhibición del desarrollo de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) fue observada completamente en 20% de sacarosa (fig 20).

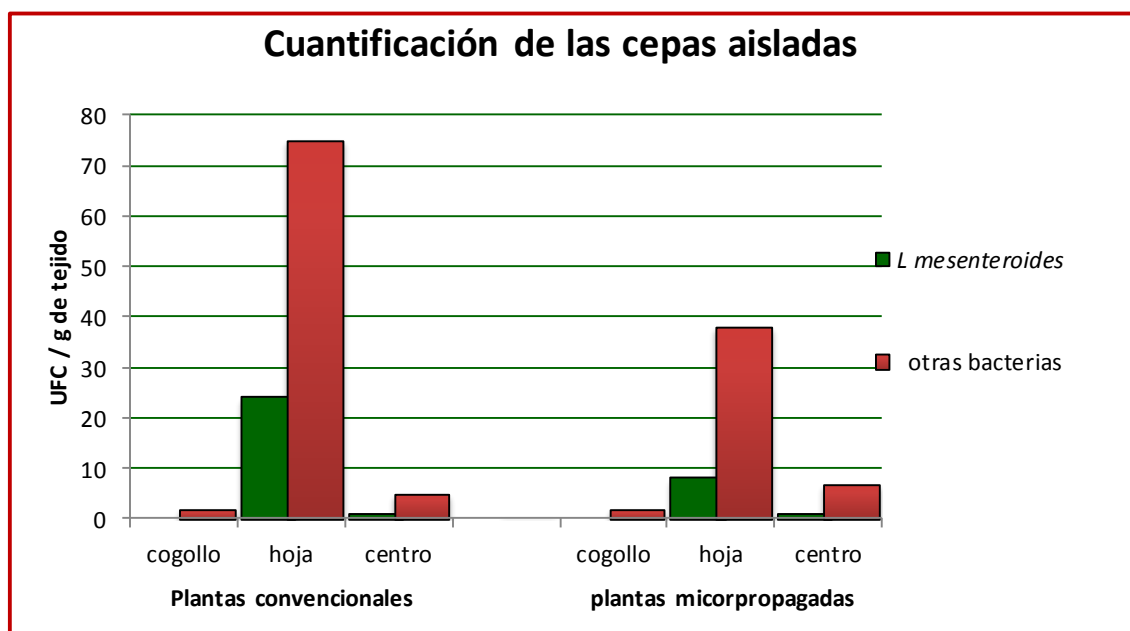
En el aislamiento de la bacteria *Leuconostoc sp* del tejido de las plantas de agave, la adición de sacarosa en el medio de cultivo mostró el desarrollo de varias colonias mucoides y viscosas que se aislaron y caracterizaron. El cambio de color del medio de cultivo a color amarillo indicó la producción de ácido por parte de la bacteria, y la tinción al Gram mostró bacilos cortos positivos alineados en cadena. Las características anteriores corresponden a *L. mesenteroides* (fig 21).



**Figura 21.** Desarrollo de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en medio de cultivo agar MRS. a) Observación del cambio de color del medio de cultivo, b) morfología a la tinción de Gram: bacilos cortos en cadena y forma de y, c) Colonias tipo mucoides-viscosas en el medio adicionado con 25% de sacarosa.

## Determinación de la carga bacteriana por gramo de tejido mediante el conteo del número de unidades formadoras de colonia (UFC/g) en placa.

En el gráfico 2 se muestran los resultados del conteo en placa del número de unidades formadoras de colonias por gramo de tejido (UFC/g), en el medio de agar MRS con 25% de sacarosa, de las cepas de *L. mesenteroides* aisladas de la base del cogollo, la base de la hoja y el centro de las piñas. El mayor número de UFC/g se obtuvo de la base de la hoja, tanto de las plantas cultivadas de forma convencional como por micropropagación.

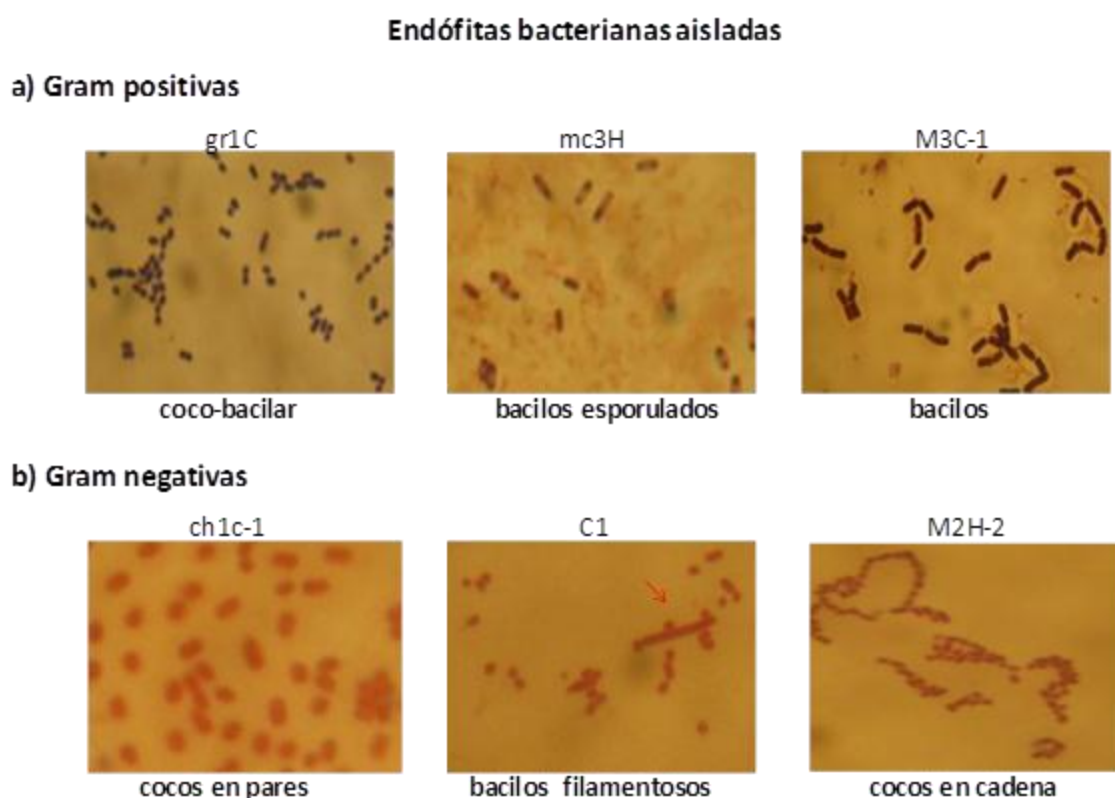


**Gráfico 2.** Conteo en placa de unidades formadoras de colonia de bacterias por gramo de tejido (UFC/g) de la base del cogollo, hoja y centro de la piña, aisladas de plantas cultivadas de forma convencional y micorpropagadas (n = 10, por triplicado).

El análisis muestra la presencia de colonias a *Leuconostoc mesenteroides* de 1 a 24 UFC/g de tejido de la hoja, relevantemente el resultado no muestra la presencia de la bacteria en el tejido a cogollo y para el conteo de centro de la piña se presenta escasamente una UFC/g (gráfico 2).

Las 31 cepas bacterianas endófitas fueron clasificadas a la bacteria *L. mesenteroides* y caracterizadas fenotípicamente por morfología de la colonia: grande semi-transparente (viciosa-mucoide), microscopia a tinción al Gram y actividad de catalasa (fig 21).

El desarrollo de otras bacterias en el tejido de la hoja es evidente de 38 a 74 UFC/g para ambas plantaciones respectivamente. Las cepas bacterianas fueron aisladas y caracterizadas a la tinción de Gram en donde se observó que el 73.2% corresponden a bacterias Gram positivas y el 26.8% a Gram negativas. La morfología de bacilos es predominante para las bacterias Gram positivas mientras que para las Gram negativas la morfología de cocos es la dominante (Tabla 2).



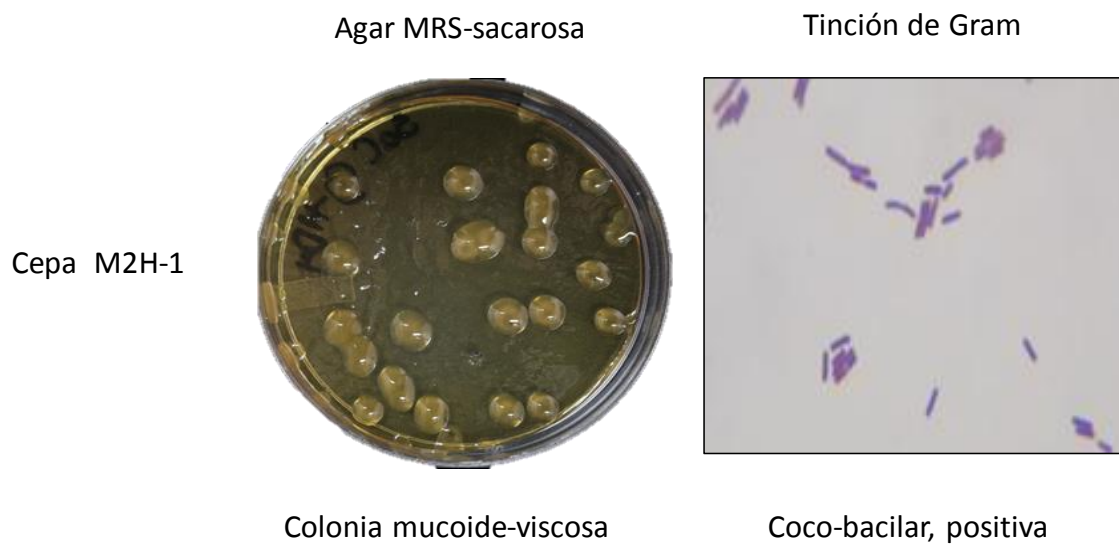
**Figura 22.** Morfología microscópica a la tinción de Gram de cepas bacterianas endófitas aisladas de la base de la hoja de agave.

Los resultados correspondientes a las cepas bacteriana endófitas, diferentes a cepas caracterizadas para el *Leuconostoc sp*, fueron descritas en el trabajo para la obtención del grado de Licenciatura de Q.F.B. Yanett I. Gallegos Díaz (2012), por lo que en este reporte se prescindió el análisis de estas bacterias. Sin embargo cabe destacar que estas bacterias tienen la capacidad de desarrollarse en un medio con alto contenido de sacarosa (25%) y se recluta a pocas bacterias, esencialmente aquellas que tienen la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS) localizados fuera de la pared celular que como resultado se desarrollan colonias viscosas-mucoiodes (fig 21) como en el caso específico de miembros del genero *Leuconostoc*.

<b>Morfología bacteriana</b>	<b>Gram Positivas 73.2%</b>	<b>Gram Negativas 26.8%</b>
<b>Bacilos</b>	36.6%	15.8%
<b>Coco-bacilar</b>	36,6%	28.9%
<b>Cocos</b>	26.8%	55.3%

**Tabla 6.** Porcentaje de la diversidad morfológica de las cepas bacterianas endófitas.

Se seleccionaron un total de 20 cepas de todos los aislados que presentaron colonias de tipo mucoide-viscosa (fig 21). Las cepas nombradas como: ch3H-1, ch3H-2, M2H-1, M3H-1, gr1H, gr1H-3, gr2H-1, gh1-2, g2h-2, mA1bh, mA1bh-1b, mA1bh-1c y mC3bh fueron aisladas de la base de la hoja y las cepas: Tch2-T, g1T-1, Tg1-1c, M2c-1, gr1c-1 fueron aisladas del centro de la piña. Todas las cepas mostraron morfología de pequeños bacilos ovalados (coco-bacilar) Gram positivos y catalasa negativos (fig. 23).



**Figura 23.** Caracterización morfológica de las colonias en agar MRS-sacarosa y tinción al Gram de la cepa M2H-1.

## Identificación de las cepas bacterianas caracterizadas mediante pruebas bioquímicas con el sistema API 50CHL.

Los resultados del análisis por batería bioquímica para 20 cepas seleccionadas presentaron identidad positiva a *Leuconostoc mesenteroides*, con un porcentaje de confiabilidad de hasta 100% para la mayoría de los aislados (tabla 7). Esto sugiere que la caracterización previa de la bacteria por el medio de cultivo utilizado en el tejido de agave es altamente selectivo para el microorganismo, siendo una herramienta valiosa para su identificación.

	Cepa	Microorganismo	Identificación	Confiabilidad (%)
1	Control*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
2	Ch3H-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
3	Ch3H-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
4	M2H-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
5	M2c-1**	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
6	M3H-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
7	gr1H-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
8	gr1H-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
9	gr1c-1**	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
10	gr2H-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
11	g1T-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	100
12	gh1-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	100
13	g2h-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	100
14	Tch2-T	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	100
15	Tch2-H**	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	99
16	Tg1-1c**	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Muy buena	100
17	mA1bh	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	buena	98
18	mA1bh-1b	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
19	mA1bh-1c	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	excelente	100
20	Mc3bh	<i>Lactobacillus brevis</i>	baja	82.5

**Tabla 7** Análisis de baterías bioquímicas de las cepas seleccionadas. Planta: Ch= chica, M= mediana, gr = grande, H,= base de hoja, C= base centro, T= meristemo

\**Leuconostoc mesenteroides* ATTC 10830a

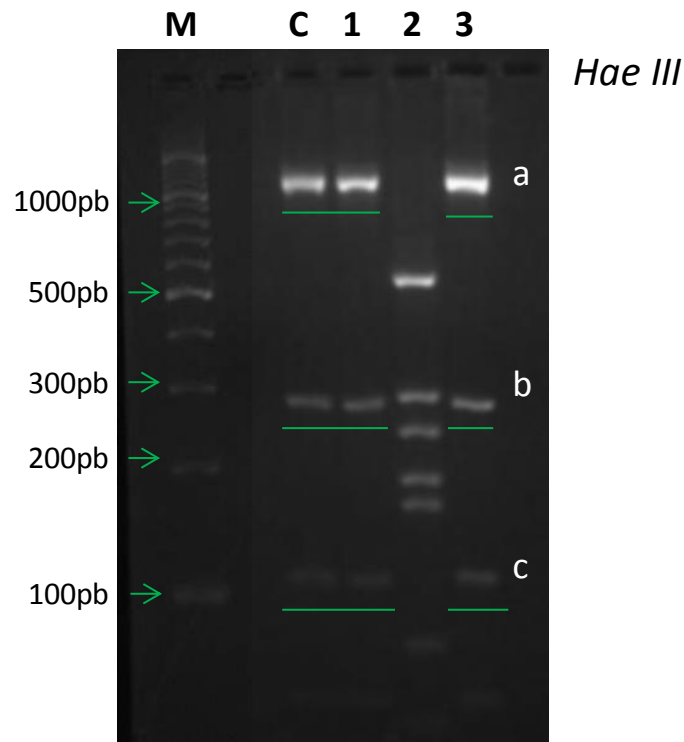
Las cepas M2c-1, gr1c-1, Tch2-H y Tg1-1c, mostraron una identidad excelente a *L. mesenteroides* (tabla 7), sin embargo, la identificación por secuenciación del ADNr 16s ribosomal reporta a bacterias del genero *Weissella paramesenteoides*, esto muestra desventajas y limitaciones por el sistema API para la identificación de bacterias cuando existe una cercanía o parentesco entre ellas. Interesantemente esto sugiere considerar otros criterios de selectividad entre géneros de *Leuconostoc* y *Weissellas*.

La identidad de la cepa Mc3bh corresponde a *Lactobacillus brevis*, una bacteria del grupo de ácido lácticas. Concluyentemente el uso de baterías bioquímicas puede ser una herramienta rápida para la identificación de microorganismos aunque hoy en día la identificación de bacterias por estos medios resulta no tan versátil debido a su alto costo, por lo que estos métodos están siendo reemplazados por las ventajas que ofrecen las técnicas moleculares.

### **Caracterización por el Análisis de Restricción del ADN del 16s Ribosomal (ARDRA) de las cepas aisladas y su identificación por secuenciación.**

La figura 24 muestra los patrones de restricción característicos de *Leuconostoc mesenteroides* (ATTC10830a) por análisis de ARDRA generados por la enzima de restricción *Hae III*. El análisis de restricción muestra tres bandas representativas cercanas a 1100, 290 y 110 pares de base (pb), que se muestran en la figura 24 (a, b y c respectivamente). Todas las cepas aisladas y seleccionadas a *Leuconostoc sp* en el medio de MRS con sacarosa tuvieron el mismo patrón de restricción (figura no mostrada) con las dos enzimas.

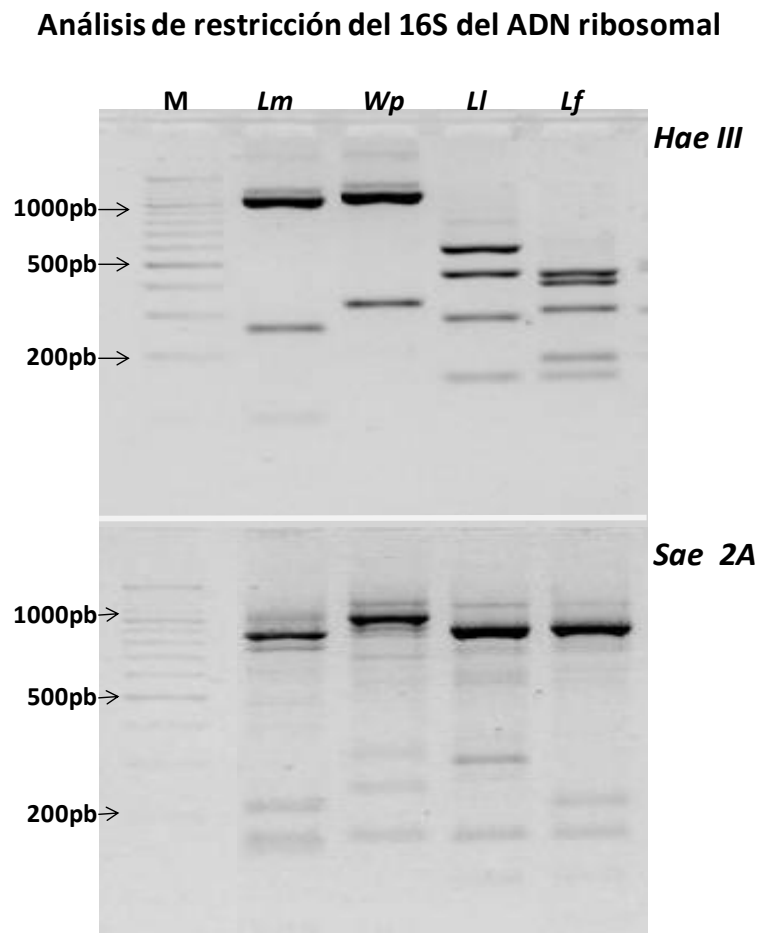
## Análisis de restricción del 16S del ADN ribosomal



**Figura 24.** Caracterización molecular de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* mediante el análisis tipo ARDRA y la enzima de restricción *Hae III*. **M:** marcador de peso molecular, **C:** cepa control *L. mesenteroides* (ATTC10830a), **1:** cepa M3H-1, **2:** *Gluconobacter oxydans* y **3:** cepa gr1H1-1. Gel de agarosa 2.5%, 75volt.

En la figura 24 se presenta las cepas M3H-1 y gr1H-1 que exhiben un mismo patrón de restricción que la cepa control. Mientras que la bacteria *Gluconobacter oxydans* presenta diferencias propias a un patrón de bandeo constituida por 6 fragmentos de restricción (fig 24). Este método molecular tipo ARDRA puede ser una herramienta de uso importante en la caracterización de bacterias endófitas de plantas previas a la identificación por secuenciación molecular.

A continuación se presenta un análisis de restricción de 4 diferentes endófitas bacterianas aisladas en agar MRS-sacarosa del tejido de la planta de agave, (M2H-1, gr1c-1, Mc3bh e inlor) que posteriormente fueron identificadas por secuenciación del gen amplificado del ADN 16S ribosomal de 1500pb. La observación de los patrones de restricción de cada endófitas: M2H-1 (*Lm:Leuconoctoc mesenteroides*), gr1c-1 (*Wp: Weissella paramesenteroides*), Mc3bh (*Ll: Lactococcus lactis*) e y inlor (*Lf: Enterococcus faecium*) fue visualizada con dos enzimas: *Hae III* y la *Sae 2A* respectivamente (fig 25).



**Figura 25.** Observación del bandeo de restricción de endófitas bacterianas en gel de agarosa 2.5% con la enzima *Hae III* y *Sae 2A*. **M:** marcador de peso molecular, **Lm:** *L mesenteroides*, **Wp:** *Weissella paramesenteroides*, **Ll:** *Lactococcus lactis* y **Lf:** *Enterococcus faecium*)

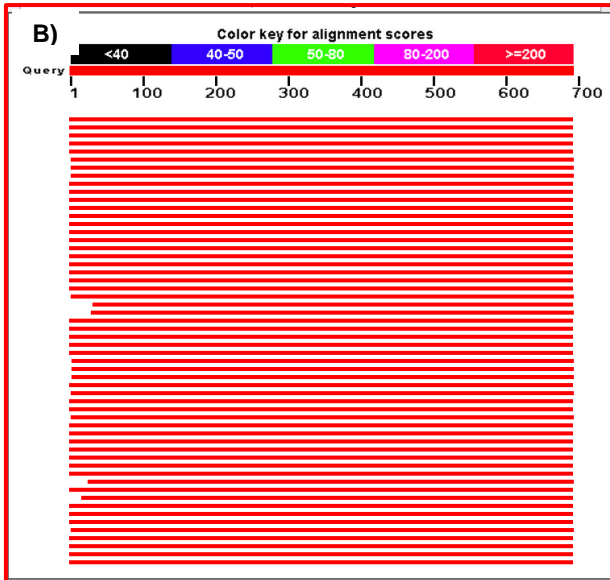
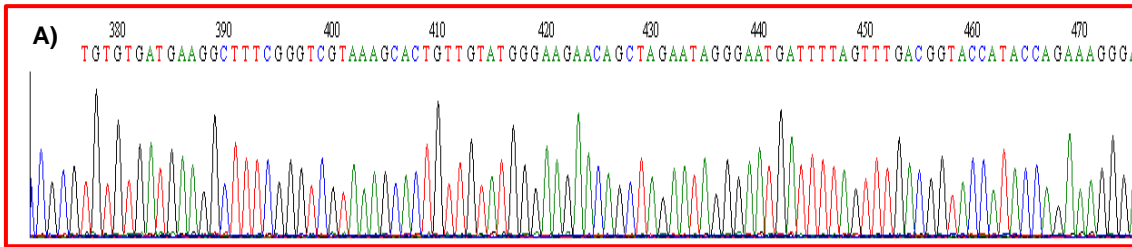
### **Identificación por el análisis de secuenciación del gen 16s ribosomal.**

El análisis de las secuencias amplificadas (1500pb) del ADNr 16S se realizó a través del programa Bioedit (Biological sequence alignment editor) y posteriormente se comparó con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y con el Ribosomal Database Project at the Michigan State University (RPD) que arrojan las homologías más cercanas a las especies bacterianas (figura 26).

Los resultados de las Bioquímicas por API 50CHL, muestran la identificación solo a *L. mesenteroides* para todas las cepas seleccionadas. Actualmente los ensayos bioquímicos en la determinación de especies bacterianas están siendo desplazados por los métodos moleculares.

Para nuestro estudio la determinación bioquímica de las cepas bacterianas confirma la caracterización de cepas al género *Leuconostoc sp* en agar MRS con sacarosa, esto nos hace pensar que el medio se vuelve selectivo para el desarrollo de estos microorganismos. Sin embargo, una desventaja encontrada en el ensayo bioquímico resulta de la identificación para las cepas M2c-2, gr1c-1, Tch2-T y Tch2-H correspondientes a *L. mesenteroides* mientras que el análisis de restricción (ARDRA) y la secuenciación (fig 25 y tabla 8) fueron análogas a *Weissella paramesenteroides* una diferencia muy significativa.

El análisis de secuenciación de la cepa M2H-1, en la base de datos por NCBI, presenta la analogía a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *mesenteroides* (Fig 26, A, B, C y D) en un 100% de identidad. En cambio en las pruebas bioquímicas por API, esta cepa fue identificada como *L. mesenteroides*, pensamos lo importante de la limitación de estas pruebas.



**C) Cepa M2H1**

```
TCTGTCCTGCCTTAGACGGTCTCCTTCTAA
AGTTTAGCCACCGGCTTTGGGCATTACAA
ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
AGACCCGGAACGTATTCACCGCGCGGT
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
CATGTAGTTCGAGTTGCAGACTACAATCCGA
ACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACC
CTCGCGGTTGGCAACTCGTTGTATACGCC
ATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCGC
TTTCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCGC
TAGAGTGCCCATCTGAATGCTGGCAACTAA
CAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
GACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCTCCG
AAGAGAACAATTCTATCTCTAAAAGCTTCAA
AGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGC
GTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
```

**D)**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain ATCC 8293 16S ribosomal RNA gene, complete sequence</a>	1147	1147	100%	0.0	100%	NR_074957.1
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NBRC 100495 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1147	1147	100%	0.0	100%	NR_113911.1
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain JCM 9700 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1147	1147	100%	0.0	100%	NR_113254.1
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain JCM 6124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1147	1147	100%	0.0	100%	NR_113251.1
<a href="#">Leuconostoc pseudomesenteroides strain LMG 11482 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1147	1147	100%	0.0	100%	NR_109004.1
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum strain NCFB 529 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1144	1144	99%	0.0	100%	NR_040817.1
<a href="#">Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris strain NCFB 543 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1140	1140	99%	0.0	99%	NR_040818.1
<a href="#">Leuconostoc pseudomesenteroides strain NRIC 1777 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1131	1131	99%	0.0	99%	NR_040814.1

**E)**

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.6, Sep 2013  
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 9  
 Query File: classifier\_seq\_upload1186601360772282782.FASTA  
 Query Submit Date: Tue Jun 03 21:50:14 EDT 2014

Display depth: Auto Confidence threshold: 80% Refresh

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

```
rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] download entire hierarchy as text file
» » domain Bacteria (1)
» » » phylum Firmicutes (1)
» » » » class Bacilli (1)
» » » » » order Lactobacillales (1)
» » » » » » family Leuconostocaceae (1)
» » » » » » » genus Leuconostoc (1)
```

**Figura 26.** Alineamiento de secuencia del ARNr 16s para la identificación de género y especie: **A y C)** secuencia de ARNr 16S de la cepa M2H1, dada por el programa Bioedit. **B y D)** Análisis de blast del alineamiento de secuencias en la base de datos del NCBI. **E)** Resultado de la taxonomía en la base de datos Ribosomal Database Project (RDP).

En la tabla 8 se muestran los resultados del análisis de las secuencias de las cepas endófitas seleccionadas de agave (*A. tequilana* Weber variedad azul).

Las cepas ch3H-1, ch3H-2, M2H-2, M3H-1, gr1H-1, y gr1H-3 mostraron identidad a la bacteria ***Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*** de 99 a 100% todas presentes en la hoja. Sola una cepa gr2H-1 correspondió su identidad al 100% a ***Leuconostoc pseudomesenteroides***. Mientras que, las cepas g1T-1, gh1-2, g2h-2, Tch2-T y mA1bh tienen una identidad de 100% a ***Leuconostoc mesenteroides***. Destacadamente las cepas M2c-2, gr1c-1, Tch2-T y Tch2-H corresponden a ***Weissella paramesenteroides*** en 99-100% de identidad. El ensayo de catalasa para todas las bacterias mostraron ser negativas, característico en los géneros *Leuconotoc sp* y *Weissella sp* (tabla 8). Otras bacterias, catalasa positiva fueron identificadas como *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faeciu* aisladas de agave y *Kozakia baliensis*, *Kozakia baliensis* aisladas de vara de caña.

Además ***L. mesenteroides subsp. mesenteroides***, ***L. para mesentroides*** y ***L. mesenteroides*** en inulina líquida, una planta (piña) y jugo de agave extraído por difusor respectivamente, proporcionadas por la empresa IMAG fueron identificadas por el análisis de secuenciación con un 99-100% de confiabilidad reportadas en la tabla 8.



**Tabla 8.** Resultados de del análisis de las secuencias parciales (Fw) en la base de datos no redundante del GenBank (NCBI utilizando el programa BLAST).

	ID. AISLADO	ORIGEN	Longitud secuencia (BASES)	IDENTIDAD Y HOMOLOGIA (NCBI)	No. accesión (closest match)	% Identidad	catalogasa
1	control	ATTC	587	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	100	-
2	Ch3H-1	hoja	621	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	100	-
3	Ch3H-2	hoja	731	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	100	-
4	M2H-1	hoja	700	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	100	-
5	M2c-1	centro	701	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<a href="#">NR_040815.1</a>	99	-
6	M3H-1	hoja	704	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	98	-
7	gr1H-1	hoja	713	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	99	-
8	gr1H-3	hoja	711	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	99	-
9	gr1c-1	centro	637	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<a href="#">NR_040815.1</a>	99	-
10	gr2H-1	hoja	689	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<a href="#">NR_040814.1</a>	99	-
11	g1T-1	centro	753	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	100	-
12	gh1-2	hoja	547	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	99	-
13	g2h-2	hoja	681	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	99	-
14	Tch2-T	centro	739	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR_074957.1</a>	99	-
15	Tch2-H	hoja	645	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<a href="#">NR_040815.1</a>	100	-
16	Tg1-1c	centro	551	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<a href="#">NR_040815.1</a>	100	-
17	mA1bh	hoja	683	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR_036904.1</a>	99	-
18	mA1bh-1b	hoja	645	<i>Lactococcus lactis</i>	<a href="#">NR_103918.1</a>	99	+
19	mA1bh-1c	hoja	680	<i>Lactococcus lactis</i>	<a href="#">NR_103918.1</a>	99	+
20	Mc3bh	hoja	748	<i>Enterococcus faecium</i>	<a href="#">NR_102790.1</a>	100	+

Otras fuentes							
21	Pich 1an	Piña IMAG	730	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<a href="#">NR 040814.1</a>	99	-
22	inu	Inulina líq	700	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. mesenteroides	<a href="#">HM 218680.1</a>	100	-
23	juf	Jugo difusor	635	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR 113911.1</a>	100	-
24	P17	Piña IMAG	721	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<a href="#">NR 036904.1</a>	100	-
25	C1	caña	741	<i>Kozakia baliensis</i>	<a href="#">NR 024773.1</a>	97	+
26	C2	caña	598	<i>Asaia lannensis</i>	<a href="#">NR 024810.1</a>	98	+

## DISCUSIONES

*Leuconostoc sp* es una bacteria que pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas heterofermentativas y naturalmente es encontrada en la leche, uvas y muchos otros vegetales. Miembros de este grupo son utilizados en la fermentación principalmente de lácteos (Benkerroum, Misbah, Sandine, & Elaraki, 1993). Sin embargo, desde los años 60's (Mayeux y Colmer, 1961), atribuyen al *Leuconostoc* como la principal bacteria del deterioro del jugo de la caña, por producir un compuesto insoluble (slime), ellos reportan la presencia de muchos organismos en el cultivo de las plantas, pero no pueden mostrar la presencia del *Leuconostoc*. En la búsqueda bibliográfica actual, no hay existencia de referencias en donde describan al *Leuconostoc* como un endófito de plantas. Este estudio toma la importancia para nuestro grupo de investigación, por encontrar a la bacteria como detonante del proceso de producción de la inulina y el jarabe de agave.

Ahora se sabe y está muy documentado que cepas de *Leuconostoc* sintetizan compuestos tipo dextranos y levanos (el slime reportado por Mayeux y Colmer 1961) a partir de la sacarosa, exopolímeros de glucosa (glucanos) y fructosa (fructanos) respectivamente. Estos biopolímeros están tomando importancia a escala industrial por las numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, de la alimentación y de la biotecnología (Bounaix et al., 2010; Leathers & Bischoff, 2011; Siddiqui, Aman, & Qader, 2013).

El principal objetivo de esta investigación fue aislar e identificar a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* en la planta de *Agave tequilana*, para esto evaluamos diferentes concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo, con

el principio de que la bacteria es productora de exopolisacáridos a partir de la sacarosa. Se encontró que el medio de cultivo MRS con hasta 40% de sacarosa es altamente selectivo para el *Leuconostoc mesenteroides* desarrollando colonias grandes semi-transparentes mucoides-viscosas. Sin embargo, el porcentaje alto de sacarosa no permitió el desarrollo de la cepa control a *Bacillus subtilis*, en 20% de sacarosa. Esta viscosidad en las colonias se debe a la formación de exopolisacáridos que pueden ser glucanos (dextranos) y fructanos (levanos) sintetizados por la bacteria. (Muñoz-Gutiérrez et al., 2009), describe que los fructanos son producidos por los microorganismos principalmente del grupo de las bacterias ácido lácticas (*Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Weissella*), así como otras especies tales como *Zymomonas mobilis*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus subtilis* y *B. polymyxa*. Lo que difiere de nuestra investigación con la cepa control de *B. subtilis*.

Ha sido ampliamente estudiadas en los géneros mencionados, las glucosiltransferasas (GTFs) enzimas extracelulares de alto peso molecular que llevan a cabo la reacción de transglucosilación, es decir, rompen el enlace glucosídico de la sacarosa, liberan fructosa al medio de reacción y transfieren la glucosa a un aceptor para formar los dextranos (Robyt et al., 2008).

El reporte de la investigación por Gallegos-Díaz, (2012), identifica bacterias del género *Bacillus* (*B. vallismortis*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis* y *B. megaterium*) como bacterias sacarofílicas por su capacidad de desarrollo en el medio de cultivo MRS con 25% de sacarosa, aunque

difieren de la formación en la típica colonia desarrollada por cepas de *Leuconostoc sp.* lo que se vuelve sumamente interesante.

El pulque se caracteriza por ser una bebida viscosa. Chellapandian *et al.*, (1998) aislaron a partir de pulque dos cepas capaces de generar polímeros con capacidad espesante en presencia de sacarosa. Las cepas fueron aisladas e identificadas como *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ y *Lactobacillus plantarum*. Más tarde se determinó que *L. mesenteroides* IBT-PQ posee la enzima (dextransacarasa) asociada a células que sintetiza el polímero soluble lineal de glucosa. Por otro lado, *L. plantarum* fue identificado como productor de levanos. Hasta este momento la viscosidad del pulque fue únicamente atribuido a la actividad de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* (Escalante *et al.*, 2008). En lo que concierne al pulque, no se han realizado estudios para caracterizar a profundidad de las fructanos presentes en los aguamieles. Se había pensado que la presencia de polímeros de fructosa como inulina y levano se debían a que son formas de reserva de carbono y energía para la planta que eran trasferidos al aguamiel durante el raspado de la piña; sin embargo, existen evidencias aportadas por el grupo del Dr. Agustín López Munguía de que diversas cepas de *L. mesenteroides* también produce fructanos (Olvera *et al.*, 2008).

La cuantificación de cepas a *Leuconostoc mesenteroides* muestro de 1-24 y 1-8 UFC/g de tejido principalmente en hojas de plantas por siembra convencional como de micropropagación respectivamente. Siendo la hoja el sitio de mayor número de microorganismos. En la planta de agave se conoce su alto contenido de carbohidratos solubles (80%) fructanos como la inulina y

oligofructanos del peso total, sin embargo el 60% se encuentra representado por azúcares simples como la glucosa, la fructosa y sacarosa (Suárez-González, et al., 2014). Suponemos que la hoja es fuente de azúcares simples como la glucosa, fructosa y la sacarosa que son la principal fuente de energía para el desarrollo de microorganismos o el principal nicho de bacterias en la planta para establecer un vínculo con células vegetales y formar asociaciones simbióticas o patogénicas ((Bacon et al., 2012; Jin et al., 2014; Suárez-González et al., 2014). A la vez la formación de biopelículas, la cantidad de miembros del género *leuconostoc* encontrada en plantaciones sanas es indicativo de la asociación simbiótica del *Leuconoctos* como endófito para la planta además de una capacidad eficiente para desarrollarse en altas concentraciones de azúcares.

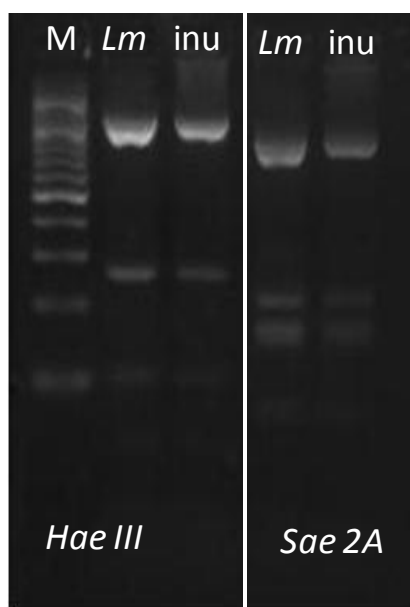
#### **Análisis de Restricción del ADNr del 16S Ribosomal (ARDRA) de las cepas aisladas y su análisis por secuenciación molecular.**

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que lo codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y como consecuencia, en la clasificación e identificación rápida y precisa de las bacterias (Rodicio y mendoza, 2004). El gen ARNr 16S también es designado como ADNr 16S, los dos términos son usados indistintamente, sin embargo la política de ASM (American Society for Microbiology) es usar el término gen ARNr 16S.

El método del análisis de restricción del ADNr 16S ribosomal está siendo ampliamente usado por nuestro laboratorio como una herramienta básica de la caracterización previa de las cepas bacterianas a la secuenciación molecular.

Mediante el análisis de restricción (ARDRA) fue observable caracterizar tres bandas (1100, 290 y 110pb) para las cepas del género *Leuconostoc*, sin embargo, no existe un consenso en el grado de exactitud que define la especie bacteriana por el análisis, pero puede llegar a ser una herramienta muy valiosa. Es claro que el bandeo de restricción mostrado por las cepas en estudio semejan la evidencia del mismo patrón de bandeo al control de *L. mesenteroides* a diferencia de la que presente *Gluconobacter oxydans* que fue aislada de la planta de agave (fig 24).

Al mismo tiempo, el aislamiento de una cepa bacteria (inu) fue llevada a cabo de una muestra de inulina líquida (lote: 42408124) de agave como producto final del proceso industrial (fuente IMAG S.A.), la caracterización por el análisis de restricción del 16S del ADN ribosomal con dos enzimas: *Hae III* y *Sae 2A* se muestra en la figura 27. Los bandeos de restricción analizados por ambas enzimas muestran la semejanza a *L mesenteroides* (control).



**Figura 27.** Análisis de restricción del ADN 16S ribosomal de una muestra de inulina líquida de agave. M: marcador de peso molecular, *Lm*: cepa control a *L mesenteroides* y inu: bacteria aislada de la inulina. Gel de agarosa 2.5%, 75volts.

La presencia de la bacteria en la inulina sustenta con claridad la utilidad del análisis de ARDRA, en la identificación de géneros bacterianos, que puede ser una herramienta útil de diagnóstico en la industria como la empresa IMAG S.A de C.V. cuando el producto comercial debe ir libre de este tipo microorganismos para evitar a futuro un posible deterioro, que se evalúan en grandes pérdidas millonarias [Fuente: IMAG S.A de C.V. 2013].

La caracterización por el análisis de restricción de 4 cepas bacterianas endófitas fue determinado: M2H-1 (*Leuconostoc mesenteroides*), gr1c-1 (*Weissella paramesenteroides*), Mc3bh (*Lactococcus lactis*) y inlor (*Lactobacillus faecium*). Sorprendentemente la similitud entre los géneros de *Leuconostoc* y *Weissella* es muy evidente (fig 25). Se debe destacar la importancia de las dos bacterias en la caracterización morfológica (fenotípica) en caja Petri, ya que ambas presentaron colonias grandes semi-transparentes viscosas. En lo particular no hay reportes que hablen de estas características presentes en el género *Weissella*. Sin embargo, en el esquema del análisis de restricción entre el *Leuconostoc* y la *Weissella* se logra observar claramente una pequeña diferencia en los bandeos de restricción cuando se usa la enzima *Hae III*. Collins y colaboradores (1993), propusieron que *Leuconostoc paramesenteroides* fueran reclasificados al género *Weissella*.

A pesar de que puedan presentar morfología fenotípica similar: bacilos positivos, catalasa negativa, anaerobios facultativos y son caracterizadas como heterofermentativas; deducir que pueda ser la misma bacteria, o pertenecer al grupo de bacterias ácido lácticas, llega a ser muy estrecho, el criterio de usar la caracterización molecular es importante y se convierte hoy en día en una herramienta poderosa, y en muchos aspectos ventajosa, para la identificación de cepas bacterianas coincidentemente escrito por Rodicio y Mendoza, (2004).

Hay una frase que existe entre los Filogenéticos y me gustaría hacer mención “el DNA no miente” es decir el género *Leuconostoc* es único y diferente genotípicamente al de *Weissella*. El cuál concuerda con lo propuesto

por Schleifer (2009), de asignar a *Leuconostoc* y *Weissella* como dos géneros independientes en la familia *Leuconostocaceae*.

El análisis de secuencias de cinco cepas ch3H-1, ch3H-2, M2H-2, M3H-1, gr1H-1, y gr1H-3 mostraron identidad a la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (99 a 100%) que fueron aisladas de hojas. Una cepa gr2H-1 fue semejante a *Leuconostoc pseudomesenteroides* (100%). Mientras que otras cinco cepas g1T-1, gh1-2, g2h-2, Tch2-T y mA1bh tienen identidad a *Leuconostoc mesenteroides* al 100%. Destacadamente cuatro cepas: M2c-2, gr1c-1, Tch2-T y Tch2-H fueron idénticas a *Weissella paramesenteroides* con 99-100% de identidad. El ensayo de catalasa para todas las bacterias mostraron ser negativas, característico en los géneros *Leuconotoc sp* y *Weissella sp* (tabla 8).

Tres especies del género ***Leuconostoc*** (***L. mesenteroides*** subsp. ***mesenteroides***, ***L. pseudomesenteroides***, ***L. mesenteroides*** y una de ***Weissella paramesenteroides*** reflejan la biodiversidad como endófitas existente en las plantas de agave. La identificación concuerda con el trabajo reportado por Escalante, et al., (2004). En su investigación del pulque identificaron por técnicas moleculares a *L. paramesenteroides* a diferencia de ellos nosotros identificamos además *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, *L. mesenteroides* y *Weissella paramesenteroides*. Pedersen et al., (2014), describe en su trabajo que las cepas de *Leuconostoc sp*. Industrialmente relevantes se pueden clasificar como *L. mesenteroides* o *L. pseudomesenteroides*, en este trabajo se identificó en el proceso industrial de inulina y jarabe de agave a estas bacterias. Esto puede adquirir ventajas y se

puede considerar como una fuente adecuada de cepas útiles, para la industria láctea principalmente.

Otras bacterias, catalasa positiva fueron identificadas como *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faeciu* aisladas de agave y *Kozakia baliensis*, *Kozakia baliensis* aisladas de vara de caña.

## CONCLUSIÓN

En plantas por siembra convencional se identificaron por análisis de secuenciación diez cepas para el género *Leuconostoc* y cuatro cepas para *Weisella paramensenteroides* y dos como *Lactococcus lactis*, mientras que en plantas por micropropagación solo dos cepas fueron identificada como *Leuconostoc mesenteroides*, además de *Enterococcus faecium*, Esto sugiere que muy probablemente el sistema empleado en la micropropagación de *Agave tequilana* altera la presencia natural de *Leuconostoc*. En conclusión podemos decir que el método de aislamiento y caracterización desarrollado para este trabajo es altamente selectivo y confiable para la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* mismo que será utilizado en las siguientes etapas del proyecto. Se pretende publicar los resultados obtenidos del desarrollo de este método de selección.

## CAPITULO 3

## Bibliografía

- Angeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Caballeros, G., Ramírez-Serramo, C., Paredes-Gutiérrez, L., & Hurtado-De la Peña, S. (2012). MICROPROPAGATION OF AGAVE (Agave tequilana Weber. var. Azul) THROUGH AXILLARY BUDS. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 693–698.
- Ávila-Miranda, M. E., Leon-Campos, C., PEÑA-CABRIALES, J. J., RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M. A., MANCILLA-MARGALLI, N. A., Gonzalez-Perez, F., & Arias-Castro, C. (2012). Diversidad génica y grupos de compatibilidad vegetativa en Fusarium oxysporum causante de marchitez en agave ( Agave tequilana Weber. *Gayana Bot*, 69, 40–48.
- Backman, P. a., & Sikora, R. a. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46, 1–3.
- Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2002). Endophytic and Biological Control Potential of Bacillus mojavensis and Related Species. *Biological Control*, 23(3), 274–284. doi:10.1006/bcon.2001.1016
- Bacon, C. W., Hinton, D. M., Mitchell, T. R., Snook, M. E., & Olubajo, B. (2012). Characterization of endophytic strains of Bacillus mojavensis and their production of surfactin isomers. *Biological Control*, 62(1), 1–9. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.03.006
- Benkerroum, N., Misbah, M., Sandine, W. E., & Elaraki, a T. (1993). Development and use of a selective medium for isolation of Leuconostoc spp. from vegetables and dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2), 607–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=202152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Berg, G., & Hallmann, J. (2006). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. In B. Schulz, C. Boyle, & T. N. Sieber (Eds.), *Siol Biology* (Vol. 9, pp. 53–69). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Robert, H., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., & Fontagné-Faucher, C. (2010). Characterization of glucan-producing Leuconostoc strains isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 1–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.026
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014a). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30–37. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.012

- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014b). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30–37. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.012
- Chellapandian M, Larios C, Sánchez-González M and López-Munguía A. 1998. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from „pulque“, a traditional Aztec alcoholic beverage. *J Ind Microbiol Biot* 21: 51–56.
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza, A. M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficies Y Vacío*, 20(3), 1–5.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*, 62, 188–97.
- Conrath, U. (2006). Systemic acquired resistance. *Plant Signaling & Behavior*, 1(4), 179–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2634024&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Coombs, J. T., & Franco, C. M. M. (2003). Visualization of an endophytic *Streptomyces* species in wheat seed. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4260–2. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=165167&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dai, J. X., Liu, X. M., & Wang, Y. J. (2014). Diversity of endophytic bacteria in *Caragana microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui autonomous region of China. *Genetics and Molecular Research*, 13, 2349–58.
- De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J. L., López-Torres, A., Wrobel, K., & Robert-Díaz, M. L. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, 12, 203. doi:10.1186/1471-2229-12-203
- Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. D., & Monsan, P. F. (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), 2159–65. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168507&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Eggleston, G., & Legendre, B. (2003). Mannitol and oligosaccharides as new criteria for determining cold tolerance in sugarcane varieties. *Food Chemistry*, 80(4), 451–461. doi:10.1016/S0308-8146(02)00283-2

- Eggleston, G., Yen, J. W. T., Alexander, C., & Gober, J. (2012). Measurement and analysis of the mannitol partition coefficient in sucrose crystallization under simulated industrial conditions. *Carbohydrate Research*, 355, 69–78. doi:10.1016/j.carres.2012.04.018
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003
- Escalante, A., Rodriguez, M. E., Martinez, A., Lopez- Munguía, A., Gosset, G., Bolivar F.J 2004. Caracterizacion of bacterial diversity in Pulque, a tradicional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16s rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 235:273-279
- Fuentes-ramirez, L. E., & Caballero-mellado, J. (2005). Chapter 5 BACTERIAL BIOFERTILIZERS, (1622), 143–172.
- Gan, H. M., Triassi, A. J., Wheatley, M. S., Savka, M. A., & Hudson, A. O. (2014). High-Quality Draft Whole-Genome Sequences of Three Strains of *Enterobacter* Isolated from Jamaican *Dioscorea cayenensis* (Yellow Yam). *Genome Announcements*, 2(2). doi:10.1128/genomeA.00170-14
- Germano, M. G., Menna, P., Mostasso, F. L., & Hungria, M. (2006). RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 217–29.
- Govindarajan, M., Balandreau, J., Kwon, S.-W., Weon, H.-Y., & Lakshminarasimhan, C. (2008). Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 55(1), 21–37. doi:10.1007/s00248-007-9247-9
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., ... Huang, J. (2014). Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS One*, 9(4), e95543. doi:10.1371/journal.pone.0095543
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A. M., Moulin, L., Chen, W.-M., Elliott, G. N., Bontemps, C., ... James, E. K. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 24, 1276–88.
- Hallmann, J., Berg, G., & Schulz, B. (2006). Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms, 9.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. Van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in*

*Microbiology*, 16, 463–71. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789693>

- Hartmann, A., Schmid, M., Tuinen, D. Van, & Berg, G. (2008). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1-2), 235–257. doi:10.1007/s11104-008-9814-y
- Hernández-Rodríguez, C., Toro, N., Martínez-Abarca, F., Montiel-Lugo, D., Aguirre-Garrido, J. F., Torres-Cortes, G., ... Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 891–904. doi:10.1007/s10482-012-9705-3
- Inami, K., Kashiwa, T., Kawabe, M., Onokubo-Okabe, A., Ishikawa, N., Rodríguez Pérez, E., ... Arie, T. (2014). The Tomato Wilt Fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* shares Common Ancestors with Nonpathogenic *F. oxysporum* isolated from Wild Tomatoes in the Peruvian Andes. *Microbes and Environments / JSME*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24909710>
- Jin, H., Yang, X.-Y., Yan, Z.-Q., Liu, Q., Li, X.-Z., Chen, J.-X., ... Qin, B. (2014). Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Systematic and Applied Microbiology*. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.001
- Kang, H. K., Seo, M. Y., Seo, E. S., Kim, D., Chung, S. Y., Kimura, A., ... Robyt, J. F. (2005). Cloning and expression of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1727(1), 5–15. doi:10.1016/j.bbaexp.2004.10.012
- Krishnan, P., Bhat, R., Kush, a, & Ravikumar, P. (2012). Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits. *Journal of Applied Microbiology*, 113(2), 308–17. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05340.x
- Lamsal, K., Kim, S. W., Kim, Y. S., & Lee, Y. S. (2012). Application of Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Effect and Biocontrol of Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum* on Pepper. *Mycobiology*, 40(4), 244–51. doi:10.5941/MYCO.2012.40.4.244
- Leathers, T. D., & Bischoff, K. M. (2011). Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 33(3), 517–23. doi:10.1007/s10529-010-0450-2
- Leibovici J, Kopel S, Siegal A, Gal-Mor, O. 1986. Effect of tumor inhibitory and stimulatory doses of levan, alone and in combination with cyclophosphamide, on spleen and lymph nodes. *Int J Immunopharmacol*. 8:391-403.

- Lewis, B. A., Sm, F., & Series, S. J. (1967). THE CONSTITUTION OF THE mesenteroides STRAIN C\*, 5, 194–201.
- Lopez, B. R., Bashan, Y., & Bacilio, M. (2011). Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology*, 193(7), 527–41. doi:10.1007/s00203-011-0695-8
- Lugtenberg BJ, Chin-A-Woeng TF, Bloemberg GV. 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81:373–83
- Malfanova, N., Kamilova, F., Validov, S., Chebotar, V., & Lugtenberg, B. (2013). Is L-arabinose important for the endophytic lifestyle of *Pseudomonas* spp.? *Archives of Microbiology*, 195(1), 9–17. doi:10.1007/s00203-012-0842-x
- Mayeux, J. V, & Colmer, a R. (1961). Selective medium for leuconostoc detection. *Journal of Bacteriology*, 81, 1009–11. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=314774&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mercado-Blanco, J., & Prieto, P. (2012). Bacterial endophytes and root hairs. *Plant and Soil*, 361, 301–306.
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A., & Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 376(1), 59–67. doi:10.1016/j.gene.2006.02.007
- Muñoz-Gutiérrez, I., Rodríguez-Alegría, M. E., & López Munguía, A. (2009). Kinetic behaviour and specificity of  $\beta$ -fructosidases in the hydrolysis of plant and microbial fructans. *Process Biochemistry*, 44(8), 891–898. doi:10.1016/j.procbio.2009.04.013
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. a., & Sivasithamparam, K. (2005). Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils*, 42(2), 97–108. doi:10.1007/s00374-005-0008-y
- Niness, K. R.; 1998. Nutritional and health benefits of Inulin and oligofructose.; Orafti Active Food ingredients. 1402S-1406S.
- Olvera, C., Centeno-Leija, S., & López-Munguía, A. (2007). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), 11–20. doi:10.1007/s10482-006-9128-0

- Olivares-Illana, V., López-Munguía, A. and Olvera, C.; Molecular Characterization of inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a fructosyltransferase within a glucosyltransferasae.; *J. of Bacteriology*. 2003: 185 3606-3612.
- Pedersen, T. B., Kot, W. P., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Broadbent, J. R., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. (2014). Genome Sequences of Two *Leuconostoc pseudomesenteroides* Strains, 2(3), 2–3. doi:10.1128/genomeA.00484-14. Copyright
- Portillo, L., Olmedilla, a, & Santacruz-Ruvalcaba, F. (2012). Cellular and molecular changes associated with somatic embryogenesis induction in *Agave tequilana*. *Protoplasma*, 249(4), 1101–7. doi:10.1007/s00709-011-0354-6
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 569–575.
- Premono EM, Moawad AM, and Vlek PLG 1996. 23Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. *Indones J Crop Sci* 11:13-23.
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, a, Tsui, S., Lacava, P. T., ... Pizzirani-Kleiner, a a. (2012a). Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7511–8. doi:10.1128/AEM.00836-12
- Quecine, M. C., Araújo, W. L., Rossetto, P. B., Ferreira, a, Tsui, S., Lacava, P. T., ... Pizzirani-Kleiner, a a. (2012b). Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7511–8. doi:10.1128/AEM.00836-12
- Roberfroid, M. B. 2005. Introducing inulin-type fructans.; *British J. of Nutrition*. 93: S13-S25.
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., ... Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal*, 2(4), 404–16. doi:10.1038/ismej.2007.106
- Rokhbakhsh-Zamin F, Sachdev DP, Kazemi-Pour N, Engineer A, Pardesi KR, Zinjarde S, et al. 2011. 25Characterization of plant growth promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J Microbiol Biotechnol* 21:556-566.

- Romero, F. M., Marina, M., & Pieckenstain, F. L. (2014). The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiology Letters*, 351(2), 187–94. doi:10.1111/1574-6968.12377
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 827–37.
- SAGARPA. (2013, January 8). ACUERDO POR EL QUE SE ESTABLECE LA CAMPAÑA Y LAS MEDIDAS FITOSANITARIAS QUE DEBERAN APLICARSE PARA EL CONTROL Y EN SU CASO ERRADICACION DEL PICUDO DEL AGAVE, ASI COMO DISMINUIR EL DAÑO DE LAS ENFERMEDADES ASOCIADAS A DICHA PLAGA EN LA ZONA DENOMINACION DE. *Diario Oficial de La Federacion*, pp. 1–15. México, D.F.
- Sánchez-Marroquín A, Larios C, and Vierna L. 1967. Estudios sobre la microbiología del pulque XIX. Elaboración de la bebida mediante cultivos puros. *Rev Latinoam Microbiol Parasitol* 9:83-85.
- Schilirò, E., Ferrara, M., Nigro, F., & Mercado-Blanco, J. (2012). Genetic responses induced in olive roots upon colonization by the biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *PloS One*, 7(11), e48646. doi:10.1371/journal.pone.0048646
- Schmid, M., Iversen, C., Gontia, I., Stephan, R., Hofmann, A., Hartmann, A., ... Lehner, A. (2009). Evidence for a plant-associated natural habitat for *Cronobacter* spp. *Research in Microbiology*, 160, 608–14.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? In B. Schulz, C. Boyle, & T. N. Sieber (Eds.), *Soil Biology* (Vol. 9, pp. 1–13). Springer- Verlag Berlin Heidelberg.
- Sharma, M., Nagavardhini, A., Thudi, M., Ghosh, R., Pande, S., & Varshney, R. K. (2014). Development of DArT markers and assessment of diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, wilt pathogen of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics*, 15, 454. doi:10.1186/1471-2164-15-454
- Shi, Y., Lou, K., & Li, C. (2011). Growth promotion effects of the endophyte *Acinetobacter johnsonii* strain 3-1 on sugar beet. *Symbiosis*, 54(3), 159–166. doi:10.1007/s13199-011-0139-x
- Siddiqui, N. N., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2013). Mutational analysis and characterization of dextran synthesizing enzyme from wild and mutant strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), 209–16. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.026
- Sivanantham T, Rasaiyah V, Satkunanathan N, and Thavaranjit AC (2013) 29In vitro screening of antagonistic effect of soil borne bacteria on some selected phytopathogenic fungi. *Arch Appl Sci Res* 5:1-4.

- Suárez-González, E. M., López, M. G., Délano-Frier, J. P., & Gómez-Leyva, J. F. (2014). Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Agave tequilana* and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a)biotic-stress related elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 171(3-4), 359–72. doi:10.1016/j.jplph.2013.08.002
- Thokchom, E., Kalita, M. C., & Talukdar, N. C. (2014). Isolation, screening, characterization, and selection of superior rhizobacterial strains as bioinoculants for seedling emergence and growth promotion of Mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Canadian Journal of Microbiology*, 60(2), 85–92. doi:10.1139/cjm-2013-0573
- Torres-Morán, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Molina-Moret, S., Rivera-Rodríguez, D. M., Velasco-Ramírez, A. P., Infante, D., & Portillo, L. (2010). Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103, 403–409. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s11240-010-9777-6>
- Turner GL, and Gibson AH (1980) *Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Bergersen, F.J. (ed). Chichester, New York, J Wiley pp 111-138.*
- Ulrich, K., Stauber, T., & Ewald, D. (2008). *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 347–351. doi:10.1007/s11240-008-9367-z.
- Vaughn, M. B. and W. D. Glenna, 2006. Archaeological coprolite science: The legacy of Eric O. Callen (1912–1970). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 237: 51-66.
- Vega-Ramos, K. L., Uvalle-Bueno, J. X., & Gómez-Leyva, J. F. (2013). Molecular variability among isolates of *Fusarium oxysporum* associated with root rot disease of *Agave tequilana*. *Biochemical Genetics*, 51, 243–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315087>
- Waters DM<sup>1</sup>, Mauch A, Coffey A, Arendt EK, Zannini E. 2013. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal based beverages: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013 Sep 2. [Epub ahead of print].
- Wang, K., Yan, P.-S., Ding, Q.-L., Wu, Q.-X., Wang, Z.-B., & Peng, J. (2013). Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their

chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(1), 1–10. doi:10.1007/s11274-012-1135-x

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. a, & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207061&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Zuccaro, A., Lahrmann, U., & Langen, G. (2014). Broad compatibility in fungal root symbioses. *Current Opinion in Plant Biology*, 20, 135–145.