

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE INGENIERÍA

BIOINGENIERÍA



“IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS RIZOSFÉRICOS DE UN  
AMBIENTE EXTREMO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOINGENIERA PRESENTA:

LUZ ADELA OREGÓN DÍAZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ASENETH HERRERA MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO AMÍLCAR SOLÍS DOMÍNGUEZ

Mexicali, B.C., a 7 de septiembre del 2018

## **Dedicatoria**

A mi padre **Francisco Gerardo Oregón Loyola**.

No podía fallarte con lo que te prometí. Aunque ya no estés con nosotros, sigues en mi corazón y pensamientos.

## **Agradecimientos**

A mi madre **Josefina Díaz Ruíz** y a mi padrastro **Eugenio Arvizu Barragán**, por apoyarme a lo largo de mi carrera y con mi decisión de hacer tesis, por escucharme y estar conmigo en momentos de estrés y ansiedad, por preocuparse y por brindarme amor en todo momento. Y a quienes siempre voy a amar pese a los momentos difíciles, los amo y están en mi corazón.

A mis adorados hermanos **Francisco Fabián Oregón Díaz** y **José Manuel Gámez Díaz** por preocuparse por mí y darme ánimos de seguir en todo momento y a mis hermanas **Alejandra Iribe Díaz** y **Fabiola Iribe Díaz**, a quienes amo inmensamente y agradezco por apoyarme, escucharme, comprenderme, aconsejarme, guiarme y siempre confiar en mí.

A mis padrinos **Yolanda Oregón Loyola** y **José Armando Beltrán Lerma**, aunque es poco el tiempo que tenemos de estar unidos de nuevo, de corazón los amo y estoy inmensamente agradecida por sus consejos, apoyo, amor, comprensión, tiempo y por siempre estar cuando los necesito.

A mi primo **Luis Armando Beltrán Oregón**, por ser un hermano y mejor amigo. Por toda su confianza, amor, consejos, tiempo, comprensión y por ese “borrón y cuenta nueva”.

A mi asesora, la **Dra. Aseneth Herrera Martínez**, quien es mi modelo a seguir, por ser una excelente persona en todos los aspectos, por motivarme, apoyarme en todos los sentidos, por aconsejarme, por darme todo ese tiempo, confianza, paciencia y por compartir sus conocimientos. Tener la capacidad de brindar conocimientos sin juzgar y con paciencia es algo admirable.

Al **Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez**, por confiar en mi al darme esa beca de investigación cuando iniciaba mi carrera y por seguir confiando en mi hasta hoy, por todos sus conocimientos, paciencia, motivación y por ponerme los pies sobre la tierra cuando cometí errores.

A mi mejor amiga **Fabiola Castro Durazo** por ser mi hermana, mi confidente, mi apoyo, por nunca fallarme, por siempre estar para mí, por reconocer y aceptar mi locura con amor y nunca juzgarme y a la **familia Castro Durazo**, por ser también mi familia, darme apoyo, consejos, amor.

A **Ana L. Reséndiz B.**, por compartir momentos de estrés y de felicidad, por todas esas risas y caras chistosas, por escucharme y ser mi amiga.

A todos mis compañeros de laboratorio y especialmente a **Enrique Campos G., Guadalupe Rangel, Najla Georgette, José A. Valenzuela A. y Guillermo Sahagun**, por todos los buenos y malos momentos juntos.

A la **Facultad de Ingeniería-Mexicali** y al **Programa de Bioingeniería** de la Universidad Autónoma de Baja California por darme la oportunidad hacer uso de sus instalaciones para poder realizar este proyecto de investigación.

Al proyecto (3063) “Potencial de plantas nativas del Municipio de Mexicali para utilizarse en fitorremediación de sitios que contienen metales pesados”, apoyado en la 19ª Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación de la Universidad Autónoma de Baja California, por su apoyo y financiamiento.

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, empleando técnicas microbiológicas y de biología molecular se identificaron algunos microorganismos provenientes de la Laguna Salada, Baja California (ambiente árido que alcanza temperaturas extremas, posee alta salinidad y alcalinidad). Se trabajó con doce aislados bacterianos, cada uno se inoculó en medio R2A modificado con NaCl 12% p/p, pH 8.5, y se incubó a 35 °C por 32 horas para describir características de morfología colonial y se realizó tinción de Gram para describir morfología microscópica. Se aislaron esporas y esporocarpos de hongos de las muestras de suelo rizosférico correspondientes a algunas de las plantas nativas de la Laguna Salada (*Haplopappus sp.*, *Prosopis sp.*, *Lycium andersonii*, *Larrea trindetata* y *Sueda divaricata*) para identificarlos por características morfológicas. Se extrajo ADN de cada aislado microbiano (bacterias y hongos) y posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento del gen ribosomal 18S ADN, en el caso de hongos y el gen ribosomal 16S ADN para el caso de bacterias; los productos de la amplificación por PCR fueron purificados y secuenciados. Las secuencias del gen ribosomal 16S ADN mostraron mayor porcentaje de identidad con las de los microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, los cuales según la literatura son microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal. Las secuencias parciales del gen ribosomal 18S ADN mostraron mayor porcentaje de identidad con las de microorganismos pertenecientes al filo Ascomycota, no se lograron identificar hongos micorrizicos arbusculares debido al tiempo de almacenamiento de las

muestras de suelo rizosférico utilizado. Pese a esto, este estudio es un precedente importante para futuras investigaciones de microorganismos simbióticos presentes en la Laguna Salada.

## ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO .....	10
1.1 Laguna Salada.....	10
1.2 Microorganismos extremófilos.....	11
1.2.1 Endosporas de <i>Bacillus</i> .....	14
1.2.2 Proceso de esporulación de <i>Bacillus</i> .....	15
1.3 Simbiosis.....	16
1.4 Rizosfera.....	17
1.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	18
1.5.1 Asociaciones micorrízicas.....	20
1.6 Hongos Micorrízicos Arbusculares.....	21
1.7 Microorganismos endófitos.....	23
1.8 Identificación molecular de microorganismos.....	24
1.8.1 Identificación molecular de bacterias.....	25
1.8.2 Identificación molecular de HMA.....	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo General.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
4. HIPOTESIS.....	31
5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	32
5.1 Aislamiento de esporas y esporocarpos.....	32
5.2 Desinfestación de esporas y esporocarpos aislados de suelo rizosférico.....	33
5.3 Obtención de aislados bacterianos.....	33

5.4	Tinción Gram.....	34
5.5	Extracción y purificación de ADN de esporas y esporocarpos.....	35
5.5.1	Método A para extracción de ADN.....	35
5.5.2	Método B para extracción ADN.....	36
5.5.3	Extracción de ADN bacteriano.....	37
5.5.3.1	Pretratamiento para bacterias Gram positivas y Gram negativas. .	37
5.6	Amplificación de ADN de esporas y esporocarpos por PCR anidado. ....	38
5.7	Electroforesis en gel de agarosa.....	39
5.8	Purificación de productos de PCR.....	40
5.9	Determinación de la concentración e índice de pureza de ADN. ....	41
5.10	Análisis de secuencias.....	41
6	RESULTADOS .....	42
6.1	Morfología de aislados bacterianos.....	42
6.2	Morfología de esporas y esporocarpos.....	46
6.3	Comparación de métodos de extracción de ADN de esporas y esporocarpos.....	50
6.4	Extracción de ADN bacteriano.....	57
6.5	Reacción en cadena de la polimerasa.....	57
6.5.1	Reacción en cadena de la polimerasa de ADN extraído de esporas y esporocarpos.....	57
6.5.2	Reacción en cadena de la polimerasa de ADN bacteriano.....	58
6.6	Análisis de ADN.....	60
7	DISCUSION DE RESULTADOS.....	67

7.1	Bacterias con posible potencial de promover el crecimiento vegetal, en la LS.	67
7.2	Hongos no micorrícicos arbusculares presentes en el suelo de la LS. ....	70
7.2.1	Semilla aislada del suelo de la LS. ....	74
7.3	Identificación morfológica de hongos micorrizicos arbusculares. ....	76
7.4	Identificación molecular de hongos. ....	77
8	PERSPECTIVAS .....	78
9	CONCLUSIONES .....	79
10	REFERENCIAS .....	80

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Laguna Salada.

La cuenca de la Laguna Salada (LS) es una depresión tectónica alargada que cubre un área aproximada de 700 km<sup>2</sup>, con aproximadamente 20 km de ancho y alrededor de 100 km de longitud. Está localizada dentro del municipio de Mexicali B.C., entre Sierra Juárez y Sierra Cucapá (Figura 1), entre los paralelos 32°00'00'' y 32°33'50'' latitud norte, y los paralelos 115°22'00'' y 115°47'00'' longitud oeste del meridiano de Greenwich (Compean-Jimenez *et al.*, 1984; Contreras *et al.*, 2005; Gallardo-Mata, 2013).

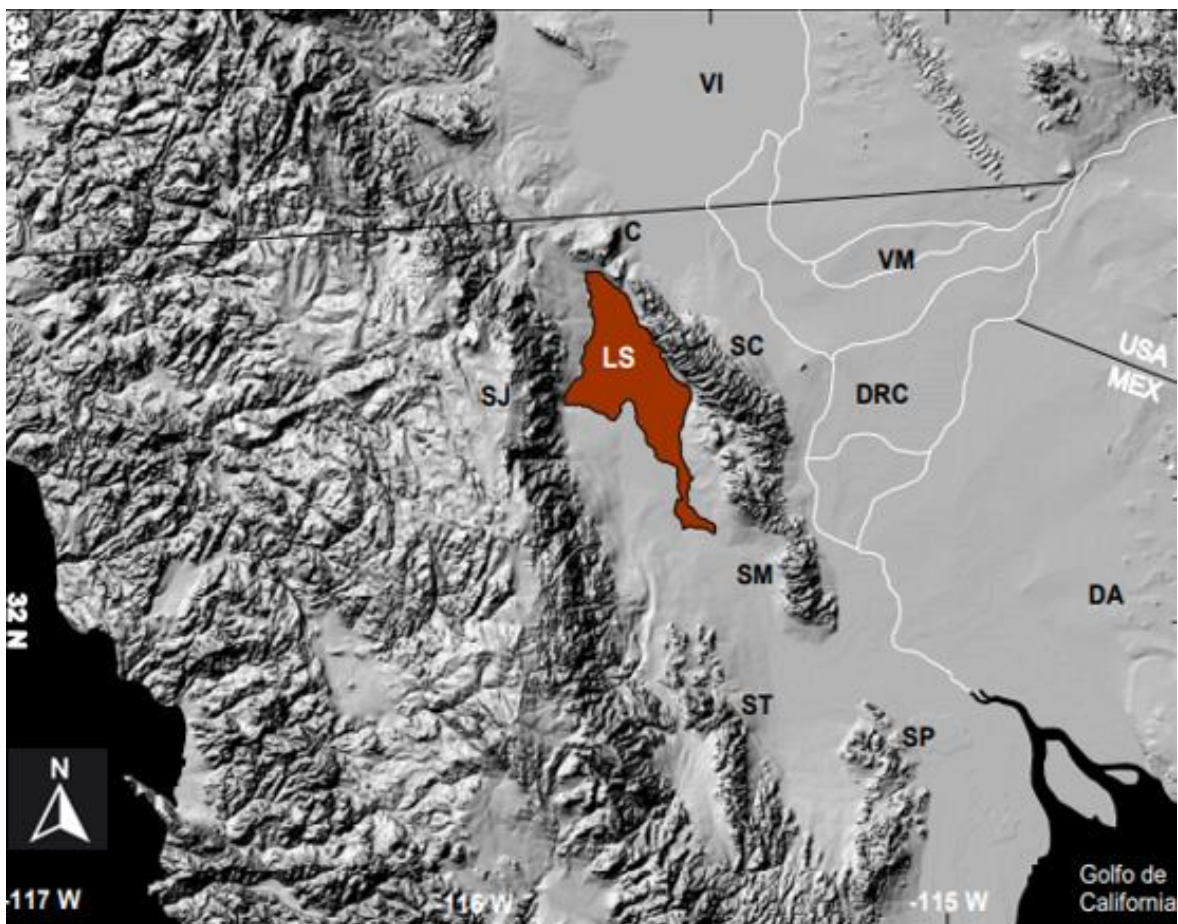


Figura 1. Modelo digital de elevación que muestra la localización de la Laguna Salada (LS) (marcada en rojo) así como los principales rasgos morfológicos que la rodean: Sierra de Juárez, Sierra Cucapá, Sierra El Mayor, Sierra Las Tinajas, Sierra Las Pintas, Cerro Centinela, Delta del Río Colorado, Valle Imperial, Valle de Mexicali y Desierto de Altar (Aco-Palestina, 2006).

El vaso de esta laguna se clasifica como un ambiente “lago-playa” tipo Sabkha, con temperaturas de 49 °C, siendo la temperatura media de 34 °C y la mínima de 23 °C. Esta cuenca se encuentra bordeada por dos sierras que producen una importante sombra de lluvia, así como condiciones hipeáridas (Aco-Palestina, 2006; Pérez-Bastidas, 1983).

Trabajos previos de este grupo de investigación, muestran que el suelo de la LS donde hay plantas, presenta una textura tipo arcillo limosa, con un pH de 7.4 a 9.77 (suelo alcalino y sódico en algunas áreas y moderadamente alcalino a muy alcalino en otras zonas) y conductividad eléctrica de 2.26 a 5.9 dS/m. Contenido de materia orgánica de un 0.18%, 12 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, 104 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo y 2,628 kg ha<sup>-1</sup> de potasio (Saldaña-Robles, 2016; Sánchez-Leyva, 2015). Mientras que, en las zonas exploradas donde no hay plantas, el suelo presenta una textura franco arcillo limosa en algunas áreas y arcillosa en otras. Con un pH de 9.4, conductividad eléctrica de 71 dS/m hasta 185 dS/m, contenido de materia orgánica entre 0.18 y 1.82%, entre 18 a 33 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, 179 a 184 kg ha<sup>-1</sup> de fósforo y 2,628 kg ha<sup>-1</sup> de potasio (López-Arreguín, 2015). Estas condiciones permiten la presencia de microflora extremófila, capaz de producir sustancias de interés biotecnológico (López-Arreguín, 2015; Saldaña-Robles, 2016; Valenzuela-Avilés, 2017).

## 1.2 Microorganismos extremófilos.

El término “extremófilo” describe a los microorganismos capaces de poblar ambientes hostiles. Los microorganismos extremófilos se han aislados de

ambientes donde factores como el calor, sequia, pH, salinidad, presión e incluso radiación, alcanzan valores extremos (Madigan *et al.*, 2015; MacElroy, 1974). Las condiciones fisicoquímicas en las que habitan este tipo de microorganismos se utilizan para clasificarlos como: termófilos e hipertermofilos (presentan crecimiento óptimo a temperaturas desde 55 °C hasta 121 °C), psicrófilos (crecen óptimamente a temperaturas desde -2 °C hasta 20 °C), acidófilos y alcalófilos (microorganismos, que requieren valores de pH menores a 5.5 y mayores a 8 respectivamente, para su crecimiento), halófilos (se desarrollan en presencia de NaCl en concentraciones desde 1% hasta 12%), osmófilos (presentan crecimiento a una alta concentración de solutos orgánicos), oligótrofos (crecen con una baja concentración de solutos y/o nutrientes), xerófilos (microorganismos que crecen en ambientes muy secos) y barófilos (los que crecen en condiciones de presión elevada) (Rampelotto, 2013; Seckbacg y Rampelotto, 2015).

Los microorganismos extremófilos incluyen miembros de tres dominios de la vida (bacteria, archaea y eukarya) y pueden ser divididos en dos amplias categorías: extremófilos, los cuales requieren una o más condiciones extremas para crecer, y los extremo-tolerantes, que toleran valores extremos de uno o más de los parámetros fisicoquímicos antes mencionados, sin embargo, crecen mejor en condiciones normales (MacElroy, 1974; Madigan *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2006; Rampelotto, 2013).

Pese a que los microorganismos extremófilos se clasifican según un solo parámetro extremo, los entornos en los que se encuentran suelen presentar más de

una condición extrema, por lo que son comúnmente considerados “poliextremófilos” (Rampelotto, 2013; Seckbacg y Rampelotto, 2015).

Dado que estos microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a entornos extremos y desarrollar características metabólicas diferentes a los mesófilos, son de interés biotecnológico, ya que producen “extremoenzimas” (enzimas funcionales bajo condiciones extremas). Las extremoenzimas son útiles en procedimientos de producción industrial en el sector agrícola, químico y farmacéutico. Debido a su capacidad para mantenerse activas bajo condiciones extremas, estas enzimas son muy utilizadas en el área de investigación a diferencia de las enzimas convencionales, las cuales tienen un uso restringido dado su limitada estabilidad en condiciones extremas (Elleuche *et al.*, 2014; Podar y Reysenbach, 2006; Ramírez *et al.*, 2006; Van-Den-Burg, 2003). El ejemplo más conocido de una aplicación industrial y en el área de investigación molecular, de una extremoenzima de origen microbiano, es la Taq ADN polimerasa. Ésta fue aislada de *Thermus aquaticus*, (bacteria termófila que habita en la proximidad de manantiales de agua caliente) (Ramírez *et al.*, 2006).

Uno de los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad de soportar condiciones extremas y que además es capaz de formar endosporas, es *Bacillus*, el cual atrajo la atención de los investigadores desde la década de 1970 por su capacidad de producir extremoenzimas con aplicaciones en procesos industriales (Seckbach, 1998).

### 1.2.1 Endosporas de *Bacillus*.

Las endosporas son células diferenciadas extremadamente resistentes al calor, a sustancias químicas agresivas y a la radiación. Éstas son estructuras de supervivencia y permiten al microorganismo que las genera soportar condiciones de crecimiento desfavorables (temperaturas extremas, sequía y/o carencia de nutrientes). Habitualmente, las bacterias que forman endosporas se encuentran en el suelo y como ya se mencionó, las del género *Bacillus* son las más estudiadas (Madigan *et al.*, 2015).

Las endosporas son la etapa latente del ciclo vital de la bacteria que las produce. Una endospora puede permanecer como tal durante años, y convertirse rápidamente en célula vegetativa. Este proceso consta de tres etapas: activación, donde la endospora se calienta varios minutos a una temperatura elevada subletal para activarse y germinar cuando se le suministran determinados nutrientes; germinación, la cual es un proceso rápido donde la endospora pierde resistencia al calor y a las sustancias químicas; y crecimiento, donde aparece un hinchamiento visible debido a la captación de agua y por la síntesis de ARN, proteínas y ADN. La célula vegetativa emerge de la endospora rota, empieza a crecer y mantiene su crecimiento vegetativo hasta que las señales ambientales adecuadas vuelven a desencadenar la esporulación (Guerrero y Berlanga, 2001; Madigan *et al.*, 2015; Tortora *et al.*, 2015).

### 1.2.2 Proceso de esporulación de *Bacillus*.

En el proceso de esporulación intervienen alrededor de 200 genes y tiene una duración aproximada de 8 horas. Este proceso consta de 7 etapas o estados: el estado 0 representa a la célula vegetativa que no ha entrado en la ruta de esporulación; en el estado I la célula ya ha entrado en la ruta y en dicho estado, el ADN se presenta como un filamento axial en el que dos cromosomas de la última ronda de replicación del ADN se alinean a lo largo del eje longitudinal de la célula y se forma un tabique en una posición polar extrema; en el estado II, los tabiques dividen la célula, originando el septo asimétrico de la preespora. Así, la célula se encuentra dividida por dos compartimientos, un compartimiento grande y otro pequeño, conocidos como célula madre y preespora respectivamente. Al inicio, los compartimientos se encuentran uno al lado del otro, pero en el estado III, la preespora se ve envuelta por la célula madre y es completamente comprimida como un protoplasto libre dentro de la célula madre, de modo que la preespora se convierte en una célula libre dentro de una célula (razón por la cual las esporas de *Bacillus* y géneros relacionados se conocen como endosporas). En el estado IV, ocurre la síntesis del córtex, una capa gruesa de peptidoglucano, que se cree que está involucrada en lograr mantener el estado deshidratado y la resistencia al calor de la endospora. En el estado V, se da lugar a la síntesis de la cutícula y de otras capas de la endospora. En este estado se acumula el ácido dipicolínico, existe captación de  $\text{Ca}^{2+}$  y se producen grandes cantidades de una familia de pequeñas proteínas solubles en ácido conocidas como SASP (por sus siglas en inglés). En el estado VI, se da lugar a eventos de maduración y adquisición de resistencia. El

recubrimiento de la endospora se vuelve más denso en apariencia y la endospora se vuelve fuertemente refractante. Finalmente, cuando la maduración se completa, la endospora se libera por lisis de la célula madre (Guerrero y Berlanga, 2001; Seymour, 2001; Stragier y Losick, 1996).

### 1.3 Simbiosis.

El término “simbiosis” generalmente es definido como la asociación persistente de dos o más especies diferentes. Un gran número de asociaciones simbióticas implican solo un organismo eucariote multicelular asociado con uno o más microorganismos, incluyendo bacterias, virus y microorganismos eucariontes. Por convención, el asociado más grande se conoce como “hospedero” y el más pequeño como “huésped” (Oliver y Russell, 2006). En términos de cercanía, las asociaciones simbióticas pueden ser divididas en dos categorías: ectosimbiosis y endosimbiosis. En la ectosimbiosis, los socios permanecen externos entre sí (huésped y ectosimbionte); en la endosimbiosis, el simbionte (endosimbionte) crece dentro del hospedero (Nardon y Charles, 2004; Stanier *et al.*, 1987).

Las relaciones simbióticas también son divididas en tres categorías basadas en si el simbionte se beneficia, es nocivo o no tiene efectos en el hospedero. En el caso donde, tanto el anfitrión y el huésped obtienen beneficios recíprocamente de la relación, se conoce como una relación simbiótica mutualista; en el caso donde, el simbionte se beneficia del hospedero sin otorgar un beneficio, ni causar algún daño al mismo, se conoce como relación simbiótica comensal; y en el caso donde el

simbionte usa al hospedero como un recurso y le causa daño como resultado, se conoce al simbionte como parasito (Leung y Poulin 2008).

Un ejemplo claro de simbiosis es el de las plantas que interaccionan estrechamente con microorganismos del suelo (generalmente suelo rizosférico) estableciendo asociaciones ectosimbíóticas a través de sus raíces y de las superficies de sus hojas, e incluso más íntimamente, estableciendo asociaciones endosimbíóticas con en el interior de sus tejidos vasculares. La mayoría de los mutualismos entre plantas y microorganismos incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas y las defienden de microorganismos patógenos (Madigan *et al.*, 2015).

#### 1.4 Rizosfera.

La rizosfera es la parte del suelo inmediata a las raíces de las plantas y se caracteriza por alta actividad microbiana (Madigan *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2011; Uzoh y Babalosa, 2018).

En la rizosfera, se produce una interacción biológica, químicamente diversa, compleja y dinámica entre las raíces de las plantas, la microbiota del suelo y las condiciones fisicoquímicas del suelo. La planta proporciona, a través de sus raíces, un flujo de exudados, claves en la composición de la rizosfera, que atraen una gran cantidad de microorganismos que pueden desplazarse por quimiotaxis (Nihorimbere, 2010).

Generalmente, se reconocen tres componentes distintos en la rizosfera: la rizosfera misma, el rizoplano y la raíz. La rizosfera es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de exudados, como aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles reguladores de crecimiento, esteroides, azúcares y vitaminas, que afectan la actividad microbiana; el rizoplano es la superficie de la raíz, incluyendo las partículas de tierra fuertemente adheridas y; la raíz en sí, que forma parte del sistema ya que ciertos microorganismos endófitos son capaces de colonizar los tejidos de la raíz interna (Wu y Srivastava, 2012).

El rizoplano y el suelo de la rizosfera circundante están colonizados u ocupados por una amplia gama de microorganismos que incluyen saprofitos, endófitos, exopatógenos, patógenos (parásitos), hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Kumari *et al.*, 2018; Maheshwari, 2010; Nihorimbere, 2010; Wu y Srivastava, 2012).

### 1.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Las bacterias que son capaces de colonizar las raíces de las plantas y promover el crecimiento vegetal se conocen como “rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal” (PGPR, por sus siglas en inglés) (Beneduzi *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2015). Éstas pueden clasificarse de acuerdo con la relación que establecen con la planta como: bacterias simbióticas o rizobacterias de vida libre. Gray y Smith (2005) definen estos mismos conceptos como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal intracelulares (iPGPR, por sus siglas en inglés) que son

simbióticas, y rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal extracelulares (ePGPR, por sus siglas en inglés) que son de vida libre (Khan, 2005; Kloepper *et al.*, 1989; Martínez-Viveros, 2010).

Los mecanismos que se emplean por parte de dichas bacterias para promover el crecimiento vegetal pueden ser directos o indirectos. La promoción de crecimiento vegetal indirecta ocurre cuando las PGPR previenen o disminuyen el efecto nocivo de uno o más microorganismos fitopatógenos por la producción antibióticos, enzimas líticas, sideróforos, entre otros mecanismos (resistencia sistémica inducida, competencia, control de estrés) (Glick, 1994; Glick *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2015; Molina-Romero *et al.*, 2015; Numan *et al.*, 2018). Por otro lado, la promoción directa de crecimiento vegetal ocurre cuando las PGPR proporcionan a la planta un compuesto que puede ser sintetizado por las mismas plantas, como fitohormonas y sideróforos, o facilitándole a la planta la absorción de ciertos nutrientes del medio ambiente, como fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos y potasio (Glick, 2012; Gupta *et al.*, 2015; Martínez-Viveros, 2010; Numan *et al.*, 2018).

Las PGPR que habitan en la rizosfera pertenecen a géneros como: *Achromobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Micobacterium*, entre otros. Dependiendo del mecanismo utilizado para promover el crecimiento, las PGPR se pueden distinguir como: biofertilizantes, aquellas que brindan nutrientes como nitrógeno y fosfatos a la planta; fitoestimuladores, las que producen sustancias que estimulan el crecimiento como las fitohormonas; o controladores de estrés, PGPR que contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-

carboxilato (ACC) desaminasa que facilita el crecimiento y desarrollo de la planta bajando los niveles de etileno (Lugtenberg y Kamilova, 2009; Numan *et al.*, 2018).

#### 1.5.1 Asociaciones micorrízicas.

El término micorriza (proveniente del griego *mike* y *rrhiza*, lo que significa hongo y raíz) es definido como la asociación simbiótica mutualista, permanente y no patógena entre las raíces de las plantas y hongos especializados (Raina *et al.*, 2000).

Los hongos micorrízicos son considerados ubicuos en el suelo y forman asociaciones simbióticas del tipo mutualista con las raíces de la mayoría de las plantas terrestres (Salzer y Boller, 2000). Éstos ayudan a la planta de forma directa al adquirir nutrientes minerales del suelo, especialmente elementos inmóviles como P, Zn y Cu; y iones móviles como S, Ca, K, Fe, Mn, Cl, Br y N. También se ha demostrado que los hongos micorrízicos benefician a la planta de forma indirecta aumentando la tolerancia al estrés provocado por distintos factores bióticos y abióticos (Balestrini y Lumini, 2018; Gupta.*et al.*, 2000; Linderman, 1988; Raina *et al.*, 2000; Salzer y Boller, 2000).

Las asociaciones micorrízicas constan de tres componentes básicos: el micelio del hongo, el cual explora grandes volúmenes de suelo y ayuda a recuperar nutrientes minerales; la interface hongo-planta, donde ocurre la transferencia de nutrientes; y los tejidos de la planta, los cuales producen y almacenan carbohidratos (Raina *et al.*, 2000). Estas asociaciones se clasifican en siete tipos distintos

(implicando diferentes grupos de hongos, plantas hospederas y diferentes patrones de morfología): endomicorrizas, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas ericoides, micorrizas orquídeas, micorrizas arbutoides y micorrizas monotropoides (Gupta et al., 2000; Harley, 1989; Harley y Harley, 1987). Dentro de las cuales las más comunes según Brundrett (2009) son: ectomicorrizas (ECM), que forman un manto alrededor de las raíces y una red de Hartig entre las células de la raíz; micorrizas orquídeas, donde los hongos producen espirales de hifas dentro de las raíces (o tallos) de plantas orquídeas; micorrizas ericoides, las cuales involucran espirales de hifas en las células externas de las “raíces pilosas” de las plantas en los Ericales y micorrizas arbusculares que producen arbuscúlos, hifas y vesículas dentro de las células de la corteza de la raíz (Brundrett, 2009; Basu *et al.*, 2018).

#### 1.6 Hongos Micorrízicos Arbusculares.

La simbiosis micorrizica arbuscular es una de las más distribuidas, pues se establece con la mayoría de las plantas terrestres (Basu *et al.*, 2018). Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbiosiontes obligados, pertenecientes al filo monofilético de Glomeromycota. Este tipo de hongos proporcionan beneficios tales como la obtención de nutrientes minerales a la planta hospedera, y aumentan la tolerancia al estrés de la planta provocado por factores como la presencia de metales pesados en el suelo, alta salinidad, sequía y temperaturas extremas; a cambio, los HMA adquieren carbono de la planta hospedera para completar su ciclo de vida (Bago *et al.*, 2001; Cardenas-Flores *et al.*, 2011; Miransari, 2009; Smith y Read., 2008). Los HMA juegan un papel fundamental en la fertilidad del suelo, la

nutrición de las plantas y en el mantenimiento de la estabilidad y la biodiversidad dentro de las comunidades vegetales, tanto en los ecosistemas naturales como en los agroecosistemas. Debido a su complejidad son de gran importancia agrícola y forestal (Martin y Tagu, 1999; Giovannetti y Avio, 2002).

Los HMA producen esporas asexuadas, multinucleadas, en las que se basa su identificación. Después de establecer simbiosis funcionales con plantas hospederas, producen dichas esporas en el suelo, las cuales pueden germinar y crecer, pero debido a que son simbiontes obligados, no pueden producir micelios extensos y completar su ciclo de vida en ausencia de sus huéspedes. Las esporas también se producen en hifas para formar estructuras más complejas; los esporocarpos. Sus diámetros van desde 50 a 600  $\mu\text{m}$  y se diferencian entre sí por sus características morfológicas (forma, color, tamaño, pared de esporas y estructura de hifas subyacentes, hifas de sostén y ornamentación) que se han utilizado para describir una gran cantidad de especies distintas (Lee, 2006; Giovannetti y Avio, 2002; Varma, 1998).

A pesar de que la caracterización morfológica es fundamental para la identificación de especies taxonómicas, se da una gran diversidad biológica dentro de las especies, y los aislados muestran características diferentes relacionadas con los requerimientos de pH, la tolerancia a la temperatura, reacciones a fertilizantes, tolerancia a las prácticas agrícolas y otros factores relacionados con el ambiente del suelo. Los análisis moleculares han mejorado el conocimiento de los HMA, proporcionando herramientas para la identificación de diferentes aislados directamente de las raíces y del suelo (Giovannetti y Avio, 2002).

## 1.7 Microorganismos endófitos.

El término “endófito”, se define como la asociación asintomática de un organismo vivo creciendo dentro de un tejido de la planta viva. Los microorganismos que a menudo son más relacionados con este término son las bacterias y los hongos, siendo los hongos los microorganismos que se han aislado con mayor frecuencia como endófitos (Sharma *et al.*, 2018; Wilson, 1995).

Se estima que los endófitos crean asociaciones simbióticas mutualistas con las plantas, debido a que reciben nutrientes y protección de la planta hospedera mientras que le otorgan beneficios como resistencia a herbívoros, patógenos y al estrés provocado por factores abióticos. Sin embargo, el término “endófito” no debe tener más o menos afinidad con el término mutualista que con el término patógeno. Es posible tener un endófito dentro de una planta que, en diferentes momentos, puede tener asociaciones mutualistas, patogénicas y/o saprofitas con su hospedero (Saikkonen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2000; Wilson, 1995).

Los hongos endófitos viven internamente, ya sea inter e intracelularmente, asintomáticamente dentro de los tejidos de la planta (Sharma *et al.*, 2018). Se han encontrado en todas las plantas (pastos, algas, musgos y plantas vasculares), usualmente habitan en tejidos de plantas sobre el suelo (hojas, tallos, cortezas y estructuras reproductivas), lo que los distingue de los simbiontes micorrízicos más conocidos (Saikkonen *et al.*, 1998; Sánchez-Fernandez *et al.*, 2015). Las asociaciones endófitas difieren de las micorrizas principalmente por la ausencia de una interfaz localizada de hifas especializadas (presente en la mayoría de las

micorrizas), la ausencia de desarrollo sincronizado de hongos y plantas, y la falta de beneficios de la transferencia de nutrientes (Brundrett, 2009).

Por otro lado, las bacterias endófitas se consideran microorganismos ubicuos en los tejidos internos de las plantas, generalmente colonizan intracelular e intercelularmente los tejidos sin causar algún daño. La diversidad de las bacterias endófitas es influenciada por las condiciones ambientales, el genotipo de la planta, interacciones microorganismo-microorganismo e interacciones planta-microorganismo (Sharma *et al.*, 2018). Algunos endófitos bacterianos son capaces de promover el crecimiento de las plantas, utilizando mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas similares a los utilizados por las bacterias rizosféricas. Éstas pueden tener una ventaja sobre las bacterias rizosféricas, ya que vivir dentro del tejido de una planta representa una oportunidad de estar siempre en contacto con las células de la planta y, por lo tanto, ejercer más fácilmente un efecto beneficioso directo (Santoyo *et al.*, 2015).

#### 1.8 Identificación molecular de microorganismos.

La capacidad de cuantificar el número y tipo de microorganismos dentro de una comunidad es fundamental para la comprensión de la estructura y función de un ecosistema. Hoy en día, la aplicación de técnicas moleculares como la amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), el estudio de los genes ribosomales de ARN (ácido ribonucleico), las mejoras en los métodos de secuenciación y la disponibilidad de recursos en línea, han permitido el estudio de comunidades microbianas en una amplia gama

de entornos, obteniendo aceptación y aplicación en el área de microbiología ambiental, así como en otras áreas de la microbiología (Albuquerque *et al.*, 2009; DeLong, 2004; Theron y Cloete, 2000).

#### 1.8.1 Identificación molecular de bacterias.

La identificación tradicional de bacterias sobre la base de características fenotípicas generalmente no es tan precisa como la identificación basada en métodos genotípicos. El análisis basado en la PCR del gen 16S ARNr es una herramienta poderosa y esencial para los estudios de la diversidad bacteriana, la estructura de la comunidad, la evolución y taxonomía (Clarridge, 2004; Hongoh *et al.*, 2003).

La secuencia del gen 16S ARNr tiene alrededor de 1550 pares de bases (pb) de longitud y está compuesta de regiones conservadas y de suficientes polimorfismos interespecíficos para proporcionar mediciones distintivas y estadísticamente válidas. En general, la secuencia del gen 16S ARNr es universal en las bacterias, permite la diferenciación entre organismos a nivel género en todos los principales filos de bacterias y es el gen más ampliamente utilizado para la identificación de bacterias. En el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), el mayor banco de datos de secuencias de nucleótidos, se pueden encontrar más de 20 millones de secuencias depositadas, de las cuales 90 000 son del gen 16S ARNr, lo que significa que hay muchas

secuencias previamente depositadas contra las cuales comparar la secuencia de una cepa desconocida (Clarridge, 2004; Janda y Abbott, 2007).

A pesar de que otros genes de ARNr también se han utilizado para diversos estudios de bacterias, como las secuencias espaciadoras transcritas del gen 16S y 23S ARNr y los genes 23S y 5S ARNr, no se utilizan ampliamente y hay pocas secuencias comparativas, y para el caso del gen 5S ARNr, su secuencia es considerada muy corta (120 pb) para análisis filogenéticos (Clarridge, 2004).

Para el presente trabajo de tesis, se amplificó un fragmento del gen ribosomal 16S ARNr de aproximadamente 1500 pb utilizando el par de oligonucleótidos 27F y 1492R (Figura 2) específicos para este gen.

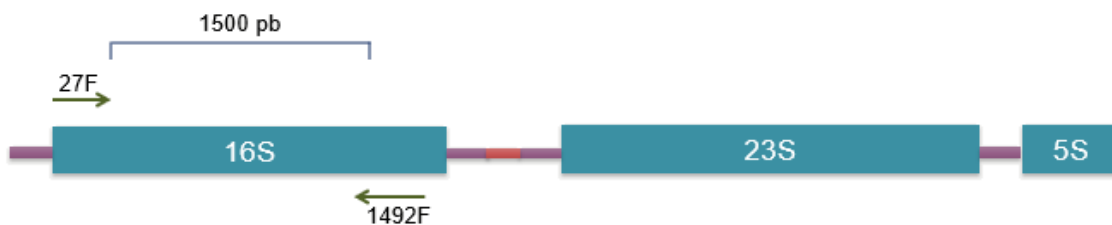


Figura 2. Posiciones aproximadas de los oligonucleótidos 27F y 1492R en el gen ribosomal 16S. Modificado de Lodish *et al.*, 2016.

### 1.8.2 Identificación molecular de HMA.

Como se mencionó en el apartado 1.5.1, la identificación de los HMA se basa en las características morfológicas de sus esporas. Sin embargo, esto presenta problemas tales como: pocas características morfológicas; las paredes superficiales de la spora se desprenden con la edad o se degradan por hiperparasitismo;

factores abióticos; tienden a cambiar su apariencia desde el momento en que se aíslan; posible formación de esporas dimórficas, entre otros (Varma, 1998). Por lo que la biología molecular ofrece varias herramientas para complementar los inconvenientes que genera el estudio morfológico-descriptivo, siendo la técnica de PCR la herramienta molecular más utilizada para la identificación de HMA, la cual amplifica ADN proveniente de las raíces de las plantas hospederas, esporas o muestras de suelo (Krüger, 2009; Dorantes-Gómez, 2012).

Las secuencias amplificadas por PCR más utilizadas para estudios de HMA son las de genes de ARNr, los genes 18S, 5.8S y 28S ARNr, los cuales están separados uno de otro por un espaciador interno que se transcribe (ITS, por sus siglas en inglés). A pesar de que las regiones ITS y el gen 28S ARNr ofrecen una resolución en un nivel taxonómico más bajo que el gen 18S ARNr, no son muy utilizadas ya que las regiones ITS son demasiado variables y no hay muchas secuencias depositadas en la GenBank del gen 28S ARNr, por lo que el gen 18S ARNr representa una mejor opción y además es el más utilizado para estudios moleculares de HMA (Lumini, 2010; Van-Geel, 2014). Tomando esto como base, se han diseñado un gran número de oligonucleótidos para amplificar regiones de ARNr, varios de éstos catalogados como específicos para HMA, sin embargo, en su mayoría amplifican un número restringido de taxones o ADN de otros organismos no objetivos. Es sabido, que el par de oligonucleótidos NS31-AM1 amplifica un fragmento central del gen 18S ARNr de alrededor de 550 pb, en el que se encuentran la mayoría de taxones correspondientes a Glomeromycota (Öpik *et al.*, 2006; Janda, 2007).

En el presente trabajo de tesis, se realizó PCR anidado para amplificar un fragmento del gen 18S ARNr. En la primera ronda de PCR se utilizaron los oligonucleótidos universales para eucariontes NS1-ITS4 y en la segunda ronda los oligonucleótidos NS31-AM1 los cuales amplifican un fragmento de 550 pb dentro del gen 18S ARNr (Figura 3).

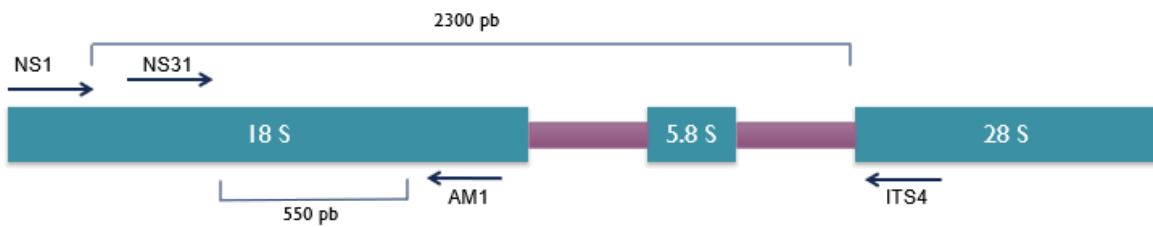


Figura 3. Posiciones aproximadas de los oligonucleótidos NS1, NS31, AM1 e ITS4 en el gen ribosomal 18S. Modificado de Van-Geel *et al.*, 2014.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Algunos microorganismos provenientes del suelo rizosférico de la Laguna Salada estudiados en anteriores trabajos de tesis de licenciatura dirigidas por investigadores del Cuerpo Académico de Biotecnología y Cuidado Ambiental (UABC-CA-234) de la Facultad de Ingeniería de la UABC, producen diferentes metabolitos de interés industrial. Sin embargo, se desconoce el género de microorganismos que habitan este ambiente extremo y que tienen dichas capacidades metabólicas. Por lo que la finalidad del presente trabajo de investigación es identificar dichos microorganismos que habitan la Laguna Salada, principalmente los de interés industrial como el caso de bacterias, además de hongos micorrizicos benéficos para el crecimiento de las plantas.

### 3. OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo General.

Identificar el género microbiano al que pertenecen los microorganismos rizosféricos aislados de la Laguna Salada.

#### 2.2 Objetivos específicos.

- ❖ Caracterizar morfológicamente los aislados microbianos rizosféricos.
- ❖ Identificar molecularmente el género al que pertenecen los aislados microbianos rizosféricos.
- ❖ Determinar el género al que pertenecen los aislados microbianos rizosféricos para establecer teóricamente su posible capacidad para potenciar el crecimiento en plantas.

#### 4. HIPOTESIS

En el ambiente extremo de la Laguna Salada habitan microorganismos rizosféricos de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como de los géneros *Glomus* y *Gigaspora*.

## 5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 5.1 Aislamiento de esporas y esporocarpos.

El aislamiento de esporas y esporocarpos de suelo rizosférico de la LS, se realizó basándose en la metodología descrita por Gerdemann y Nicholson (1963). Se suspendieron aproximadamente 200 g de suelo rizosférico en un 1 L de agua corriente y se dejó reposar por pocos segundos, con el propósito de que las partículas más pesadas sedimentaran, el líquido resultante se decantó a través de 4 tamices con número de malla 100, 140, 200 y 325 con tamaño de poro de 150  $\mu\text{m}$ , 106  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$  respectivamente, apilados de mayor a menor tamaño de poro. Este procedimiento se repitió 3 veces para cada una de las muestras de suelo rizosférico. El uso del tamiz con número de malla de 100 (tamaño de poro de 150  $\mu\text{m}$ ) se implementó para eliminar las partículas de materia orgánica más grandes, permitiendo el paso de las esporas y esporocarpos, la fracción de este tamiz fue descartada. Las fracciones retenidas en los tamices con número de malla 140, 200 y 325 (tamaño de poro de 106  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$  respectivamente) fueron lavadas con agua destilada y transferidas desde el tamiz a cajas Petri de plástico de 90x15 mm (de manera individual y por separado) con un volumen de agua destilada suficiente para cubrir las fracciones retenidas. Éstas fueron examinadas en un estereoscopio (Carl Zeiss, Stemi DV4) empleando agujas de disección para separar esporas y esporocarpos que se colectaron y depositaron, con una pipeta Pasteur, al interior de microtubos de 1.5 ml según su morfotipo para su almacenamiento a 4 °C hasta ser utilizadas en análisis posteriores.

## 5.2 Desinfestación de esporas y esporocarpos aislados de suelo rizosférico.

En condiciones de esterilidad, se desinfectaron de 50 a 150 esporas y esporocarpos (según sus dimensiones) de cada morfotipo aislado, siguiendo la metodología descrita por Sánchez-Leyva (2015). Utilizando una micropipeta se redujo en su totalidad el volumen del microtubo donde se encontraba la muestra cuidando que no se extrajeran o rompieran las esporas o esporocarpos contenidos en el microtubo. Para desinfectar, las esporas o esporocarpos se suspendieron en 20  $\mu$ L de cloramina T 2% y se dejaron reposar durante 10 minutos, se eliminó por completo la cloramina T 2% contenida en el microtubo utilizando una micropipeta. Posteriormente, las muestras se sumergieron 3 veces en 20  $\mu$ L de una solución de antibióticos compuesta por amikacina (200 mg/L) y gentamicina (100 mg/L) por 10 minutos. Se eliminó por completo el volumen del microtubo utilizando una micropipeta y se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril. Las esporas y esporocarpos desinfectados se almacenaron en microtubos de 1.5 ml a 4 °C hasta ser utilizadas en análisis posteriores.

## 5.3 Obtención de aislados bacterianos.

Se trabajó con los aislados bacterianos obtenidos en la tesis de licenciatura “Bacterias asociadas a plantas de la Laguna la Salada, Baja California y posibles aplicaciones en la industria” (Saldaña-Robles, 2016) con claves de laboratorio P.3.1 bac 2, 5.1.b.1, P.8 bac 2, 5.1.b.2.1, 5.1.b.2.2, 9.1.b.2, 6.b.4.1, 6.b.4.2, 5.b.3 y 3.b.2. Éstos se cultivaron en medio sólido R2A (Reasoner’s 2A agar) (Extracto de levadura 0.5 g/l, peptona 0.5 g/l, peptona ácida de caseína 0.5 g/l, glucosa 0.5 g/l, almidón

soluble 0.5 g/l, piruvato de sodio 0.3 g/l, fosfato dipotásico 0.3 g/l, sulfato de magnesio 0.05 g/l, agar 15 g/l) el cual se modificó agregando NaCl 12% p/p y ajustando el pH a 8.5. Los aislados bacterianos se incubaron a 35 °C de 12 a 30 horas para cada análisis.

#### 5.4 Tinción Gram.

Los aislados bacterianos se cultivaron en medio solido R2A modificado (NaCl 12%, pH 8.5) a 35 °C por 12 horas. En condiciones de esterilidad se realizaron frotis bacterianos en portaobjetos de 7.5 cm x 2.5 cm estéril, mezclando una asada del cultivo bacteriano con una gota de agua destilada estéril en el centro del portaobjetos. La muestra se fijó por calor. Una vez que se realizó el frotis de cada uno de los aislados bacterianos en portaobjetos individuales, la tinción se realizó fuera de la campana en una charola para tinción de Gram.

Se agregó una gota de colorante cristal violeta a cada muestra en el centro del portaobjetos en posición horizontal y se esperó durante 1 minuto antes de enjuagar con agua purificada, inclinando el portaobjetos para escurrir el exceso de agua. Después, se agregó 1 gota de solución de lugol en el centro del portaobjetos en posición horizontal y se esperó 1 minuto antes de enjuagar nuevamente con agua destilada, se escurrió el exceso de agua. A continuación, se agregó una gota de alcohol-acetona en el centro del portaobjetos y se dejó reposar por 30 segundos antes de enjuagar con agua destilada y eliminar el exceso de agua. Finalmente, se agregó una gota de safranina y se dejó reposar durante 45 segundos antes de enjuagar con agua purificada y dejar secar en posición inclinada.

Una vez que las muestras se secaron, se observaron en el microscopio de campo claro a 100x, cubriendo el portaobjetos con un cubreobjetos limpio y añadiendo una gota de aceite de inmersión. Se tomaron fotos de lo observado en el microscopio y se registraron resultados.

## 5.5 Extracción y purificación de ADN de esporas y esporocarpos.

Se realizaron dos métodos distintos de extracción de ADN de esporas y esporocarpos distintos con el fin de determinar con cuál de éstos se obtendrían mejores resultados.

### 5.5.1 Método A para extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó en condiciones de esterilidad utilizando las esporas previamente desinfectadas y basándose en la metodología descrita por Redecker *et al.*, (1997). Antes de comenzar la extracción de ADN, se eliminó por completo el volumen de agua contenido en el microtubo utilizando una micropipeta. Se adicionaron 16  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.25 M para triturar las esporas con una punta para micropipeta hasta que se observó un cambio de coloración y se incubó a 100 °C durante 1 minuto. Posteriormente, se adicionaron 8  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0.5 M, pH 8 y 16  $\mu\text{L}$  de HCl 0.25 M para incubar por 2 minutos a 100 °C. Se obtuvieron alrededor de 40  $\mu\text{L}$  de extracto de ADN el cual se purificó inmediatamente después de la extracción siguiendo la metodología propuesta por Solís-Domínguez *et al.*, (2011). El extracto de ADN se transfirió a un tubo Phase Lock Gel con un volumen igual de

fenol-cloroformo y se agitó suavemente 100 veces antes de centrifugar a 13 000 revoluciones por minuto (rpm) por 12 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Phase Lock Gel para mezclarse con un volumen igual de cloroformo isoamílico 24:1 y se agitó suavemente 100 veces antes de centrifugar una vez más a 13 000 rpm durante 12 minutos. El ADN purificado se almacenó a -20 °C. El extracto obtenido se utilizó directamente para PCR.

#### 5.5.2 Método B para extracción ADN.

Se extrajo ADN de esporas y esporocarpos previamente desinfectados, utilizando el kit PureLink Genomic DNA mini Kit de Thermo Fisher Scientific, haciendo modificaciones al protocolo para bacterias Gram positivas indicado por el fabricante como se describe a continuación: Se eliminó el volumen de agua contenido en el microtubo utilizando una micropipeta para después sumergirlo en nitrógeno líquido. Utilizando una punta para micropipeta previamente sellada de la punta, se trituraron las esporas y esporocarpos. Se agregaron 20 µL de Proteinasa K y 200 µL de buffer de lisis-unión, se mezcló bien utilizando vortex. Se incubó a 55 °C por 30 minutos y se agregaron 200 µL de etanol (96-100%) y se mezcló nuevamente utilizando el vortex. El contenido del microtubo fue transferido a una columna PureLink spin colocada en un tubo colector y se centrifugó a 11 600 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. La columna fue colocada en un nuevo tubo colector y se añadieron 500 µL de buffer W1 y se centrifugó a 11 600 rpm por 1 minuto. El líquido contenido en el tubo colector se descartó y se añadieron 500 µL de buffer W2 en la columna para centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos. El

líquido contenido en la columna se descartó una vez más. La columna se colocó en un microtubo de 1.5 ml nuevo, se agregaron 25 µL de buffer de elusión en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Para eluir, se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto. El extracto obtenido se utilizó directamente para PCR.

### 5.5.3 Extracción de ADN bacteriano.

Previo a la extracción de ADN se cultivaron los aislados bacterianos en 3 ml de medio R2B modificado (NaCl 12%, pH 8.5) a 35 °C con agitación oscilatoria de 120 rpm durante 12 horas. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit PureLink Genomic DNA Mini Kit realizando modificaciones al protocolo propuesto por el fabricante para bacterias Gram positivas y Gram negativas, como se describe a continuación:

#### 5.5.3.1 Pretratamiento para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se tomaron alícuotas de 1.5 ml de los aislados microbianos Gram positivos y se traspasaron a microtubos nuevos y estériles de 1.5 ml, y se centrifugaron a 8 000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desechó y se repitió esta operación hasta obtener un paquete celular. Los paquetes celulares se resuspendieron en 180 µL de buffer de lisis (Tris-Cl 20 mM, pH 8.0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1.2%) y se sonicaron (sonicador de cubeta VWR Symphony) por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto, se agregaron 20 µL de Proteinasa K y 200 µL de buffer de lisis/ unión, lo cual se mezcló bien utilizando vortex. Se incubó a 55 °C por 30

minutos; se agregaron 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) y se mezcló nuevamente utilizando el vortex. Posteriormente, se siguió con el protocolo de extracción de ADN descrito a continuación:

Después del protocolo de pretratamiento para bacterias Gram positivas y Gram negativas, se siguió con el protocolo de extracción propuesto por el fabricante como se describe a continuación: el contenido del microtubo fue transferido a una columna PureLink spin colocada en un tubo colector y se centrifugó a 11 600 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. La columna fue colocada en un nuevo tubo colector y se añadieron 500  $\mu$ L de buffer W1 y se centrifugó a 11 600 rpm por 1 minuto. El líquido contenido en el tubo colector se descartó y se añadieron 500  $\mu$ L de buffer W2 en la columna para centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos. El líquido contenido en la columna se descartó una vez más. La columna se colocó en un microtubo de 1.5 ml nuevo, se agregaron 25  $\mu$ L de buffer de elusión en el centro de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. Para eluir, se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto. El extracto obtenido se utilizó directamente para PCR.

#### 5.6 Amplificación de ADN de esporas y esporocarpos por PCR anidado.

Se realizó PCR anidado para la ampliación de un fragmento del gen de la subunidad ribosomal 18S. Para la primera ronda de PCR se utilizaron los oligonucleótidos universales para eucariontes ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') y NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') (White *et al.*, 1990). Cada reacción de 10  $\mu$ L contenía 0.2  $\mu$ L de cada

oligonucleótido, 2  $\mu$ L de PCR Master Mix (5x) de Gene and Cell Technologies, 7.1  $\mu$ L de agua grado molecular y 0.5  $\mu$ L de templado. El protocolo de amplificación que se utilizó fue el siguiente: 95 °C por 30 s, seguido de 30 ciclos de (95 °C por 30 s, 55 °C por 40 s, 68 °C por 2 min + 5 s por ciclo), seguido de una extensión a 68 °C por 7 minutos. Para la segunda ronda de PCR se utilizó el oligonucleótido específico para hongos AM1 (5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3') y el oligonucleótido universal para eucariontes NS31 (5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') (Helgason *et al.*, 1998). Cada reacción de 10  $\mu$ L contenía 0.2  $\mu$ L de cada oligonucleótido, 2  $\mu$ L de PCR Master Mix (5x) de Gene and Cell Technologies, 7.1  $\mu$ L de agua grado molecular y 0.5  $\mu$ L de templado. El protocolo de amplificación que se utilizó fue el siguiente: 95 °C por 30 s, seguido de 30 ciclos de (95 °C por 30 s, 55 °C por 40 s, 68 °C por 2 minutos + 5 s por ciclo), seguido de una extensión a 68 °C por 7 minutos.

#### 5.7 Electroforesis en gel de agarosa.

Con el propósito de comprobar que el proceso de extracción y amplificación de ADN fue exitoso, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se prepararon 50 ml de gel de agarosa al 1% agregando 0.5 g de agarosa en 50 ml de buffer TBE 0.5x (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M) y se calentó con agitación hasta la ebullición en un matraz Erlenmeyer de 125 ml. Una vez que la agarosa se disolvió por completo se dejó enfriar con agitación sin que ésta solidificara, posteriormente, se vació en un portateles con un peine para 15 pocillos y se dejó a temperatura ambiente en una superficie nivelada hasta que solidificó. El

gel se sumergió en buffer TBE 0.5x dentro de la cámara de electroforesis, se retiró el peine y se cargaron 3 µl de cada de producto de PCR con 1 µl de buffer de carga 6x (ThermoScientific) en cada pocillo. Utilizando una fuente de voltaje (PowerPac, Biorad) se corrió la electroforesis a 100 V por 45 minutos, al finalizar se retiró el gel de la cámara para teñirse con bromuro de etidio durante 3 minutos y se lavó durante 15 minutos en agua destilada. Se tomó y almacenó la imagen de corrimiento electroforético, tanto de ADN como de producto de PCR, en un fotodocumentador (ChemiDoc MP, Biorad).

#### 5.8 Purificación de productos de PCR.

Para la purificación de productos de PCR, se utilizó el kit PureLink Quick Gel Extraction de ThermoScientific, siguiendo el protocolo de purificación de ADN utilizando centrifuga, descrito por el fabricante.

Previamente, se cargaron 50 µL de cada producto de PCR con 3 µL de buffer de carga 6x (ThermoScientific) en un gel de agarosa al 1% para correr una electroforesis durante 60 minutos con un voltaje de 100 V. Al pasar este tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio por 3 minutos y se enjuagó en agua destilada por 15 minutos. El gel se colocó en un transiluminador (UVP, VWR) y utilizando un bisturí estéril se cortó la banda de interés, producto de la amplificación, con la mínima cantidad de agarosa y se depositó en un microtubo de 1.5 ml estéril. Se agregaron 1.2 ml de buffer L3 por cada 400 mg de gel, después, se incubó a 55 °C por 10 minutos, invirtiendo el tubo para mezclar cada 3 minutos. Una vez disuelto el gel, se transfirió el volumen contenido en el microtubo de 1.5 ml a una columna colocada

en un tubo colector y se centrifugó a 11 300 rpm. El líquido contenido en tubo colector se descartó y se agregaron 500  $\mu$ L del buffer W1 (Wash buffer) y se centrifugó a 11 300 rpm. El líquido contenido en el tubo colector se descartó y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 minuto. La columna se colocó en un microtubo estéril de 1.5 ml, se agregaron 25  $\mu$ L de agua grado molecular en centro de la membrana de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto, para después centrifugar a 11 300 rpm durante 1 minuto. El ADN purificado se almacenó a -20 °C para su posterior utilización.

#### 5.9 Determinación de la concentración e índice de pureza de ADN.

Para determinar la concentración e índice de pureza de los productos de PCR de cada muestra de ADN purificado anteriormente, se utilizó un espectrofotómetro tipo NanoDrop 2 000 de ThermoScientific siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### 5.10 Análisis de secuencias.

Los productos de PCR que cumplieron con los niveles de pureza y concentración requeridos fueron enviados para su secuenciación al Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó utilizando el portal del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), consultando su base de datos GeneBank.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Morfología de aislados bacterianos.

Se realizó tinción de Gram a cada uno de los aislados bacterianos utilizados en el presente trabajo de investigación, los resultados de la tinción, así como algunos aspectos de la caracterización morfológica de las bacterias se muestran en la Tabla 1.

*Tabla 1. Características macroscópicas y microscópica de aislados bacterianos.*

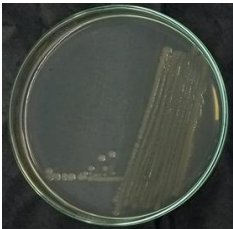

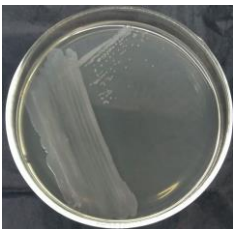
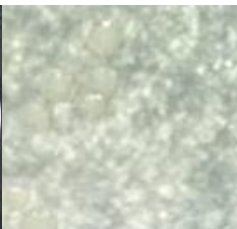
Código	Morfología colonial	Tinción Gram	Descripción
P.3.1 bac 2			<p><b>Morfología macroscópica:</b> Colonias con aspecto húmedo, luz reflejada brillante, color amarillo, forma circular, elevación convexa y margen entero.</p> <p><b>Morfología microscópica:</b> Estreptobacilos</p> <p><b>Tinción de Gram:</b> Gram negativo</p>
5.1.b.1			<p><b>Morfología macroscópica:</b> Colonias con aspecto húmedo, luz reflejada brillante, color blanco, forma circular, elevación convexa y margen entero.</p> <p><b>Morfología microscópica:</b> Bacilos</p> <p><b>Tinción de Gram:</b> Gram positivo</p>

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópica de aislados bacterianos (Continuación).




<p>P.8.1 bac 2</p>		<p><b>Morfología macroscópica:</b> Colonias con aspecto húmedo, luz reflejada brillante, color amarillo, forma irregular, elevación convexa y margen entero.</p> <p><b>Morfología microscópica:</b> Bacilos</p> <p><b>Tinción de Gram:</b> Gram negativo</p>
<p>5.1 b.2.1</p>		<p><b>Morfología macroscópica:</b> Colonias con aspecto húmedo, color amarillo claro translucido, luz reflejada brillante, forma circular, elevación plana y margen entero.</p> <p><b>Morfología microscópica:</b> Bacilos</p> <p><b>Tinción de Gram:</b> Gram negativo</p>
<p>5.1 b.2.2</p>		<p><b>Morfología macroscópica:</b> Colonias con aspecto húmedo, color amarillo claro translucido, luz reflejada brillante, forma circular, elevación plana y margen entero.</p> <p><b>Morfología microscópica:</b> Bacilos</p> <p><b>Tinción de Gram:</b> Gram negativo</p>

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópica de aislados bacterianos (Continuación).

9.1.b.1



**Morfología macroscópica:**  
Colonias con aspecto húmedo, color blanco, luz reflejada brillante, forma circular, elevación plana y margen entero.

**Morfología microscópica:**  
Bacilos

**Tinción de Gram:**  
Gram positivo.

6.b.4.1



**Morfología macroscópica:**  
Colonias con aspecto húmedo, color amarillo claro, luz reflejada brillante, forma circular, elevación elevada y margen entero.

**Morfología microscópica:**  
Bacilos

**Tinción de Gram:**  
Gram negativo

6.b.4.2



**Morfología macroscópica:**  
Colonias con aspecto húmedo, color amarillo claro translucido, luz reflejada brillante, forma circular, elevación plana y margen entero.

**Morfología microscópica:**  
Bacilos

**Tinción de Gram:**  
Gram negativo

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópica de aislados bacterianos  
(Continuación).

5.b.3



**Morfología**

**macroscópica:**

Colonias con aspecto húmedo, color amarillo, luz reflejada brillante, forma circular, elevación convexa y margen entero.

**Morfología**

**microscópica:**

Bacilos (empalizada)

**Tinción de Gram:**

Gram positivo

5.b.3.2



**Morfología**

**macroscópica:**

Colonias con aspecto húmedo, color blanco, luz reflejada brillante, forma circular, elevación convexa y margen entero.

**Morfología**

**microscópica:**

Bacilos

**Tinción de Gram:**

Gram positivo

3.b.2



**Morfología**

**macroscópica:**

Colonias con aspecto húmedo, color amarillo, luz reflejada brillante, forma circular, elevación convexa y margen entero.

**Morfología**

**microscópica:**

Bacilos

**Tinción de Gram:**

Gram negativo

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópica de aislados bacterianos (Continuación).

1.3.b.5



**Morfología macroscópica:**

Colonias con aspecto seco, color amarillo, luz reflejada mate, forma circular, elevación convexa y margen rizado.

**Morfología microscópica:**

Actinomiceto

**Tinción de Gram:**

Gram positivo

Las imágenes presentadas en la Tabla 1 corresponden (de izquierda a derecha) a los cultivos por estría cruzada de los aislados bacterianos, morfología colonial en medio de cultivo R2A observada al estereomicroscopio a 32x, y morfología celular y tinción Gram observadas al microscopio con el objetivo 100x de las laminillas de cada cultivo.

En la Tabla 1, puede observarse que todos los aislados bacterianos son bacilos, a excepción del aislado 1.3.b.5, que es filamentosa y Gram positiva, lo cual es característico de los actinomicetos (Madigan *et al.*, 2015). Los aislados 9.3.1 bac 2, P.8.1 bac 2, 5.1.b.2.1, 5.1.b.2.2, 6.b.4.1, 6.b.4.2, y 3.b.2 fueron negativos a la tinción diferencial de Gram, y los aislados bacterianos 5.1.b.1, 9.1.b.1, 5.b.3 y 1.3.b.5 fueron Gram positivos. Las imágenes de la morfología colonial corresponden a cultivos, de los distintos aislados crecidos sobre medio R2A modificado con NaCl 12 % p/p, pH 8.5, incubadas a 35 °C por 32 horas.

## 6.2 Morfología de esporas y esporocarpos.

Este trabajo de tesis complementa los hallazgos reportados por Sánchez-Leyva del 2016 en su tesis de licenciatura "Hongos micorrízicos arbusculares asociados a

plantas de la Laguna Salda, Baja California” donde se describen los morfotipos SMT1, SMT2, SMT3, SMT7, ScMT1, ScMT2 y ScMT9.

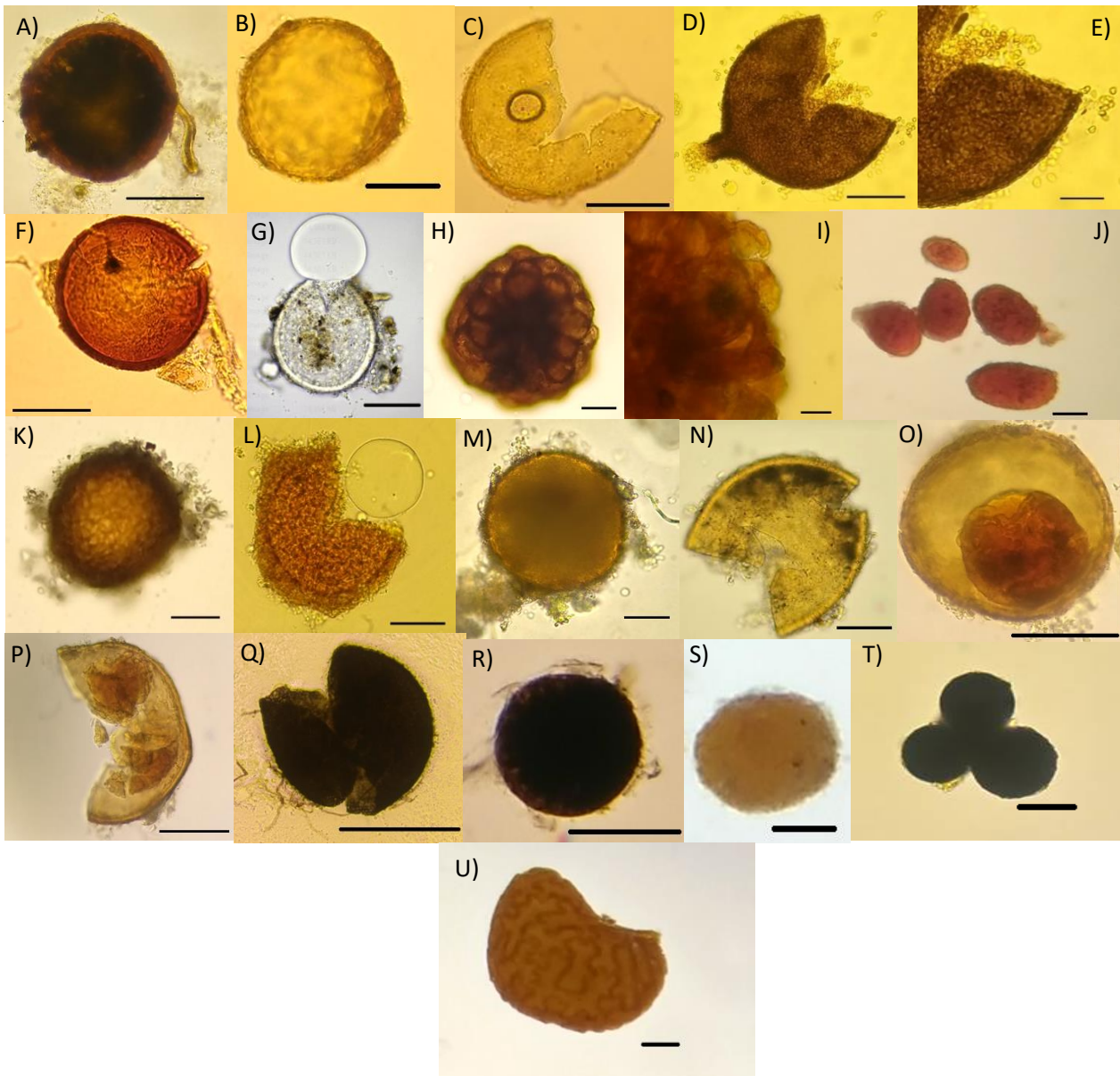


Figura 4. Morfotipos de esporas obtenidas de muestras de suelo rizosférico. A), B), C) **SMT1**. D), E) **SMT2**. F) **SMT3**. G) **LAOD1**. J) **ScMT7**. K), L) **LAOD2**. M), N) **LAOD3**. O), P). **LAOD4**. Q), R) **SMT7** (Barra de escala = 50  $\mu$ m) I) **ScMT2**, T) **ScMT9** (Barra de escala = 20  $\mu$ m) H) **ScMT2**. S) **ScMT1**, U) **LAODP1** (Barra de escala = 100  $\mu$ m).

Sánchez-Leyva describe al morfotipo SMT1 como espora con coloración amarilla (0/10/60/0, según la tabla de colores del INVAM) y un tamaño de 120  $\mu\text{m}$  a 180  $\mu\text{m}$  con un promedio de 141.25  $\mu\text{m}$ , sin embargo en este trabajo (Figura 4) se encontraron esporas con una coloración marrón (40/60/100/10, según la tabla de colores del INVAM); SMT2 presenta una coloración marrón muy oscura, negra en luz superficial (no se distingue en tabla de colores del INVAM), con esporas internas color naranja (0/60/100/0), con un tamaño de 70-193.93  $\mu\text{m}$  con un promedio de 119.18  $\mu\text{m}$ ; SMT7 presenta una coloración marrón muy oscura, negra en luz superficial (no se distingue en tabla de colores del INVAM), con un tamaño de 132.5-192.52  $\mu\text{m}$  con un promedio de 165.67  $\mu\text{m}$ ; SMT3 presenta una coloración ámbar (20/40/60/0) con un tamaño de 70-110  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 92  $\mu\text{m}$ ; ScMT1 presenta una coloración amarilla-ámbar (0/40/100/0), con un tamaño de 150-300  $\mu\text{m}$  con un promedio de 240  $\mu\text{m}$  (Sánchez-Leyva, 2016); ScMT2 presenta una coloración amarillo a ámbar (0/40/80/0) con un tamaño de racimo de 450-410  $\mu\text{m}$ , esporas internas de 60-100  $\mu\text{m}$  con un promedio de 80  $\mu\text{m}$ ; ScMT7, con coloraciones desde amarillo (0/20/100/0), naranja (0/60/100/0) hasta negro, con un tamaño de 53-107.83  $\mu\text{m}$  de largo (promedio 76.63) y 34.07-81.13  $\mu\text{m}$  de ancho (promedio 53.76). Y ScMT9, presenta una coloración negra en luz superficial, con un tamaño de 50-71  $\mu\text{m}$  con un promedio de 52.4  $\mu\text{m}$ . En la presente investigación se observaron esos morfotipos de esporas y esporocarpos con algunas características diferentes, como tamaño y coloración para el caso de ScMT7 y SMT2 (Figura 4). Adicionalmente, en suelo rizosférico se aislaron algunas esporas correspondientes al género *Prosopis* (LAOD1, LAOD2, LAOD4), *Haplopapus* (LAOD4, LAOD1) y a *Suaeda divaricata* (LAOD3).

En este trabajo no se utilizaron los morfotipos SMT5 y SMT9 ya que SMT5 no se encontró en las muestras de suelo rizosférico, y debido a que SMT9 y ScMT7 comparten las mismas características morfológicas a excepción de la coloración, se consideró que son el mismo morfotipo.

LAOD1 presenta una coloración gris muy clara y opaca, con un tamaño de 81.20-92.43  $\mu\text{m}$ , con promedio de 87.3  $\mu\text{m}$ ; LAOD2 presenta un color marrón (60/80/100/0) con un tamaño de 113.14-202.06  $\mu\text{m}$  con promedio de 105.25  $\mu\text{m}$ ; LAOD3 presenta una coloración amarilla muy opaca (0/10/100/10) con un tamaño de 119.15-137.01  $\mu\text{m}$ , con promedio de 130.06; y LAOD4 presenta colores que van desde amarillo (0/10/80/0) a naranja (0/30/70/10) y un interior naranja brillante (0/60/100/0), con tamaños de 122.62-142.1  $\mu\text{m}$ , con promedio de 144.52  $\mu\text{m}$ .

Dado que los hongos endófitos, a diferencia de las micorrizas que están restringidas a las raíces, colonizan todo tipo de tejido vegetal incluyendo semillas (Maldonado-Ramírez, 2018), se analizó una semilla proveniente del suelo rizosférico bajo estudio probablemente perteneciente al género y especie *Papaver rhoeas* L. (Figura 5). Algunas de sus características son las siguientes: 700  $\mu\text{m}$  de largo y 500  $\mu\text{m}$  de ancho, con una coloración amarillenta-naranja, reniformes y reticuladas.



Figura 5. Plántula de *Papaver rhoeas* L.

### 6.3 Comparación de métodos de extracción de ADN de esporas y esporocarpos.

Se realizó extracción de ADN de 50 esporas con un tamaño entre 100 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro y para los morfotipos con un tamaño de 60 a 90  $\mu\text{m}$  se realizó extracción de ADN de aproximadamente 50 a 100 esporas. Para comprobar si se realizó una extracción de ADN exitosa y si se utilizó un programa de PCR óptimo, para ambos métodos de extracción de ADN, fue necesario hacer electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR anidado (Tabla 2), que amplificó un fragmento del gen ribosomal 18S de 550 pb utilizando el par de oligonucleótidos NS1-ITS4 para la primera ronda de PCR y el par de oligonucleótidos NS31-AM1 para la segunda ronda de PCR.

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados.

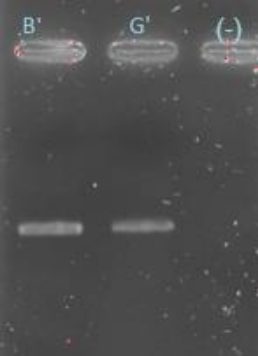
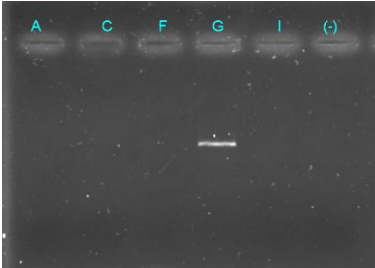
Imagen de gel de agarosa al 1%	Método de extracción de ADN	Programa de PCR primario	Programa de PCR secundario	Morfortipos para los cuales se observó amplificación de ADN
	Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	SMT2, ScMT1
	Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	ScMT2

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S de los morfotipos SMT2 y ScMT1. B: SMT2, G: ScMT1 y (-): control negativo

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S del morfotipo ScMT1. A:SMT1, C:SMT3, F:SMT7, G: ScMT1, I: ScMT7 y (-): control negativo.

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados (Continuación).

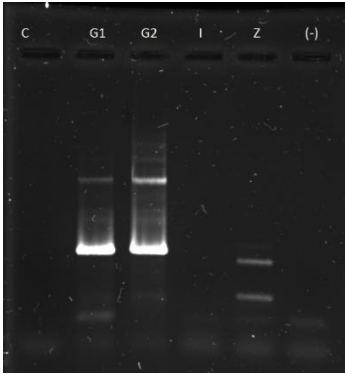
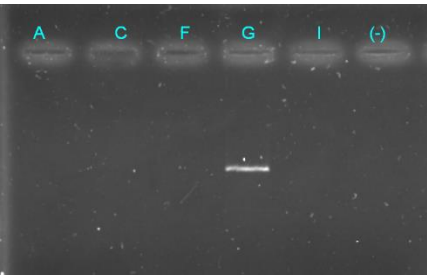
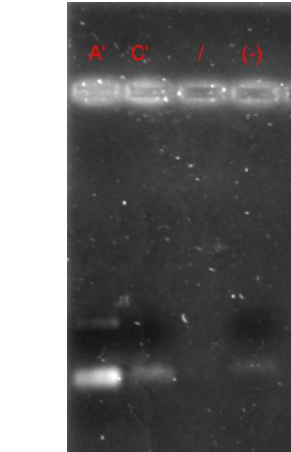
	Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	ScMT1 y LAODP1
<p>Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. C:SMT3,G: ScMT1, I: ScMT7, Z:LAODP1 y (-): control negativo.</p>	Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	ScMT1
	Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	SMT1
<p>Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. A:SMT1, C:SMT3, F:SMT7, G: ScMT1, I: ScMT7, y (-): control negativo.</p>		<p>Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. A:SMT1, C:SMT3 y (-): control negativo.</p>		

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados (Continuación).

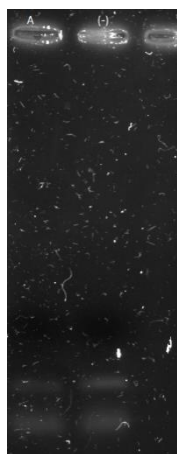


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1%. A:SMT1 y (-): control negativo.

Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	-
----------	---	---	---

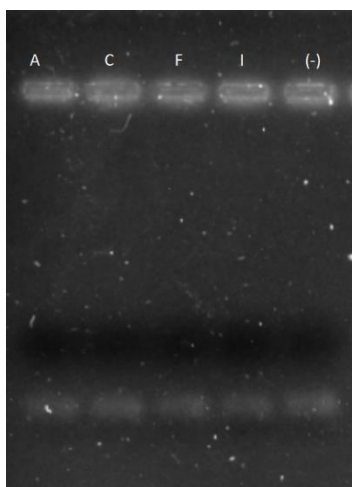


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 1%. A:SMT1, C:SMT3, F:SMT7, G: ScMT1, I: ScMT7, y (-): control negativo.

Método A	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 61°C por 60s, 68°C por 50s + s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 5 minutos.	-
----------	---	---	---

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados (Continuación).

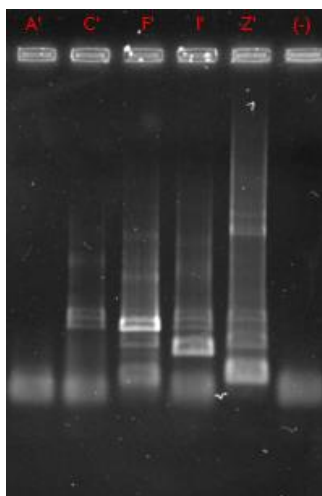


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de pb del gen ribosomal 18S. A:SMT1, C:SMT3, F:SMT7, I: ScMT7, Z:LAODP1 y (-): control negativo.

Método B	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 9 minutos seguido de 10 ciclos de (95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto) seguido de 25 ciclos de (95°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos) para finalizar con 72°C por 10 minutos.	SMT3, SMT7, ScMT7 y LAODP1
----------	---	--	-------------------------------------

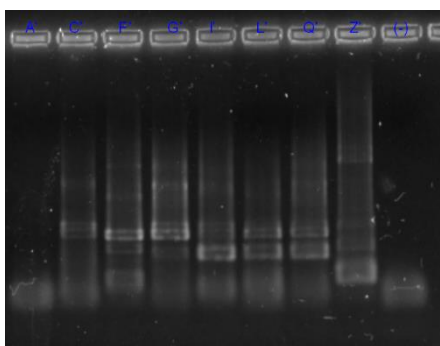


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. A:SMT1, C:SMT3, F:SMT7,G:ScMT1, I: ScMT7, L: LAOD3, Q:LAOD1, Z:LAODP1 y (-):

Método B	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 9 minutos seguido de 10 ciclos de (95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto) seguido de 25 ciclos de (95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto y 72°C por 2 minutos) para finalizar con 72°C por 10 minutos.	SMT3, SMT7, ScMT1, ScMT7, LAOD3, LAOD1 y LAODP1.
----------	---	--	--

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados (Continuación).

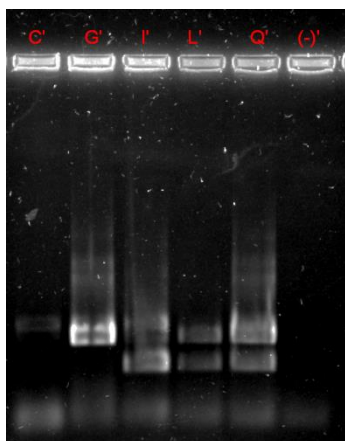


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. C:SMT3 ,G:ScMT1, I: ScMT7, L: LAOD3, Q:LAOD1, y (-): control negativo.

Método B	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30 s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30 s, 62°C por 40s, 72°C por 50s + 1s por ciclo), seguido de una extensión de 72°C por 5 minutos.	ScMT1, ScMT7, LAOD3, LAOD1.
----------	---	--	-----------------------------

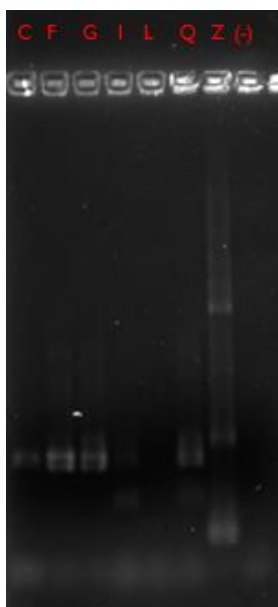


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. C:SMT3, F: SMT7, G:ScMT1, I: ScMT7, L: LAOD3, Q:LAOD1, Z:LAODP1 y (-): control negativo.

Método B.	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	94°C por 1 minuto, 66°C por un minuto, 72°C por 1.5 minuto, seguido de 30 ciclos de (94°C por 30 s, 66°C por 60s, 72°C por 90s), seguido de una extensión de 72°C por 10 minutos.	SMT3, SMT7, ScMT1, ScMT7, LAOD1 y LAODP1
-----------	---	---	--

Tabla 2. Geles de agarosa al 1%, métodos de extracción empleados y diferentes programas de PCR utilizados (Continuación).

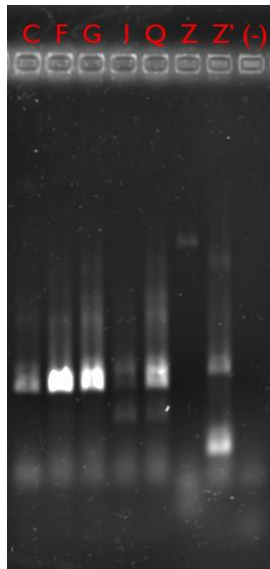


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento de 550 pb del gen ribosomal 18S. C:SMT3, F: SMT7, G:ScMT1, I: ScMT7, Q:LAOD1, Z:LAOP1 (primera ronda de PCR), Z':LAODP1 (segunda ronda de PCR) y (-): control

Método B	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos.	95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 62.5°C por 40s, 72°C por 50s + 1s por ciclo), seguido de una extensión a 72°C por 5 minutos.	SMT3, SMT7, ScMT1, ScMT7, LAOD1, LAODP1 (primera ronda de PCR) y LAODP1 (segunda ronda de PCR)
----------	---	---	--

El método B de extracción de ADN mostró mejores resultados que el método A. Se mostraron resultados óptimos utilizando el “Método B, para extracción de ADN”, por lo que se optó por usar dicho método. El programa de PCR primario utilizado durante todo el proyecto fue el siguiente: 95°C por 30s, seguido de 30 ciclos de (95°C por 30s, 55°C por 40s, 68°C por 2 minutos + 5s por ciclo), seguido de una extensión a 68°C por 7 minutos. Después de realizar PCR secundario, utilizando diferentes programas de PCR, se observó que la mejor opción de programa fue: 95 °C por 30 s seguido de (95 °C por 30 s, 62. °C por 40 s, 72 °C por 50 s + 1 s por ciclo), seguido de una extensión a 72 °C por 5 minutos, debido a que dichas condiciones de reacción fueron más astringentes.

## 6.4 Extracción de ADN bacteriano.

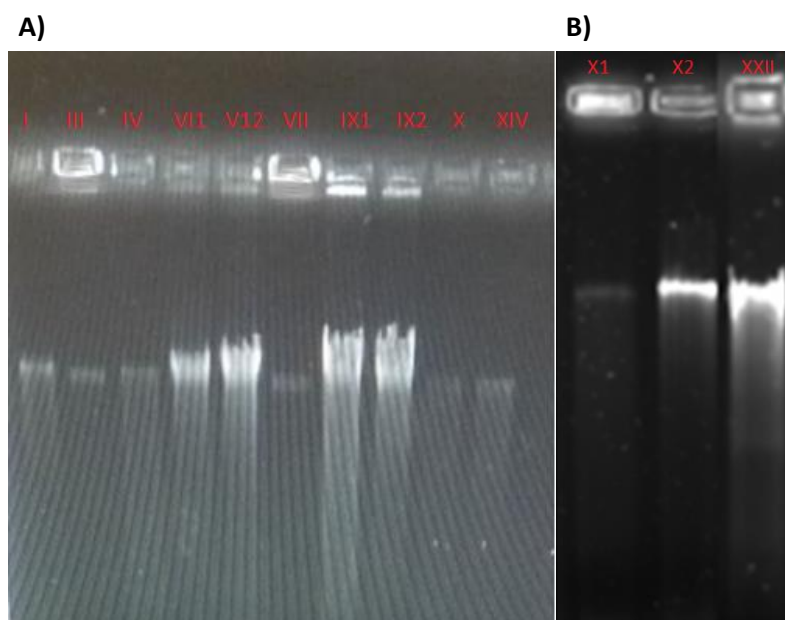


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de ADN extraídas de A): P.3.1 bac 2 (I), 5.1.b.1 (III), P.8.1 bac 2 (IV), 5.1.b.2.1(IV.1), 5.1.b.2.2(IV.2), 9.1.b.1(VII), 6.b.4.1 (IX.1), 6.b.4.2(IX.2), 5.b.3(X), 3.b.2(XIV) y B): 5.b.3.1(X1), 5.b.3.2(X2) y 1.3.b.5

Se obtuvo ADN de los aislados microbianos utilizando el kit PureLink Genomic DNA Mini Kit. Se consideró de buena calidad para seguir con las reacciones de PCR siguientes.

## 6.5 Reacción en cadena de la polimerasa.

6.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa de ADN extraído de esporas y esporocarpos.

Las muestras de ADN esporas y esporocarpos, se emplearon como templado para la amplificación de ADN por PCR anidado.

Se utilizaron los oligonucleótidos AM1 y NS31 para la segunda ronda de PCR, esperando obtener una sola banda de aproximadamente 550 pb.

En la figura 19 A se observan los productos de PCR amplificados de las muestras de ADN de SMT7 (F), ScMT1 (G), SMT3 (C), ScMT7 (I), LAOD1 (Q) y LAODP1 (Z). y en la figura 19 B, se observan los productos de PCR anidado, amplificados de las muestras de ADN de SMT2 (B) y ScMT1 (G).

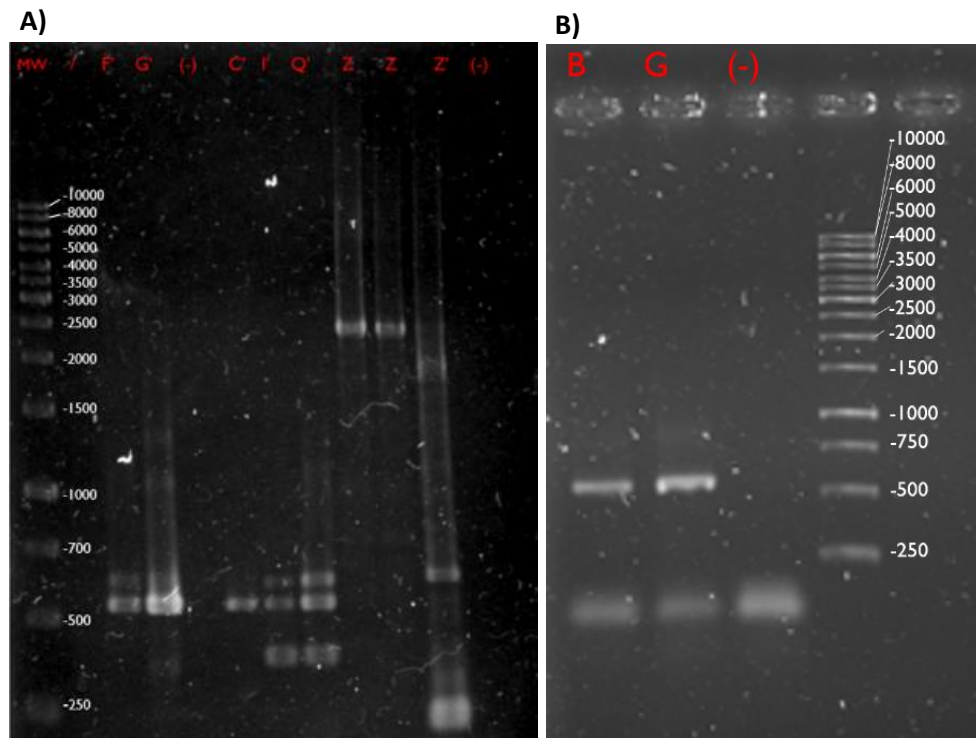


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa 1% de un fragmento del gen ribosomal 18S A): SMT7 (F), ScMT1 (G), SMT3 (C), ScMT7 (I), LAOD1 (Q), LAODP1 (Z) y (-): control negativo; B: SMT2 (B) y ScMT1 (G); (-): control negativo.

### 6.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa de ADN bacteriano.

Las muestras de ADN de los aislados bacterianos mencionados en el apartado 5, se emplearon como templado para la amplificación de ADN por PCR.

Se utilizaron los oligonucleótidos universales 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y 1492R (5' TACGGTTACCTTGTTACGACTT 3') y se obtuvo una sola banda de aproximadamente 1500 pb.

En la Figura 20 se observan los productos de PCR amplificados a partir del ADN de P.3.1 bac 2 (I), 5.1.b.1 (III), P.8.1 bac 2 (IV), 5.1.b.2.1(IV.1), 5.1.b.2.2(IV.2), 9.1.b.1(VII), 6.b.4.1 (IX.1), 6.b.4.2(IX.2), 5.b.3.2(X2), 3.b.2(XIV) y 1.3.b.2 (XXII). No se obtuvo amplificación de la muestra de ADN del aislado bacteriano 5.b.3.1 (X1).

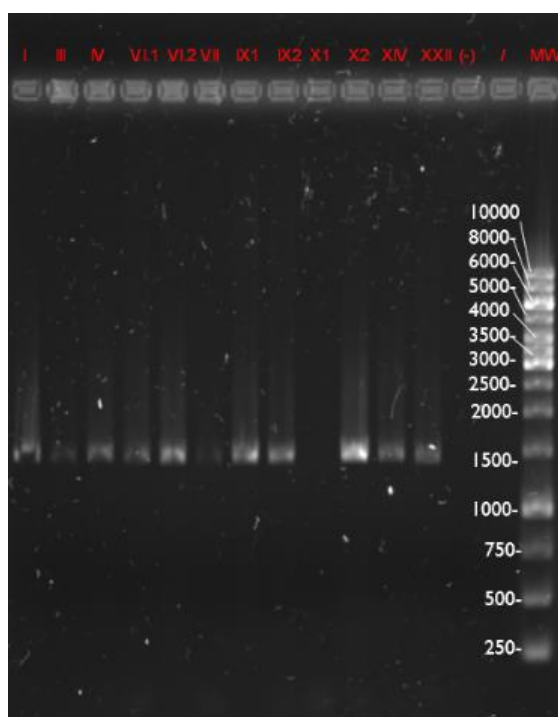


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de ADN extraídas de P.3.1 bac 2 (I), 5.1.b.1 (III), P.8.1 bac 2 (IV), 5.1.b.2.1(IV.1), 5.1.b.2.2(IV.2), 9.1.b.1(VII), 6.b.4.1 (IX.1), 6.b.4.2(IX.2), 5.b.3.1 (X.1) 5.b.3.2 (X.2) , 3.b.2(XIV), 1.3.b.2 (XXII), control negativo (-) y marcador de peso molecular (MW).

## 6.6 Análisis de ADN.

Los productos de PCR purificados utilizando el kit PureLink Quick Gel Extraction de ThermoScientific, se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop 2 000 (ThermoScientific) y se determinó el índice de pureza con base a la relación de absorbancia 260/280. En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos de los parámetros (concentración y pureza) del ADN extraído de bacterias, esporas y esporocarpos.

*Tabla 3. Concentraciones e índices de pureza de las muestras de ADN.*

<b>ADN de esporas y esporocarpos</b>		
Morfotipo	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Índice de Pureza. A(260/280)
SMT1	29.1	1.90
SMT7	61.7	1.88
ScMT1	23.2	1.90
<b>ADN bacteriano</b>		
Código	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Índice de Pureza. A (260/280)
P.3.1 bac 2	23.0	1.74
P.8.1 bac 2	18.6	1.78
5.1. b.1.2	29.0	1.77
5.1. b.2.2	24.9	1.81
6.b.4.1	31.8	1.76
6.b.4.1	38.0	1.78
5.b.3.2	40.2	1.90
3.b.2	10.5	1.78
1.3.b.2	15.7	2.05

Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron y editaron con el programa Chromas Lite 2.1.1 y las secuencias fueron comparadas en la base de datos GeneBank del NCBI. En la Tabla 4 se muestra el resumen de los resultados en el NCBI al ingresar las secuencias de aproximadamente 1500 pb obtenidas del gen ribosomal 16S ADN amplificada con los oligonucleotidos 27F y 1492R (para el caso de las bacterias) y secuencias de aproximadamente 550 pb obtenidas del gen ribosomal 18S ADN amplificada con los oligonucleotidos NS31 y AM1 (para el caso de los hongos).

Tabla 4. Identificación de secuencias del gen ribosomal 16S (~1500 pb) para bacterias y del gen ribosomal 18S (~550 pb) para hongos según la base de datos del NCBI.

<b>Bacteria</b>	<b>Oligo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Score</b>	<b>Query</b>	<b>%Error</b>	<b>%ID*</b>
P.3.1 bac 2	27F	<i>Bacillus sp.</i>	1557	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus simplex</i>	1557	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus muralis</i>	1559	100%	0.0	99%
1492R	1492R	<i>Bacillus sp.</i>	1665	100%	0.0	100%
		<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	1665	100%	0.0	100%
		<i>Bacillus muralis</i>	1665	100%	0.0	100%
Secuencia completa	Secuencia completa	<i>Bacillus sp.</i>	2586	100%	0.0	99%
		<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	2586	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus simplex</i>	2586	100%	0.0	99%

\*%ID: porcentaje de identidad

Tabla 4. Identificación de secuencias del gen ribosomal 16S (~1500 pb) para bacterias y del gen ribosomal 18S (~550 pb) para hongos según la base de datos del NCBI (Continuación).

<b>P.8.1 bac 2</b>	27F	<i>Bacillus megaterium</i>	1543	100%	0.0	99%	
		<i>Bacillus aryabhatai</i>	19937	100%	0.0	99%	
	1492R	<i>Bacillus megaterium</i>	1615	100%	0.0	100%	
		<i>Bacillus aryabhatai</i>	1615	100%	0.0	100%	
	Secuencia completa	<i>Bacillus megaterium</i>	2623	100%	0.0	100%	
		<i>Bacillus sp.</i>	2623	100%	0.0	100%	
<i>Bacillus aryabhatai</i>		2623	100	0.0	100%		
<b>5.1.b.2.1</b>	27F	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1360	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas sp.</i>	1360	100%	0.0	99%	
	1492R	<i>Pseudomonas sp.</i>	1400	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1389	100%	0.0	99%	
	Secuencia completa	<i>Pseudomonas sp.</i>	2490	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2490	100%	0.0	99%	
<b>5.1.b.2.2</b>	27F	<i>Pseudomona rhizosphaerae</i>	710	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomona sp.</i>	706	100%	0.0	99%	
	1492R	<i>Pseudomonas sp.</i>	1461	99%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1452	99%	0.0	99%	
	<b>6.b.4.1</b>	27F	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	963	100%	0.0	99%
			<i>Pseudomonas sp.</i>	965	100%	0.0	99%
1492R		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1616	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas sp.</i>	1616	100%	0.0	99%	
Secuencia completa		<i>Pseudomonas sp.</i>	2494	100%	0.0	99%	
		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2501	100%	0.0	99%	

Tabla 4. Identificación de secuencias del gen ribosomal 16S (~1500 pb) para bacterias y del gen ribosomal 18S (~550 pb) para hongos según la base de datos del NCBI (Continuación).

<b>6.b.4.2</b>	27F	<i>Pseudomonas sp.</i>	848	100%	0.0	99%
	1492R	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1585	100%	0.0	99%
		<i>Pseudomonas sp.</i>	1585	100%	0.0	99%
<b>5.b.3.2</b>	27F	<i>Bacillus cereus.</i>	1624	100%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus anthracis</i>	1489	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus cereus</i>	1489	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus sp.</i>	1489	100%	0.0	99%
	Secuencia completa	<i>Bacillus sp.</i>	2529	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus cereus</i>	2529	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus anthracis</i>	2529	100%	0.0	99%
<b>3.b.2</b>	27F	<i>Bacillus megatirium</i>	974	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus sp.</i>	974	100%	0.0	99%
	1492R	<i>Bacillus megatirium</i>	1648	100%	0.0	99%
		<i>Bacillus sp.</i>	1646	100%	0.0	99%
	<b>1.3.b.5</b>	27F	<i>Streptomyces sp.</i>	1622	100%	0.0
<i>Streptomyces lavendulocolor</i>			1600	100%	0.0	99%
<i>Streptomyces roseolilacinus</i>			1600	100%	0.0	99%
1492R		<i>Streptomyces sp.</i>	1698	100%	0.0	99%
		<i>Streptomyces roseolilacinus</i>	1698	100%	0.0	99%
		<i>Streptomyces lavendulocolor</i>	1698	100%	0.0	99%
Secuencia completa		<i>Streptomyces sp.</i>	2529	100%	0.0	99%
		<i>Streptomyces lavendulocolor</i>	2529	100%	0.0	99%
		<i>Streptomyces roseolilacinus</i>	2529	100%	0.0	99%

Tabla 4. Identificación de secuencias del gen ribosomal 16S (~1500 pb) para bacterias y del gen ribosomal 18S (~550 pb) para hongos según la base de datos del NCBI (Continuación).

<b>SMT2</b>	AM1	<i>Microascus sp.</i>	915	99%	0.0	99%
		<i>Microascus cirrosus cepa</i>	915	99%	0.0	99%
		<i>MF572</i>				
	NS31	<i>Microascus cirrosus cepa</i>	909	99%	0.0	99%
		<i>LF823</i>				
		<i>Microascus sp. MF361</i>	843	100%	0.0	100%
		<i>Microascus cirrosus cepa</i>	843	100%	0.0	100%
		<i>NIOLM 03</i>				
		<i>Microascus trigonosporus</i>	843	100%	0.0	100%
<b>SMT7</b>	AM1	<i>Chaetomium globosum</i>	869	100%	0.0	100%
		<i>Fusarium equiseti</i>	869	100%	0.0	100%
		<i>Acrophialophora levis</i>	869	100%	0.0	100%
	NS31	<i>Madurella sp.</i>	848	100%	0.0	99%
		<i>Madurella mucetomatis</i>	848	100%	0.0	99%
		<i>Cheatomium globosum</i>	843	100%	0.0	99%
<b>ScMT1</b>	AM1	<i>Selenaspora guernisacii</i>	869	100%	0.0	99%
		<i>Tricharina gilva</i>	857	100%	0.0	99%
		<i>Miladina lecithina</i>	852	100%	0.0	99%
	NS31	<i>Selenaspora guernisacii</i>	797	100%	0.0	98%
		<i>Tricharina gilva</i>	797	100%	0.0	98%
		<i>Miladina lecitina</i>	769	100%	0.0	97%

Las secuencias del gen ribosomal 16S ADN de los aislados bacterianos P.3.1 bac 2, P.8.1 bac 2, 5.b.3 y 3.b.2, comparten el 99% de identidad con la secuencia del género *Bacillus sp.*, mientras que la secuencias de ADN de los aislados P.8.1 bac 2 y 3.b.2 comparten un 100% y 99% de identidad, respectivamente, con la secuencia de *Bacillus megaterium*.

La secuencia de ADN del aislado P.3.1 bac 2 comparte un 99% de identidad con la secuencia de *Bacillus simplex* y *Bacillus muralis* y un 100% con *Brevibacterium frigoritolerans*. La secuencia de ADN del aislado bacteriano P.8.1 bac 2, también comparte un 100% de identidad con la secuencia de *Bacillus aryabhatai*. *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis* solo se observa un 99% de identidad con la secuencia de ADN del aislado 5.b.3.2. La secuencia amplificada del gen ribosomal 16S ADN de los aislados bacterianos 5.1.b.2, 5.1.b.2, 6.b.4.1 y 6.b.4.1, presentan un 99% de identidad con la secuencia de *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas sp.*

La secuencia de ADN del aislado bacteriano 1.3.b.5 comparte un 99% de identidad con la secuencia de *Streptomyces sp.*, *Streptomyces lavendulicolor* y *Streptimomyces roseolilacinus*.

Para el caso de las esporas, la secuencia parcial (550 pb) del gen ribosomal 18S ADN del aislado de esporas SMT2 comparte un 100% con *Microascus sp.* MF361, *Microascus cirrosus* cepa NIOLM 03 y *Microascus trigonosporus*. La secuencia parcial del gen ribosomal 18S ADN del aislado de esporas SMT7 comparte un 99% de identidad con la secuencia parcial del gen ribosomal 18S ADN de *Chaetomium globosum*, *Fusarium equiseti* y *Acrophialophora levis*. Y un 99% con *Madurella sp.* y *Madurella mucetomatis*. La secuencia parcial del gen ribosomal 18S ADN del aislado de esporas ScMT1 comparte un 99% con *Selenaspora guernisacii*, *Tricharina gilva* y *Miladina lecitina*.

No se obtuvieron las secuencias del gen ribosomal 16S ADN de los aislados bacterianos 5.1.b.1 y 9.1.b.1, al no poder purificar los fragmentos de ADN por fallas

técnicas. Además, no se obtuvo amplificación de ADN del aislado bacteriano 5.b.3, por lo que no se pudo obtener la secuencia parcial o total del gen ribosomal 16S de dicho aislado bacteriano.

Las muestras de suelo rizosférico, de donde se aislaron las esporas y esporocarpos estudiados, permanecieron almacenadas por un largo periodo de tiempo a temperatura ambiente. Esto pudo haber sido un factor determinante en los casos donde no se pudo obtener ADN en la cantidad y calidad requerida para su posterior análisis e identificación. Aunado a este factor, las esporas y/o esporocarpos SMT1, SMT3, LAOD1, ScMT7, LAOD2, LAOD3, LAOD4, ScMT2 Y ScMT9, fueron escasas en las muestras de suelo y la mayoría se encontraban rotas o secas, lo cual también limita el éxito de una buena extracción de ADN.

## 7 DISCUSION DE RESULTADOS

A continuación, se describe el análisis de los resultados obtenidos. Para el caso de los aislados bacterianos, se discute su incidencia en el suelo, morfología y su posible capacidad de promover el crecimiento vegetal según lo reportado por los autores citados. Para el caso de los hongos, se describen aquellos aislados no micorrizicos arbusculares presentes en el suelo de la LS, problemáticas experimentales presentadas en la identificación morfológica de HMA y en la identificación realizada de los microorganismos utilizando herramientas moleculares.

### 7.1 Bacterias con posible potencial de promover el crecimiento vegetal, en la LS.

Los desiertos se caracterizan por presentar una combinación de factores ambientales (temperaturas extremas y desecación, suelos salinos con bajos niveles de nutrientes y altos niveles de radiación durante el verano e inestabilidad física debida a los fuertes vientos) que contribuyen a un ambiente aparentemente estéril. Sin embargo, la aplicación de métodos de ecología microbiana ha permitido encontrar y demostrar una nueva imagen al respecto, un ejemplo de esto es el análisis del gen ribosomal 16S. Según las secuencias obtenidas de dicho gen en esta investigación, los aislados bacterianos provenientes de las muestras de suelo rizosférico de la LS (desértico, salino con pH y alcalinidad elevados) de las especies vegetales representativas (reportadas en el trabajo de licenciatura de Saldaña-Robles en 2016), los aislados P.3.1 bac 2, 5.1.b.1, P.8.1 bac 2, 5.1.b.2.1, 5.1.b.2.2, 6.b.4.1, 6.b.4.2, 5.b.3.2, 3.b.2 y 1.3.b.5, comparten mayor porcentaje de identidad con los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Lo que coincide con los

reportes de otros autores que demuestran que bacterias pertenecientes a estos géneros son comúnmente aisladas del suelo. *Bacillus*, representa del 7 al 67% de los aislados bacterianos provenientes de suelo, este género posee tolerancia a pH entre 2 y 8, temperaturas desde los -5 hasta los 75 °C, sequía y salinidad; el género *Pseudomonas* representa del 3 al 15%, debido a su metabolismo diverso y a su habilidad de degradar químicos orgánicos como pesticidas, presenta tolerancia a sequía, salinidad y a altas temperaturas, además Garza (2012) describe al género *Pseudomonas* como un género no exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales. La tolerancia a la sequía, salinidad y temperatura es más evidente en las cepas del género *Bacillus* debido a su capacidad de producir endosporas; las bacterias filamentosas (actinomicetos), pertenecientes al género *Streptomyces*, se encuentran en un menor porcentaje en suelo, soportan pH alcalino, temperaturas altas y estrés por sequía (Sumbali y Mehrotra, 2009; Kumar *et al.*, 2014).

De acuerdo a las características morfológicas microscópicas, *Bacillus* se presenta en forma de bacilo, con un tamaño de 0.8 a 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3 a 9  $\mu\text{m}$  de largo, esporulados y resultan positivos a tinción de Gram. Su morfología macroscópica, presenta colonias de 4 a 7 mm de diámetro, blancas o grisáceas y planas, aunque esto podría variar dependiendo del medio de cultivo (Garza, 2012). El género *Pseudomonas*, de acuerdo a las características morfológicas microscópicas, presenta forma bacilar recta o ligeramente curveada, con un tamaño de 0.6 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 a 4  $\mu\text{m}$  de largo que resultan negativos en la tinción Gram (Garza, 2012) y generalmente son móviles. Macroscópicamente, sus colonias pueden distinguirse por su forma y consistencia inusual, tienen una apariencia

arrugada y color café rojizo, normalmente son duras y secas (Lalucat et al., 2006). El género *Streptomyces* son actinobacterias Gram positivas filamentosas en su morfología microscópica y en sus características macroscópicas sus colonias presentan un aspecto ceroso y polvoso, su color puede variar con respecto al tipo de medio, pueden ser desde blancas grisáceas, cremas y negras (Hidrin et al., 2011).

Los aislados bacterianos P.3.1 bac 2 y 3.b.2, se presentan como Gram negativos (Tabla. 1) y debido a que comparten un 99% de identidad con el género *Bacillus* se esperaba encontrarlos como Gram positivos, esto puede deberse a que el resultado de la tinción de Gram cambia a negativo por la edad del cultivo. Los aislados 5.1.b.2.1, 5.1.b.2.2, 6.b.4.1 y 6.b.4.2, las cuales comparten un 99% identidad con *Pseudomonas* presentan colonias con aspecto húmedo, color amarillo translucido y aspecto suave, lo cual no es característico de las cepas de *Pseudomonas*, sin embargo, se ha reportado que la morfología de las colonias de *Pseudomonas* no es necesariamente constante. Esta característica puede variar después de repetidas transferencias en medios de cultivo, por lo que se vuelven suaves, mucosas y de un color pálido. Esto puede describirse como disociación colonial (Lalucat et al., 2006).

Trabajos previos de este grupo de investigación (Tesis de licenciatura "Bacterias asociadas a plantas de la Laguna Salada, Baja California", Saldaña-Robles en el 2016) describen que los aislados bacterianos P.3.1. bac 2, P.8.1 bac 2, 5.1.b.2, 9.1.b.1, 6.b.4, 5.b.3, 3.b.2, 1.3.b.5 y 5.1.b.1 son productores de ácido indolacético (AIA) bajo condiciones de alcalinidad y salinidad alta. Por otro lado, se ha reportado en la literatura que los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*

comúnmente presentan mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, como producción de AIA (Ahmed *et al.*, 2010; Kumar y Verma, 2018; Pandey, 2013; Sharma *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2013; Salla *et al.*, 2014; Upadway *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2016), solubilización de fosfatos (Pandey, 2013; Schwartz *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2016), producción de sideróforos (Schwartz *et al.*, 2013), entre otros mecanismos, por lo que son reconocidos como rizobacterias de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés). Además, son capaces de promover el crecimiento vegetal incluso bajo condiciones desfavorables como pH alto (Naz y Bano, 2010), estrés por salinidad o temperatura (Sharma *et al.*, 2014; Upadway *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2016).

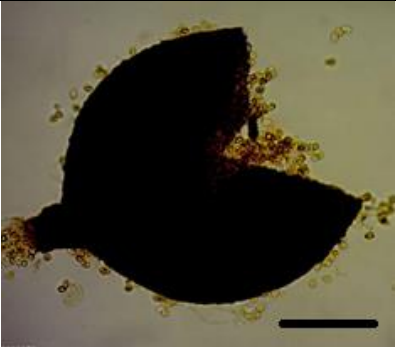
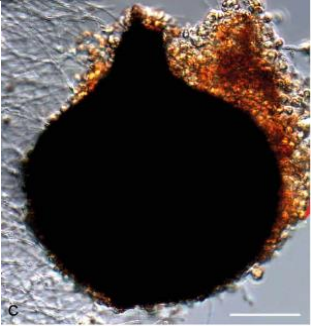
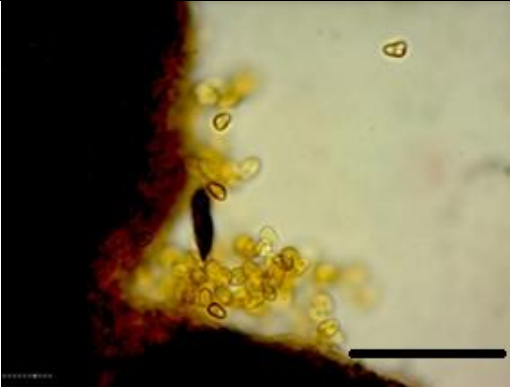

## 7.2 Hongos no micorrícicos arbusculares presentes en el suelo de la LS.

Las secuencias parciales del gen ribosomal 18S ADN obtenidas del morfotipo SMT2 comparten un 99% de identidad con las de *Microascus sp.*, por lo cual se realizó una comparación con la morfología de algunas especies de este género contra la del morfotipo SMT2 y se encontró mayor similitud con el microorganismo *Microascus campaniformis* (Tabla 5), que es un hongo ascomiceto (Sandoval *et al.*, 2015). Este tipo de hongos son identificados principalmente por sus características macroscópicas como: tamaño, estructura fructífera sexual y sus ascoesporas (Sandoval *et al.*, 2015).

A pesar de que se encontraron similitudes con *Microascus campaniformis*, no se puede asegurar que se trata de este microorganismo ya que se requiere un análisis

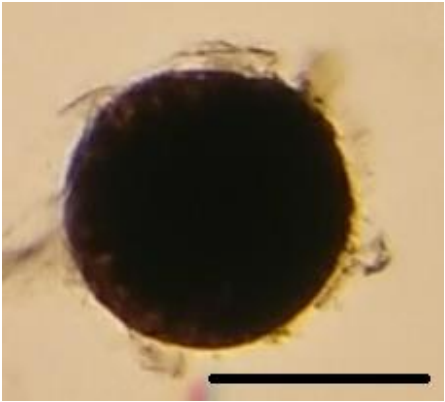
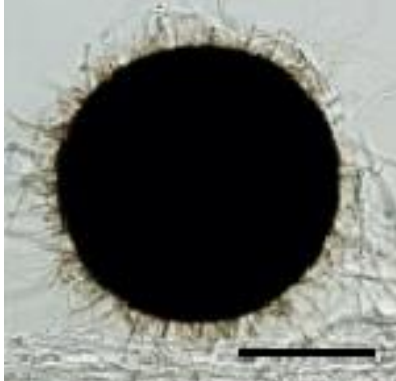
molecular más amplio para conocer la especie, además de que hay poca información reportada sobre este microorganismo por ser considerando una especie “nueva” (Sandoval *et al.*, 2015). Sin embargo, el género *Microascus*, comprende especies comúnmente aisladas del suelo, material vegetal en descomposición y ambientes áridos (Sandoval *et al.*, 2015), lo que podría explicar su presencia en las muestras de suelo rizosférico con las que se realizó esta investigación.

*Tabla 5. Tabla comparativa para Microascus.*

SMT 1	<i>Microascus campaniformis</i>
Imagen	
	
Imagen 1. Morfotipo SMT2 (Barra de escala = 50 µm)	Imagen 2. <i>Microascus campaniformis</i> . Ascoma (Barra de escala = 50 µm) (Sandoval <i>et al.</i> , 2015)
	
Imagen 3. Ascoesporas de morfotipo SMT2 (Barra de escala = 50 µm).	Imagen 4. <i>Microascus campaniformis</i> . Ascoesporas (Barra de escala = 5 µm) (Sandoval <i>et al.</i> , 2015)
<b>Color</b>	
Marrón oscuro	Verde oscuro (Sandoval <i>et al.</i> , 2015)
<b>Dimensiones de ascoma</b>	
70-193.95 µm	120-220 (Sandoval <i>et al.</i> , 2015)

Las secuencias parciales del gen ribosomal 18S correspondientes a los morfotipos SMT7 y ScMT1 mostraron similitud con las secuencias de microorganismos pertenecientes a diferentes géneros (*Chaetomium sp.*, *Fusarium sp.*, *Acrephialophora sp.*, *Madurella sp.*, *Selenaspora sp.*, *Tricharina sp.*, *Miladina sp.*). Dichos géneros presentan grandes diferencias en su morfología por lo que se cotejaron las características morfológicas observadas en los morfotipos SMT7 y ScMT1 con las reportadas para los microorganismos que mostraron mayor porcentaje de identidad con las secuencias parciales del gen ribosomal 18S. SMT7 mostró similitud en características morfológicas tales como color, tamaño y estructura con *Chaetomium pilosum*, una de las 100 especies pertenecientes al género *Chaetomium sp* (Tabla 6). Los hongos de este género comúnmente son endófitos (Tawfick *et al.*, 2017). Varias cepas de *Chaetomium sp.* se encuentran en suelos y restos de plantas (Barbosa *et al.*, 2017) por lo que muy probablemente las esporas del morfotipo SMT7 pertenezcan a este género.

Tabla 6. Tabla comparativa para *Chaetomium*.

SMT 1	<i>Chaetomium pilosum</i>
Imagen	
	
Imagen 5. SMT7 (Barra de escala = 50 µm)	Imagen 6. <i>Chaetomium pilosum</i> . (Barra de escala = 50 µm) (Wang <i>et al.</i> , 2016)
<b>Color</b>	
Marrón oscuro, negras en luz superficial	Café oscuro, negras en luz superficial
<b>Dimensiones de ascoma</b>	
108.1-192.53 µm	120-265 µm (Wang <i>et al.</i> , 2016)

Las secuencias parciales del gen ribosomal 18S de los morfotipos SMT2, SMT7 y ScMT1 mostraron mayor porcentaje de identidad con microorganismos pertenecientes al filo Ascomycota. ScMT1 mostró identidad con el orden Pezizales: *Selenaspora guernisacii*, *Tricharina gilva*, *Miladina lecthina*. Los microorganismos pertenecientes a este orden comúnmente son saprofitos en madera, suelo o estiércol, sin embargo, algunos miembros pueden formar micorrizas (Brundrette *et al.*, 1996). Lo cual podría explicar su presencia en las muestras de suelo rizosférico.



Por otro lado, se sabe que el par de oligonucleótidos NS31-AM1 amplifica un fragmento central del gen 18S ARNr de aproximadamente 550 pb, en el cual se encuentran la mayoría de taxones correspondientes a Glomeromycota (Öpik, 2006; Janda, 2007). Sin embargo, Van-Geel *et al.*, (2014) reportó que con el par de oligonucleótidos NS31-AM1 se obtiene mayor cantidad de secuencias

pertenecientes al filo Ascomycota que Glomeromycota. Lo cual podría ser la razón del porqué se obtuvieron secuencias de hongos no micorrizicos arbusculares con este par de oligonucleótidos.

#### 7.2.1 Semilla aislada del suelo de la LS.

Para determinar a qué especie de planta pertenece la semilla con la que se trabajó (LAODP1), se cotejaron las características morfológicas de la misma con las de *Papaver rhoeas L.*, tales como tamaño, color y estructura (Tabla 7) indicando que dicha semilla probablemente pertenezca a dicha especie. *Papaver rhoeas L.*, es una planta silvestre dicotiledónea presente en suelos secos, alcalinos, moderadamente pobres en nitrógeno, y soportan el calor. No están presentes en suelos muy fertilizados, por lo que es común encontrarlas en terrenos baldíos, campos y bordes de caminos (Asturnatura, 2007). Dichas características pueden justificar su presencia en el suelo de la LS.

Tabla 7. Tabla comparativa para *Papaver rhoeas L.*

LAODP1	<i>Papaver rhoeas L.</i>
Imagen	
	
Imagen 6. LAODP1 (Barra de escala = 0.1 mm)	Imagen 6. Semilla de <i>Papaver rhoeas L.</i> (Barra de escala = 0.5 mm) (Natural Resources Conservation Service)
<b>Color</b>	
Amarillenta-naranja	Amarillenta-naranja
<b>Dimensiones</b>	
700 $\mu\text{m}$ de largo y 500 $\mu\text{m}$ de ancho	Menor a 1 mm
<b>Estructura</b>	
Reniformes, reticuladas	Reniformes, reticuladas

Se obtuvieron bandas de un tamaño aproximado de 1500 y 550 pb en la amplificación de ADN de la semilla perteneciente a la especie *Papaver rhoeas L.* (LAODP1), indicando presencia de hongos endófitos (protegidos durante el proceso de desinfestación) al interior de la semilla. Pese a que se obtuvo ADN y se logró amplificar un fragmento del gen ribosomal 18S ADN, no se logró una secuencia nucleotídica de calidad. Probablemente los microorganismos dentro de la semilla también se vieron afectados por el tiempo de almacenamiento y otros factores como la falta de nutrientes, sequia, pH, entre otros. Este resultado negativo pudo deberse también a un alto contenido de CG en la secuencia nucleotídica del ADN blanco.

### 7.3 Identificación morfológica de hongos micorrizicos arbusculares.

Es común encontrarse con esporas muertas de apariencia intacta en muestras de suelo rizoférico, lo cual es uno de los principales problemas de la identificación morfológica de los HMA, ya que al desconocer si las esporas están vivas, muertas o su edad, fácilmente se pueden cometer errores al realizar la identificación por morfología. Además, es común que éstas hayan sido alteradas por la actividad microbiana presente en el suelo (al ser extraídas del suelo es posible que contengan parásitos) o hayan pasado a través del sistema digestivo de algún animal (Brundrette *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2016).

Los criterios importantes para la identificación morfológica de HMA (desarrollo de esporas, arreglo de esporas, forma, tamaño, color, ornamentación, capas de pared y su reacción al reactivo de Melzer, contenido de la espora, germinación, hifa de sostén y estructuras asociadas con hifas de sostén) se ven afectados por la edad de la espora, y es claro que realizar una identificación morfológica de esporas muertas no es confiable, ya que la información que se pueda obtener es insuficiente y puede ser incorrecta (Brundrette *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2016).

Las imágenes presentadas en el apartado 6.2 muestran las esporas y/o esporocarpos en mejor estado que se lograron encontrar en las muestras de suelo rizoférico. Sin embargo, partiendo de lo mencionado en el párrafo anterior y de la consideración de que las esporas viables tienen un tiempo de vida aproximado de 8 meses (Lee y Koske, 1994), no fue posible realizar una identificación morfológica acertada de las mismas pues el material con el que se realizó esta investigación

estuvo almacenado alrededor de 3 años a temperatura ambiente previo a su utilización siendo esto un factor limitante para la presencia de esporas jóvenes y viables.

#### 7.4 Identificación molecular de hongos.

A pesar de que se mostraron bandas en los geles de electroforesis indicando que se obtuvo ADN para la mayoría de los morfotipos analizados (SMT1, SMT2, SMT3, SMT7, ScMT7, LAOD2, LAOD4), no se logró obtener la secuencia de ADN de dichas bandas, debido a que el ADN se degradó rápidamente, lo cual podría deberse a que éste no era de buena calidad, muy probablemente debido a la edad de las esporas extraídas del suelo rizosférico.

Según lo expuesto en el punto 7.3, no se puede realizar una identificación molecular de esporas de las cuales se desconoce la edad o si se encuentran vivas o muertas. Debido a que se encontró una mayor cantidad de esporas muertas que vivas en el suelo rizosférico utilizado, y considerando que algunas de éstas presentaron una apariencia intacta, se obtuvieron resultados negativos en el análisis molecular (Sun *et al.*, 2016).

## 8 PERSPECTIVAS

Uno de los principales problemas para la identificación morfológica y molecular de los HMA es el desconocimiento de la edad de las esporas aisladas de suelo rizosférico. Sun *et al.*, (2016) proponen como solución cultivos trampa antes del análisis morfológico, siempre y cuando se mantenga el pH y clima tan cercano como *in situ* para que las trampas de cultivos restablezcan en gran medida las comunidades de HMA. Estos autores utilizaron la tinción vital de cloruro de tetrazolio INT [2- (p- yodofenil) -3- (p -nitrofenil) -5-fenil- 2H -tetrazolio cloruro] para evaluar si las esporas de HMA con las que trabajaron se encontraban vivas o muertas, y dicho ensayo no afectó los análisis moleculares, por lo que podría considerarse como alternativa para futuros trabajos derivados de la presente investigación.

Al ser muestras de suelo rizosférico de un ambiente árido, los HMA que se espera encontrar en posteriores investigaciones son los siguientes: *Glomus infrequens*, *G. fasciculatum*, *G. mosseae*, *G. macrocarpum*, *G. feugianum*, *G. macrocarpum*, *G. fasciculatum*, *Gigaspora candida*, y *Sclerocytis sinuosa*, debido a que se ha reportado incidencia en ambientes áridos y semi áridos (Mathew *et al.*, 1991, citado por Varma, 1999).

## 9 CONCLUSIONES

El presente estudio representa un esfuerzo en la identificación de algunos de los microorganismos aislados de suelo rizosférico de la Laguna Salada Baja California. Los aislados bacterianos P.3.1 bac 2, P.8.1 bac 2, 5.1.b.2.1, 5.1.b.2.2, 6.b.4.1, 6.b.4.2, 5.b.3.2, 3.b.2 y 1.3.b.5 fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Saldaña-Robles (2015), en su tesis de licenciatura “Bacterias asociadas a plantas de la Laguna Salada, Baja California y posibles aplicaciones en la industria”, reportó que estos aislados bacterianos son productores de AIA, por lo que se sugiere que dichos aislados son promotores del crecimiento vegetal.

En cuanto a los métodos de extracción de ADN, empleados para las esporas de hongos aislados de suelo rizosférico, el método B mostró ser más eficiente que el método A, aun cuando las esporas no se encontraban en buen estado debido al tiempo de almacenamiento.

Basados en la literatura, la morfología de esporas y esporocarpos encontrados, así como el marcador molecular (gen ribosomal 18S) se esperaba encontrar una gran cantidad de HMA (Glomeromicota) en el suelo rizosférico bajo estudio sin embargo las condiciones de almacenamiento de las muestras de suelo no lo permitieron.

En este suelo se encontraron hongos pertenecientes al filo Ascomycota (*Microascus* y *Chaetomium*) los cuales no son micorrízicos arbusculares. Se ha reportado poca información sobre estos géneros por lo que se proponen futuras investigaciones al respecto.

## 10 REFERENCIAS

1. Aco-Palestina, A. (2006). Cicloestratigrafía y variabilidad climática en Laguna Salada, Baja California, México. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada Baja California. Baja California, México.
2. Ahmed, I., H., y Labuschange, N. (2010). Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizoplane of grasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:1837-1846
3. Albuquerque, P., Mendes, V. M., Santos, L. C., Ferreira-Moradas, P., y Tavares, F. (2009). DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification. *Science of the total environment*, 407, 1641-1651.
4. Asturnatura. (2017). *Papaver Rhoëas L.*, consultado en línea: <https://www.asturnatura.com/especie/papaver-rhoeas.html>.
5. Bago B., Shachar-Hill Y., Pfeffer P., (2001). Dissecting carbon pathways in arbuscular mycorrhizal with NMR Spectroscopy. En: Current Advances in mycorrhizae research. St. Paul, Minnesota. American Phytopathological Society Press.
6. Balestrini, R., y Lumini, E. (2018). Focus on mycorrhizal symbioses. *Soil ecology*. 123: 299-304.
7. Barbosa, F., R., Raja, H., A., Shwarer, C., A., Gusmalio L., F. (2012). Three *Chaetomium* species (Chaetomiaceae, Ascomycota) from the semiarid region of Brazil. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 12(1): 115-118.

8. Basu, S., Rabara C., R., y Negi, S. (2018). AMF: The future prospect for sustainable agricultura. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 102: 34-46.
9. Beneduzi, A., Ambrosini, A., y Passaglia, L. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1044-1051.
10. Brundrett, M. (2009). Mycorrhizal in Natural Ecosystems. *Advances in ecological research*, 21: 171-313.
11. Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., y Malajczuk, N. (1996). Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
12. Cardenas-Flores, A., Cranenbrouck, S., Draye X., Guillet, A., Govaerts, B., y Declerck, S. (2011). The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza*, 21(5), 443-449.
13. Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious deseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
14. Compean-Jimenez, G., Baylon-Grecco, O., Robles, H., y Aranda, J. E. (1984). Estudio preliminar de la pesquería de la Laguna Salda, Baja California, México.
15. Contreras, J., Martin-Barajas, A., y Herguera, J. C. (2005). Subcidence of the Laguna Salada Basin, northeastern Baja California, Mexico, inferred from Milankovitch changes. *Geofísica Internacial*, 44(1): 103-111.

16. DeLong, E. F., (2004). Microbial population genomics and ecology: The road ahead. *Environmental Microbiology*, 6(9), 875-878.
17. Dorantes-Gómez, N., Trujillo-Martínez, M., y Carreón-Abud, Y. (2012). Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de hongos micorrízicos arbusculares que colonizan plantas de aguacate (*Persea americana* Mill). *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias* 14(2), 42-47.
18. Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K., y Antranikian, G. (2014). Extremozymes-biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. 29, 116-123.
19. Gallardo-Mata, C. G. (2013). Sísmica de reflexión en Laguna Salada, Baja California, México. (Tesis de Maestría). Programa de Posgrado en Ciencias de Tierra. Ensenada, Baja California, México.
20. Garza, R., V. (2012). Manual de bacteriología experimental. Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 2da edición.
21. Gerdemann, J., W., y Nicolson, T., H. (1963). Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46(2), 235-244.
22. Giovannetti, M., y Avio, L. (2002). Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. *Applied Mycology and Biotechnology*, Volume 2.
23. Glick B. R., Patten C. L., Holguin G., Penrose D. M., (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Londres. Imperial College Press.
24. Glick, B. R. (1994). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109-117.

25. Glick, B. R. (2012). Plant growth promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Hindawi Publishing corporation Scientifica, A review article*.
26. Gray, E.J., y Smith, D.L., (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37(2005), 395-412.
27. Guerrero, R., y Berlanga, M., (2001). La "inmortalidad" procariótica y la tenacidad de la vida. *Actualidad SEM*, 33, 16-23.
28. Gupta V., Satyanarayana T., Garg S. (2000). General aspects of mycorrhiza. En: *Mycorrhizal Biology*. New York, Plenum Publishers.
29. Gupta, G., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., y Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2), 96-102.
30. Harley, J. L. (1989). The significance of mycorrhiza. *Mycological Research*, 92(2), 129-139.
31. Harley, J. L., y Harley, E. L. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist Trust*, 105: 1-102.
32. Hidrin, N., Goodfellow, M., Boiron, P., Moreno, M., y Serrano, J., A. (2001). Los estreptomices, actualización y revisión didáctica. *Rev. Sov. Ven. Microbiol.* 21(1), 1315-2556.
33. Hongoh, Y., Yuzawa, H., Moriya, O., y Toshiaki, K. (2003). Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS microbiology letters*, 221, 299-304.

34. Janda, M. J., y Abbott, L., S. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*. 2761-2764
35. Khan, A., G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 18: 335-364.
36. Kloepper, J., W., Lifshitz, R., y Zablotowicz, R., M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Elsevier Science Publisher Ltd (UK)*, Vol. (7)
37. Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., y Schüßler, A. (2009). DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183: 212-223.
38. Kumar P., E., Ahmed H., M., S., K., Desai S., Amalraj D., y Rasul A. (2014). In vitro screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus spp.* *International Journal of Bacteriology*.
39. Kumar, A., y Verma, P., J. (2018). Does plant- Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review?. *Microbiological Research* 207 (2018) 41-52.
40. Kumari, P., Meena, M., y Upadhyay, R., S. (2018). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from the rhizosphere of *Vigna radiata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
41. Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., García-Valdés, E., y Palleroni, J., N. (2006). *Microbiology and molecular biology reviews*. 510-547.

42. Lee, J., Lee, S., y Young, P. W. (2006) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS microbiology letters*, 65, 339-349.
43. Lee, P., y Koske, R., E. (1994). *Gigaspora gigantea*: seasonal abundance and ageing of spores in a sand dune. *Mycological Research*, 98(4), 453-457.
44. Leung, T., y Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: Exploring the many shades of symbioses. *Life and environment*, 58(2), 107-115.
45. Linderman, R. G. (1988). Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora: The Mycorrhizosphere Effect. *Symposium: Interactions of Mycorrhizal Fungi*.
46. Lodish, H., Berk, A., Kaise, A., C., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Matthew, P., S. (2016). *Biología Celular y Molecular*. 7ma edición, ciudad Buenos Aires. Editorial Medica Panamericana.
47. López-Arreguin A. (2015). Bacterias extremófilas y su potencial en la producción de auxinas y metabolitos con actividad tensoactiva. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
48. Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Annual reviews*.
49. Lumini, E., Orgiazzi, A., Borriello, R., Bonfante, P., y Bianciotto, V. (2010). Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology*, 12(8), 21165-2179.

50. MacElroy, R. D. (1974). Some comments on the evolution of extremophiles.
51. Madigan M.T., Martinko J. M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A., 2015. Brock. Biología de los microorganismos. Madrid, Pearson Education. 14<sup>a</sup> edición.
52. Maheshwari D.K., (2010). Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Microbiology monograph, Springer. Heidelberg; 2010; 18.
53. Maldonado-Ramírez, S. (2018). La vida oculta de los hongos endófitos. *Columna Endi. El nuevo día.com* Recuperado de internet: <https://www.elnuevodia.com/opinion/columnas/lavidaocultadeloshongosendofitos-columna-2385972/>
54. Martin, F., & Tagu, D. (1999). Developmental Biology of a Plant-Fungus Symbiosis: the Ectomycorrhiza. En: Mycorrhiza: Structura, Function, Molecular Biology and Biotechnology. 2da edición.
55. Martin, M., Martínez-Granero, F., y Rivilla, R. (2011). Colonización de la rizosfera por pseudomonas.
56. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Gajardo, G., y Mora M. L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved growth promotion by rhizobacteria. *Journal Soil Science*, 10(3). 293-319.
57. Miransari, M. (2009). Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology*, 12(4).
58. Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y., Saenz-Santiago. Y., Castañeda-Lucio. M., y Muñoz-Rojas J., (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacteria, aislamientos en

- América y potencial biotecnológico. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17(2), 24-34.
59. Nardon, P., y Charles, H. (2004). Morphological Aspects of symbiosis.
60. Natural Resources Conservation Service, United States Departmente of Agriculture. *Papaver rhoeas* L. corn poppy. Consultado en línea: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PARH2>.
61. Naz, I., y Bano, A. (2010). Biochemical, molecular characterization and growth promoting effects of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. isolated from weeds grown in salt range of Pakistan. *Plant soil* 344: 199-207.
62. Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., y Thonart, P., (2010). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 15(2), 327-337.
63. Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Khan, S., Khan, A., L., Khan, A., AL-Harrasi, A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*. 209: 21-32.
64. Oliver K.M. & Russell J.A., 2006. Symbiosis, Introduction to. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. 4: 282-290.
65. Öpik, M., Moora, M., Liira, J., y Zobel M. (2006). Composition of roor-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of ecology*, 94, 778-790.
66. Pandey, R., Chavan, P., N., Sharma, N., Tripathi, V., y Khetmalas, M., B. (2013). *Pseudomonas stutzeri* RP1: A versatile plant growth promoting endorhizospheric bacteria inhabiting sunflower (*Helianthus annus*). *Research Journal of Biotechnology*. 8(7), 48-55.

67. Pérez-Bastidas D., (1983). Ordenamiento ecológico del valle de Mexicali.
68. Podar, M., y Reysenbach, A. L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 250-255.
69. Raina S., Chamola, B.P., Mukerji K.G. (2000). Evolution of mycorrhiza. *Micorrizal Biology*. New York, Plenum Publishers.
70. Ramírez, D. N., Serrano-R., J., y Sandoval-T., H. (2006). Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(3), 56-71.
71. Rampelotto, H. P. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life*, 3: 482-485.
72. Redecker D., Heidemare T., Chistopher W., y Werner D. (1997). Restriction Analysis of PCR-Amplified Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA as a Tool for Species Identification in Different Genera of the Orden Glomales. *Applied and environmental microbiology*. 63(5), 1756-1761.
73. Saikkonen, K., Faeth, H., Helander, M., y Sullivan T. (1998). Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review*.
74. Saldaña-Robles R., (2016). Bacterias asociadas a plantas de la Laguna Salada, Baja California (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
75. Salla, D., T., Silva, R., y Astarita, V., L. (2014). Streptomyces rhizobacteria modulate the secondary metabolism of *Eucalyptus* plants. *Plant physiology and biochemistry*. 85: 14-20.

76. Salzer P. & Boller T. (2000). Elicitor Induced Reactions in Mycorrhizae and their suppression. En: Current Advances in Mycorrhizae Research. St. Paul, Minnesota, American Phytopathological Society.
77. Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinosa, Y., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillen, B., García-Méndez, M., y Macías-Rubalcava, L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 132-146.
78. Sánchez-Leyva I., M. (2015). Hongos micorrizicos arbusculares asociados a plantas de la Laguna Salada, Baja California (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, Baja California.
79. Sandoval-Denis, M., Sutton. D., A., Gene, J., Cano-Lira, J., F., Hoog, G., S., Decock, C., A., Wiederhold, N., P., y Guarro, J. (2015). Redifining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Research article, Persoonia*, 36: 1-36.
80. Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M., y Glick, B. (2015). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(2003), 92-99.
81. Schwartz, A., R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C., W., Fujishige, N., A., Vijanderan, A., J., Villella, W., Hanamoto, K., Diener, A, Sander, E., R., DeMason, D., A., y Hirsch, A. (2013). *Bacillus simplex*- A Little known PGPB with anti-fungal activity- Alters Pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *Agronomy*, 3: 595-620.

82. Seckbacg J. & Rampelotto P., (2015). Polyextremophiles. *Microbial Evolution under Extreme Conditions*. De Gruyter, Capitulo 8.
83. Seckbach, J. (1998). *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. London, Kluwer academic publishers.
84. Seymour, S. (2001). *Disinfection, sterilization and preservation*. Lippincott Williams & Wilkins. 5ta edición.
85. Sharma A., Singh P., Kumar S., Kashyap L., P., Srivastava K., A., Chakdar H., Singh N., R., Kaushik R., Saxena A., K., y Sharma K., A. (2014). Deciphering diversity of salt tolerant bacilli from saline soils of Eastern Indo-gangetic plains of India. *Geomicrobiology Journal*.
86. Sharma, M., Rekha, K., y Singh, R. (2018). Endophytic Microorganisms: Their Role in Plant Growth and Crop Improvement. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. 20: 391-413.
87. Smith S. & Read D., (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier. 3ra Edición.
88. Solís-Domínguez F., A., Valentín-Vargas A., Chorover J., y Mainer M., R. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant biomass and the rhizosphere microbial community structure of mesquite grown in acidic lead/zinc mine tailings. *Sci Total Environ*. 409(6), 1009-1016.
89. Stanier R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L., Painter P.R., (1987). *General Microbiology*. Londres. Macmillan Press LTD. 5ta edición.
90. Stone K., Bacon W., White F., (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism Defined. En: *Microbial Endophytes*. Boca Raton. CRC Press.
91. Stragier, P., y Losick, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review*. 30:297-341.

92. Sumbali G., y Mehrotra N. (2009). Principles of Microbiology. Tata McGraw-Hill, 1 edición.
93. Sun, X., Hu, W., y Tang, M. (2016). Characterizing and handling different kinds of AM fungal spores in the rhizosphere. *Word J. Microbiol Biotechnol.* 32:97.
94. Tawfik, N., F., Tawfike A., F., Soliman, R., F., Abbott, R., Ebel, R., E., Haggag, E., G., y Abdelmohsen, U., R. (2016). Metabolomics and Bioactivity Guided Isolation of Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. *Jorunal of Advancer Pharmacy Research.* 1(1), 66-74.
95. Theron, J., y Cloete, T. E. (2000). Molecular techniques for dertermining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in microbiology,* 26(1), 37-57.
96. Tortora J.G., Funke R.B., Case L.C., (2007). Introducción a la microbiología. Editorial Medica Panamerica. 9na edición.
97. Upadhay, K., S., Singh, P., D., y Saikia, R. (2009). Genetic Diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr. Microbial,* 59: 489-496.
98. Upadhyay, K., S., Sing, P., D., y Saikia, R. (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr. Microbial* 59: 489-496.
99. Uzoh, I., M., y Babalola, O., O. (2018). Rhizosphere biodiversity as a premise for application in bio-economy. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 265: 524-534.
100. Van-Den-Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology,* 6: 213:218.

101. Van-Geel, M., Busschaert, P., Honnay, O., y Lievens, B. (2014). Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *Journal of Microbiological Methods*, 106: 93-100.
102. Varma A., (1999). Functions and application of arbuscular mycorrhizal fungi in arid and semi-arid soils. En: *Mycorrhiza structure, function, molecular biology and biotechnology*. Varma, A., y Hock, B. Segunda edición.
103. Varma, A., (1998). Mycorrhizae- the Friendly Fungi: What we know, what should we know, and how do we know? En: *Mycorrhiza Manual*. Varma A., Springer.
104. Wilson, D. (1995). Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Wiley*, 73(2), 274-276.
105. Wu Q.S. & Srivastava A.K., (2012). *Rhizosphere Microbial Communities: Isolation, Characterization, and Value Addition for Substrate Development*.
106. Yadav, N., A., Sachan, G., S., Verma, P., y Kumar, S. (2016). Bioprospecting of plant growth promoting psychotrophic Bacilli from the cold desert of western Indian Himalayas. *Indian Journal of Experimental Biology*. 56: 142-150.