



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS**



**“Aislamiento y caracterización de microorganismos de la
rizósfera de agave pulquero, con potencial efecto promotor del
crecimiento vegetal”**

Tesis

Para Obtener el Título de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Daniel Ángel Ávila Torres

Directores de tesis:

D.C. Josué Altamirano Hernández

D.C. Víctor Meza Carmen

Morelia Mich., Agosto 2018

El presente trabajo titulado “**Aislamiento y caracterización de microorganismos de la rizósfera de agave pulquero, con potencial efecto promotor del crecimiento vegetal**” fue realizado en el Laboratorio de Biología sintética y Química aplicada del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D.C. Josué Altamirano Hernández con el apoyo del consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) a través de la beca numero 598344

AGRADECIMIENTOS

El recorrido por la maestría no fue fácil, siempre se presentaron obstáculos. Sin embargo, siempre pude contar con personas que me apoyaron para que este trabajo llegara a ser lo que hoy presento y por eso quiero dar gracias a:

El doctor Josué Altamirano, por esa paciencia y sabiduría que lo distingue. Cualquiera que lo haya tratado sabe de la gran persona que es, como ser humano y como investigador, gracias por todo ese apoyo, siempre estaré agradecido con usted.

El doctor Víctor meza, siempre mostrando ese interés por la investigación y generando nuevas ideas para mejorar la formación de uno como alumno que empieza este camino.

A mi comité sinodal, los doctores Eduardo Valencia Cantero, Jesús Campos García y Mauro Martínez Pacheco, que gracias a sus comentarios y sugerencias han logrado en conjunto, mejorar este trabajo que tanto representa para mí.

Al doctor Miguel Beltrán García, de la Universidad Autónoma de Guadalajara, por haberme recibido en su laboratorio y el gran apoyo durante mi estancia.

MI FAMILIA. Mi mamá Imelda, gracias por creer siempre en mí, no tienes una idea del gran apoyo y cariño y paz que siempre sentía, estuvieras a mi lado o lejos en casa. Mi papá Hugo, tu apoyo y la felicidad con la que me recibías cada que iba a casa son cosas que no tengo manera de pagarte. Mis hermanos, Luis Gerardo y Bulmaro Enrique, son mis mejores amigos, siempre es un deleite verlos y pasar ratos juntos.

A mi novia Alicia. Gracias amor por estar a mi lado, en las buenas pero sobre todo en las malas, siempre depositaste una confianza y fe en mí, que me impulsaba a poner lo mejor, siempre con miras a superar cualquier obstáculo. Gracias por creer en tu gruñón.

A mis compañeros de laboratorio, Ale, Sebastián y Edgar, por su entusiasmo y compañerismo durante este tiempo que pasamos juntos, con pláticas que nos servían para hacer un día más ameno y agradable.

Contenido

I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. ANTECEDENTES	4
4.1.- Agave.....	4
4.1.1. Morfología, fisiología y entorno	5
4.1.2. Reproducción del agave	7
4.1.3. Requerimientos nutrimentales para el desarrollo del Agave.....	8
4.2. Principales productos del Agave	9
4.2.1 Tequila	9
4.2.2. Mezcal	10
4.2.3. Pulque.....	11
4.3. Situación actual del agave en México	12
4.3.1 Cultivo de agave en el estado de Michoacán	12
4.4. Problemática en el establecimiento de nuevas zonas de cultivo de agave .	16
4.4.1 Estado nutrimental del suelo.....	16
4.4.2. Plagas y enfermedades del agave.....	17
4.4.3. Estrategias agronómicas para el manejo del Agave	20
4.5. Alternativas al uso de agroquímicos de origen sintético.....	22
4.5.1. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal	22

4.5.2. Bacterias endófitas cultivables a partir de la base de hojas de <i>Agave tequilana</i> y su papel como promotores del crecimiento de las plantas	23
4.5.3. Incremento de biomasa de plantas de <i>Agave</i> por la bacteria endófitas <i>Bacillus tequilensis</i> , promotoras del crecimiento vegetal	26
4.5.4. Biocontrol de <i>Fusarium oxysporum</i> a través de la micorrización de consorcios microbianos en plantas de <i>Agave cupreata</i>	28
V.- JUSTIFICACIÓN.....	31
VI. OBJETIVO GENERAL	32
VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
IX. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
9.1. Material biológico	34
9.1.1. Colecta de muestras	35
9.1.2. Medios de cultivo	35
9.2. Aislamiento de microorganismos de la rizósfera y de tejido de agaves pulqueros	42
9.2.1. Determinación de la clasificación taxonómica de los microorganismos aislados de la rizósfera del agave pulquero	42
9.2.2. Identificación de PGPR por tamizado en Maíz y Frijol	43
9.2.3. Análisis del efecto de consorcios de microorganismos con potencial PGPR aislados de agave pulquero, en modelo de sabila	45

9.2.4. Evaluación de la capacidad inhibitoria de mezclas de microorganismos para el control de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de agave.....	45
9.2.5. Determinación de la β -actina en el control de <i>Fusarium oxysporum</i> por antagonistas en tejido de plantas de agave.....	46
9.2.6. Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por rizobacterias de suelos de agave pulquero.....	48
9.2.7. Capacidad de solubilización de fosfatos por rizobacterias con efecto promotor aisladas de suelos de agave pulquero.....	48
9.2.8. Análisis del potencial para producir proteasas por las rizobacterias con efecto promotor, aisladas de cultivos de agave pulquero.....	49
9.2.9. Determinación de la capacidad para reducir hierro por parte de los microorganismos PGPR aislados de cultivos de agave pulquero.....	49
X. RESULTADOS.....	51
10.1. Aislamiento e identificación de microorganismos con efecto promotor en cultivos de agave pulquero.....	51
10.1.1. Identificación de microorganismos con efecto promotor del desarrollo vegetal en cultivos de agave pulquero, usando como modelo <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
10.1.2. Identificación de aislados rizosféricos de agave pulquero para el control biológico de hongos fitopatógenos.....	57
10.1.3. Identificación taxonómica de la comunidad microbiana presente en suelos de agave pulquero.....	61

10.1.4 Evaluación del efecto de mezclas de microorganismos con efecto promotor en el desarrollo vegetal	65
10.1.5 Evaluación de la capacidad de biocontrol de las cepas de <i>Trichoderma viridae</i> y <i>Pseudomonas tolaasii</i> WT-09 en el control del hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	71
10.1.6. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfatos por PGPR aisladas de cultivos de agave pulquero	77
10.1.7. Evaluación del potencial para fijar nitrógeno de las PGPR aisladas de cultivos de agave pulquero	77
10.1.8 Producción de proteasas de los microorganismos con potencial PGPR obtenidas de cultivo de agave pulquero.....	80
10.1.9. Capacidad reductora del hierro de los microorganismos con efecto promotor obtenidos de suelo de agave pulquero.....	81
10.1.10 Producción de sideróforos por microorganismos con efecto promotor, aislados de agave pulquero	83
XI. DISCUSIÓN	85
XII. CONCLUSIONES	96
XIII. Bibliografías	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de la estructura de un agave maduro.....	6
Figura 2 Distribución del cultivo de agave en México.....	15
Figura 3 Hongos fitopatógenos causantes de daño en plantaciones de agave. ...	20
Figura 4 Efecto de promoción de crecimiento de <i>Bacillus tequilensis</i> en plantas de <i>Agave tequilana</i>	27
Figura 5 Biocontrol del Hongo Fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> por mezclas de hongos micorrizococ arbusculares.....	30
Figura 6 Hongo fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i>	38
Figura 7. <i>Trichoderma viridae</i> con capacidad de inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos.....	39
Figura 8. Microorganismos usados como controles en la determinación de la reducción de hierro.....	40
Figura 9. <i>Burckolderia</i> sp. CCPES2.	41
Figura 10. Ganancia de biomasa por la inoculación de microorganismos de suelo de agave pulquero en modelos de maíz y frijol.	53
Figura 11. Estimulación de la parte aérea como efecto promotor de los microorganismos presentes en la rizósfera de agaves pulqueros.....	54
Figura 12. Estimulación de raíces laterales en maíz y frijol por la inoculación de microorganismos de la rizósfera de agave pulquero.	56
Figura 13. Efecto de la inoculación de los aislados rizosféricos de agave pulquero sobre el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	59

Figura 14. Capacidad de control biológico de rizobacterias de agave pulquero en hongos fitopatógenos.	60
Figura 15. Diversidad microbiana presente en suelos de agave pulquero identificados por MALDI-TOF.	62
Figura 16. Incremento de Biomasa después de 60 días de inocular plantas de sábila con consorcios microbianos.	67
Figura 17. Efecto de la inoculación de microorganismos con potencial PGPR en el volumen radicular.	68
Figura 18. Efecto de la inoculación de microorganismos con potencial PGPR en la longitud de la raíz.	69
Figura 19. Contenido de clorofila en los diferentes tratamientos con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal.	70
Figura 20. . Estado general de las plantas de agave 60 días después de la primera inoculación.	72
Figura 21. Efecto de la inoculación de microorganismos con efecto de biocontrol en el desarrollo de las hojas de agave.	74
Figura 22. Efecto de microorganismos con capacidad de biocontrol en el desarrollo de pencas de agave.	75
Figura 23. Contenido de ADN de <i>Fusarium oxysporum</i> en plantas de <i>Agave tequilana</i> con diferentes tratamientos.	76
Figura 24. Evaluación de los aislados con efecto promotor en la solubilización de fosfatos.	78
Figura 25. Capacidad fijadora de nitrógeno por PGPR aisladas de la rizosfera de agave pulquero.	79

Figura 26. Producción de proteasas por microorganismos del suelo de agaves pulqueros con potencial efecto promotor.	80
Figura 27. Reducción de hierro de los microorganismos con efecto promotor aislados del suelo de agave pulquero.	82
Figura 28. Capacidad de producción de sideróforos por las cepas aisladas de agave pulquero con efecto promotor.....	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fungicidas e insecticidas usados en plantaciones de agave	21
Tabla 2. Actividad de aislados endófitos en la promoción del crecimiento de plantas.....	25
Tabla 3. Condiciones empleadas para la cuantificación de β - actina por.....	47
Tabla 4. Cepas y microorganismos utilizados para la determinación de los posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.....	50
Tabla 5. Resultados del análisis por MALDI-TOF de los aislados rizosféricos.....	63

I. Resumen

El agave es una planta endémica de México que se usa para la producción de diferentes bebidas alcohólicas de interés comercial como el tequila, el mezcal y el pulque. Por el largo ciclo de vida del agave, es relevante la búsqueda de estrategias que permitan acortar el periodo de crecimiento y rendimiento del cultivo de agave. Una alternativa para lograr este fin, es el uso de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal (PGPR). Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar nuevas PGPR a partir de agave pulquero. Muestras rizosféricas se colectaron de agave ubicado en el Municipio de Epitacio Huerta, Mich. La caracterización de la actividad promotora del crecimiento vegetal se realizó mediante la técnica de tamizado en plantas de maíz, frijol y sábila. Los mecanismos de promoción fueron evaluados *in vitro* y la identificación taxonómica de los microorganismos se realizó mediante MALDI-TOF. Los resultados obtenidos en el tamizado fue que la producción de raíces y el desarrollo de la parte aérea de las plantas inoculadas fue mayor en comparación con las observadas con el control sin inóculo. Además, el control de hongos fitopatógenos por los aislados se observó. *In vitro* se observó que los microorganismos con actividad como PGPR tienen la capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fosfato, producción de proteasas y reducción de hierro. Las bacterias *Arthrobacter* sp. MW01 y *Pseudomonas tolaasii* WT09 mostraron el mejor desempeño en las diferentes evaluaciones realizadas. Estos resultados sugieren que la inoculación con las PGPR aisladas en este trabajo podrían ser una herramienta alterna para la estimulación del crecimiento del agave en cultivos comerciales.

Palabras Clave: Agave, Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, Mecanismos de promoción, Estrategias agronómicas, biocontrol.

II. Abstract

Agave is an endemic plant from México that is used for the production of different alcoholic beverages of commercial interest such as tequila, mezcal and pulque. Given the long life cycle of the agave, in recent years the search for strategies to optimize the growth and yield of this crop has become relevant. An alternative to achieve this goal, has been the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), so the objective of this work was to isolate and characterize new PGPR from agave pulquero. Agave rhizosphere samples were collected in the Municipality of Epitacio Huerta, Mich. The characterization of the plant growth promotion activity was carried out using the sieving technique in corn, beans, and aloe vera. The promotion mechanisms were evaluated *in vitro* and the taxonomic identification of the microorganisms was carried out using MALDI-TOF. The results obtained in the screening were that the production of roots and the development of the aerial part of the inoculated plants were higher in comparison with control plants with out inoculum. In addition, the control of phytopathogenic fungi by the isolates was observed. In the *in vitro* assays, it was observed that microorganisms with activity as PGPR have the capacity of fixation of atmospheric nitrogen, solubilization of phosphate, production of proteases and reduction of iron. The bacteria *Arthrobacter* sp MW01 and *Pseudomonas tolaasii* WT09 showed the best performance in the different evaluation carried out. These results suggest that the inoculation with the PGPR isolated in this work, could be an alternative tool for the stimulation of agave growth in commercial crops.

Key words: Agave, Rhizobacteria promoting plant growth, Promotion mechanisms, Agronomic strategies.

III. INTRODUCCIÓN

México se encuentran entre los diez países más ricos en especies animales y vegetales, hecho que lo ha llevado a pertenecer a las llamadas naciones megadiversas. La biota mexicana es una de las más variadas estimando un aproximado del 10% de todas las especies de plantas y vertebrados terrestres del planeta. Gracias a esta biodiversidad, entre el 30 y 50% de todas las especies son endémicas de nuestro país. Esta biodiversidad es resultado de los variados ambientes, constituidos por planicies, cañadas, costas, sierras y cumbres que permiten el desarrollo de diversos ecosistemas a lo largo y ancho de todo el territorio (Conabio, 2017). Además del maíz, otra de las plantas representativas de México es el agave, forma parte de la historia del pueblo mexicano ya que aporta diferentes beneficios y convirtiéndose en una fuente importante de desarrollo regional. La demanda del agave se centra en torno a la producción de bebidas espirituosas de las que sobresalen bebidas alcohólicas como el Tequila, Mezcal, Bacanora y Pulque según la región. Por otro lado, el agave es parte de una tradición que denota una serie de elementos simbólicos y representativos que caracterizan a las regiones productoras, develando la identidad de los pueblos, sus usos y costumbres (Rivera, 2007). Debido a la importancia que representa el agave en nuestro país, en este trabajo nos hemos dado a la tarea de aislar microorganismos presentes en suelos de agave pulquero que permitan un mejor manejo de la planta de agave en Michoacán.

IV. ANTECEDENTES

4.1.- Agave

El agave, mejor conocido como maguey (Lappe- Oliveras y col. 2008) es originario de México encontrándose desde 34° latitud norte, hasta 60° latitud sur (García-Herrera y col, 2010). Esto hace que en México se encuentre el 75% de las especies de agave que crecen en el continente americano, un 55% de las cuales son endémicas (García-Herrera y col, 2010; Gentry, 1982). El maguey pertenece a la familia Agavaceae, que cuenta con dos subfamilias, Agavoideae y Yuccoideae. Las Agavoideae cuentan con dos subgéneros, *Agave* y *Litsea* (García-Mendoza, 2004) La familia Agavaceae está conformada por nueve géneros: *Yucca*, *Hesperaloe*, *Furcraea*, *Beschorneria*, *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyantes* y *Hesperoyucca* con aproximadamente 330 especies (Eguairte y col. 2000; Valenzuela, 2003 y García-Mendoza, 2004) Actualmente en la República Mexicana hay 26 estados dedicados al cultivo de agave. Este se utiliza principalmente para la producción de tequila (*Agave tequilana* Weber variedad azul), mezcal (*Agave potatorum*), pulque (principalmente *A. salmiana*) y para la obtención de larvas (conocidas como gusanos de maguey); estas últimas con gran aprecio en la gastronomía (Castro- Díaz y Guerrero-Beltrán. 2013.).

Son plantas perennes, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto. Las hojas de los agaves por lo general son suculentas, fibrosas, con la base dilatada y carnosa; la forma que toman es

diversa y va de lineal a lanceolada u ovalada; las de especies pequeñas no sobrepasan los veinte gramos, por otra parte las de los agaves pulqueros son las más grandes del género, llegando a pesar más de 30 kilos cada una. Exhiben una gran diversidad morfológica, los dientes, en la mayoría de las especies, sobresalen como proyecciones del tejido, mientras que en otras muestra dientecillos microscópicos. La hoja cuenta con una espina al final del ápice en la mayoría de los casos y puede medir desde algunos milímetros hasta cinco centímetros (García-Mendoza 2007). La edad del maguey es legendaria, alcanzando su madurez entre los 10 y 25 años en especies grandes, mientras que las especies pequeñas lo hacen después de crecer, entre cuatro y cinco años. La inflorescencia que surge del meristemo apical suele ser desproporcional en relación con el tamaño de la planta.

4.1.1. Morfología, fisiología y entorno

Los agaves son plantas xerofitas, que se adaptan a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y temperaturas altas. Las especializaciones morfológicas a las condiciones adversas consisten en modificaciones en la estructura básica como respuesta a las presiones del ambiente. Cuentan con una serie de estrategias para sobrevivir a ambientes secos y cambios de temperatura entre el día y la noche, las cuales limitan la pérdida de agua por transpiración acumulándola en tejidos especializados.

Una de sus adaptaciones es el desarrollo de su succulencia, ya que el agua almacenada durante épocas de lluvia permite que las plantas sobrevivan

durante algún tiempo en ausencia de suministro de agua del exterior. El sistema de raíz de los agaves es superficial, lo que les permite absorber con

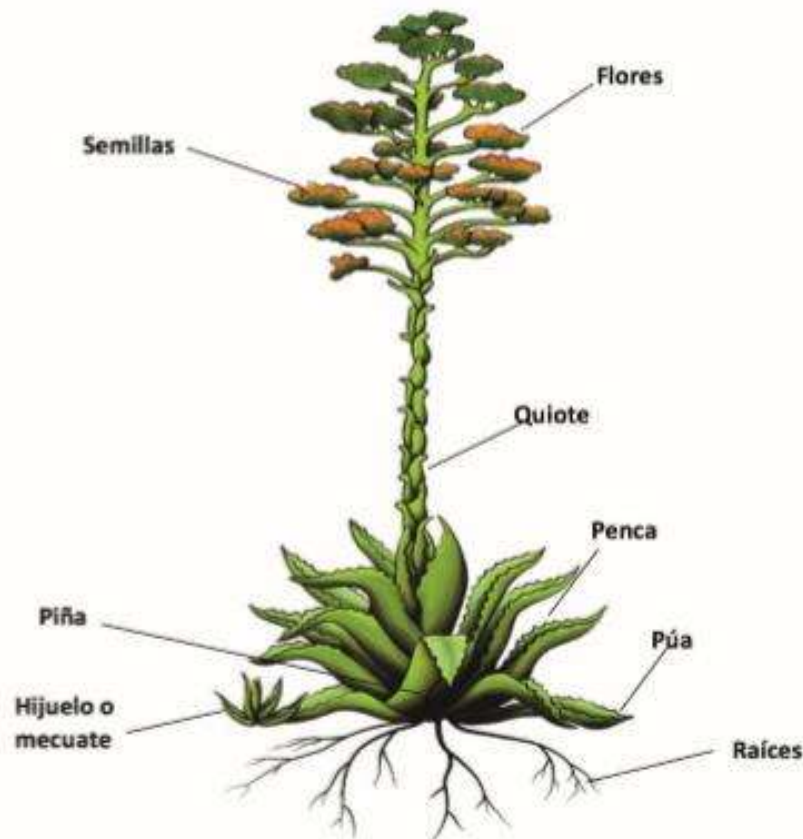


Figura 1. Esquema general de la estructura de un agave maduro.

Se observan en la parte aérea las flores y semillas que salen del pedúnculo floral. El meristemo apical o quiote cuya longitud puede variar de 3 a 10 metros. Las pencas u hojas en forma de roseta y unidas a la piña o tallo. Los hijuelos que crecen alrededor de la planta de agave, y un sistema de raíces superficial para la toma de agua en épocas de poca precipitación (Alfonso León, 2014).

facilidad el agua de lluvia que solo humedece la superficie del suelo. Asimismo, en épocas de sequía el agua almacenada ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de carbono en forma de dióxido de carbono (CO₂).

Son varias las características de los agaves que les permiten evitar una excesiva transpiración; una reducción en la superficie que transpira en relación con el volumen total del órgano, la presencia de una cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, la acumulación de cera en la superficie y la presencia de estomas de naturaleza compleja que aseguran una protección adicional contra la evaporación en periodos de sequía. El arreglo de las hojas disminuye el excesivo calentamiento de la lámina foliar favoreciendo la sombra una sobre la otra. El metabolismo ácido crasuláceo constituye una especialización fisiológica en los agaves, el cual es una adaptación al estrés ambiental y se presenta en plantas de sitios con periodos de escasa disponibilidad de agua o CO₂ (Taiz y Zeiger, 2002; Larcher, 2003).

4.1.2. Reproducción del agave

Los agaves se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización efectuada por algunos animales (Nobel, 1988). En el caso de los agaves con inflorescencias paniculadas (subgénero *Agave*) la polinización se lleva a cabo por murciélagos, mientras que los agaves con inflorescencia espigada como el subgénero *Littaea* son polinizados principalmente por insectos, haciendo que la transferencia de polen de una flor a otra sea

nocturna en los magueyes polinizados por murciélagos y diurna en los magueyes polinizados por insectos o aves. Sin embargo, la mayoría de los agaves se propagan de manera asexual, produciendo clones de diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. Por otro lado, los bulbillos se originan en la inflorescencia junto a las flores. Esta forma de reproducción es un mecanismo que permite a las plantas tener una mayor capacidad de ampliar su área de distribución además de evitar tiempos de espera prolongados para la obtención de plantas maduras utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas, como el caso de la reproducción sexual (García-Mendoza, 2007).

4.1.3. Requerimientos nutrimentales para el desarrollo del Agave

De las prácticas de producción que se realizan en el cultivo de agave, la fertilización tiene el papel complementar la cantidad de nutrimentos que en forma natural están presentes en el suelo, con el propósito de proporcionar a la planta los nutrimentos indispensables para obtener rendimientos de óptima calidad, cantidad y rentabilidad. Para el apropiado manejo de los fertilizantes se debe de tener a consideración algunos aspectos del fertilizante y del suelo donde será utilizado (Gavi s/f).

A través de un análisis de los requerimientos nutrimentales para tener un mejor desarrollo del agave en un sistema de fertigración, se determinó que la cantidad de nitrógeno requerida para el cultivo de una hectárea de agave es de 299.2 kg de

nitrógeno. Por otro lado, la dosis adecuada para cumplir con el consume de fosforo por parte de las plantas de agave fue de 63.3 kg por hectárea de suelo cultivado. En el caso del potasio, la dosis de fertilización requerida por hectárea de suelo cultivado con agave es de 578.7 kg. La aplicación de los nutrientes requieren ser aplicados de manera complementaria a la fertilidad natural que aporta el suelo, para de esta forma obtener un mejor rendimiento de las plantas, alcanzando su estadio de madurez en menor tiempo y una biomasa mayor.

4.2. Principales productos del Agave

4.2.1 Tequila

El tequila se obtiene a partir de mostos de *Agave tequilana* Weber variedad azul y es una bebida alcohólica regional. Para la producción de tequila, se debe de realizar en fábricas de productores autorizados, la cual debe estar ubicada en el territorio comprendido en la declaración general de protección a denominación de origen “Tequila” (DOT). Dicho proceso se encuentra regido por la Norma Oficial Mexicana 006 scfi-2012 Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. La DOT comprende 181 municipios de cinco estados de la república mexicana, los cuales son: Jalisco y sus 125 municipios, Nayarit con 8, Guanajuato con 7, Tamaulipas con 11 y Michoacán con 20. Son estos los únicos estados que pueden utilizar como materia prima el agave tequilana weber variedad azul, para producción de tequila (Medallo-Mojica y Lopez-Perez, 2013).

El tequila se produce a partir de la piña del agave tequilero. Cada piña tiene un peso entre 30 y 70 kg y su concentración de azúcares se encuentra entre 16% y

28%. Cuentan con un alto contenido de fructanos, los cuales son estructuras complejas que son sintetizadas a partir de sacarosa y su clasificación es en inulinas y levanas, conocidas como agavinas (Montañez-Soto y col. 2011). Para la producción de esta bebida la planta primeramente se jima de todas las pencas de la piña para después poder cocerla en autoclave durante 12 horas. Posteriormente, para la extracción de azúcares la piña es molida y se aplica agua a presión para obtener la mayor cantidad de azúcares. La fermentación de las mieles de agave se lleva a cabo a temperatura ambiente y puede durar hasta 24 horas en épocas de invierno, para después, por destilación, obtener la bebida alcohólica tequila.

4.2.2. Mezcal

El Mezcal es una bebida alcohólica tradicional de México, producto de la fermentación de los azúcares extraídos de piñas cocidas de diferentes especies de agave como *A. salmiana*, *A. weberi*, y *A. potatorum* (Molina-Guerrero y col. 2007).

El proceso de elaboración de mezcal es artesanal y similar al de la elaboración de tequila, con la diferencia de que no es tecnificado y se pueden usar varias especies de agave para su elaboración. El proceso de elaboración de mezcal se resume en la obtención de la materia prima, cocimiento de la piña, molienda de la piña cocida, doble fermentación, destilación en alambiques de cobre y la maduración en algunos casos. El cocimiento de la piña tiene como función hidrolizar los fructanos a azúcares simples como fructosa, que son fermentados de

manera natural en un periodo de 1 a 2 días. Las levaduras que fermentan estos azúcares son de diferentes géneros, encontrando en *Agave salmiana* 192 colonias de levaduras, identificando principalmente *Saccharomices cerevisiae*, *Kluyveromices marxianus*, *Clavispora lusitaniae*, *Saccharomyces exyguus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia kluyveri* y *Candida ethanolica* (Verdugo y col. 2012).

Cabe señalar que una de las características distintivas de estas bebidas es su sabor y olor que los adquiere en el cocinado de la piña, la fermentación de azúcares y el destilado, considerando que algunos otros olores y sabores son propios del mismo Agave.

4.2.3. Pulque

El origen del pulque aún es desconocido, sin embargo, es considerado como una de las bebidas tradicionales más importantes de México. Éste se obtiene de la fermentación de la savia mejor conocida como aguamiel, la cual es extraída de distintas variedades de agave o maguey pulquero; el producto final presenta una consistencia espesa y viscosa, de color blanco y sabor un poco agrio y ligeramente acida con una graduación alcohólica de entre 4° y 7° que históricamente ha sido consumida desde tiempos prehispánicos (Escalante y col. 2016).

Los aztecas distinguían diferentes tipos de pulque: “metoctli” o vino de agave, “iztacoctli” o vino blanco, y “teoctli” ceremonial ó vino dios. Para Lappe-Oliveras la palabra “pulque” se deriva de la palabra “polihquioctli” con la que se designaba al

pulque descompuesto de sabor y olor desagradable. Durante la colonización española la producción de pulque fue una de las principales actividades económicas y la bebida alcohólica más popular, llevando a la creación de las haciendas pulqueras principalmente en el centro de la meseta mexicana que incluye a los actuales estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Michoacán y Querétaro.

4.3. Situación actual del agave en México

El agave es la materia prima para la producción de tequila y mezcal. Existen aproximadamente 200 especies de agave distribuidas en todo el país, y de cada especie se produce un destilado distinto (**Figura 2**). México posee la denominación de origen de ambas bebidas, tanto de tequila como del mezcal que son altamente apreciadas en el mercado internacional. En el 2016 se reportaron 111,420 hectáreas sembradas, 89.71% de la superficie se encuentra mecanizada, 51.89% cuenta con tecnología aplicada a la sanidad vegetal, mientras que 67.78% del territorio sembrado con este cultivo contó con asistencia técnica. En este mismo año la exportación mexicana de tequila representó un valor de 1203 millones de dólares, en el caso del mezcal, se exportaron 26 millones de dólares principalmente a los países de Estados Unidos, Taiwán y miembros del bloque de la Unión Europea (Calzada y col. 2017).

4.3.1 Cultivo de agave en el estado de Michoacán

Michoacán cuenta con 4 mil hectáreas sembradas de agave en 37 municipios, ocupando el quinto lugar nacional en producción con 48 mil toneladas por año

(PROVINCIA, 2017). Durante el transcurso del año 2017, se sembraron en el estado alrededor de 300 hectáreas de maguey mezcalero, esta superficie representa el 60 por ciento de los requerimientos mínimos del estado en la superficie cultivada con este producto. A pesar de las dimensiones de agave cultivada en el estado, representa poca cantidad de hectáreas sembradas no alcanzando para atender los requerimientos de la materia prima de las vinatas en operaciones, que en promedio se encuentran en un 50% de su capacidad de destilación (Alfaro, 2017).

Distintos son los municipios en Michoacán que se dedican al cultivo de agave para la producción de bebidas espirituosas, el municipio de Sahuayo es responsable de la producción de tequila y mezcal colocándolo como punto de partida de rutas gastronómicas en el estado. Con apenas 15 años de experiencia, los maestros mezcaleros aplican técnicas tradicionales para jimar, cocinar y destilar agaves. En el municipio de Jiquilpan la producción artesanal del mezcal se realiza como hace 100 años: a la olla, en hornos de cavados forrados en piedra volcánica, por lo que de aquí proviene el mezcal más buscado. El municipio de Oponguio es poco conocido, sobre todo por realizar visitas a la fábrica de mezcal “paloma mensajera” donde su destilado se lleva a cabo en un alambique de madre antigua, obteniendo uno de los mezcales más suaves y ricos de la región. Por otro lado, el municipio de Churintzio es un lugar que se ha dado a conocer por la excelencia del tequila, bebida que lo ha convertido en el segundo productor de Michoacán. Al sur de la ciudad de Morelia, se encuentra piedras de lumbre, una región conocida por la cocción de agave que ahí se realiza desde hace ya cuatro

siglos. El municipio de Maravatio cuenta con un valle verde que está cruzado por arroyos y cascadas entre los que crece el agave azul para la producción de tequila, con sabores ahumados y un aroma a madera gracias a sus hornos de mampostería (Damián y Sánchez, 2017).



Figura 2 Distribución del cultivo de agave en México

Jalisco representa el área de cultivo de agave más extensa en el país gracias a la producción del tequila. Estados como Michoacán Oaxaca, Sonora y Guerrero además de la producción de tequila, han establecido cultivo de agaves para la producción de mezcal y pulque (Biodiversidad mexicana, 2005).

4.4. Problemática en el establecimiento de nuevas zonas de cultivo de agave

4.4.1 Estado nutrimental del suelo

Dentro de las prioridades en los sistemas agroecológicos son el mejoramiento y la fertilidad de los suelos, junto a la preservación de la agrobiodiversidad, un adecuado balance de nutrientes y vida en el suelo son condiciones importantes para garantizar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas (Funes-Monzote y col. 2009).

La luz es un factor esencial en el ciclo de vida de las plantas, sin embargo para completar su ciclo se necesitan de dieciséis elementos químicos para su metabolismo, crecimiento y desarrollo. El Carbono (C), Oxígeno(O), y el Hidrogeno (H) forman parte de los elementos esenciales y constituyen el 95% del peso seco de una planta. Los elementos restantes solo representan entre el 3 y el 5% del peso seco y están conformados por nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe) principalmente. Todos estos elementos se encuentran en cantidades suficientes en los suelos o son aplicados si el suelo de manera natural no puede abastecer las necesidades de las plantas. Cuando un elemento no está presente en cantidades suficientes para la planta, puede haber un funcionamiento restringido. En las plantas de agave se ha observado que cuando el suministro de nitrógeno es limitado, el crecimiento disminuye y el follaje comienza a tomar un color verde-amarillo. En una deficiencia grave de nitrógeno, las plantas envían el nitrógeno presente en hojas maduras hacia las hojas jóvenes afectando negativamente los rendimientos. Para otros nutrimentos, los síntomas

visuales que presentan las hojas no pueden asociarse a un elemento en particular (Zuñiga-Estrada, 2013).

En Michoacán, la producción de agave para la obtención de bebidas espirituosas ha incrementado en la última década. Sin embargo el uso desmedido de agroquímicos de origen sintético ha degradado la calidad de los suelos para el cultivo de hortalizas de interés comercial. En el municipio de Epitacio Huerta, Michoacán, se cultivan diferentes hortalizas para el comercio, entre ellos, se encuentra el Maíz y más recientemente el cultivo de agave, especialmente el utilizado para la producción de pulque. Sin embargo, el uso desmedido de agroquímicos en la región ha ocasionado el desgaste de los suelos. Un análisis de las propiedades nutrimentales en diferentes zonas del municipio ha mostrado una presencia de fósforo de 25 ppm, cantidad adecuada para el cultivo, así como el contenido de magnesio con 360 ppm. Por otro lado, nutrientes esenciales como es Potasio y Nitrógeno se encuentran en cantidades deficientes para el establecimiento del cultivo de agave, con 46 ppm y 25 ppm, respectivamente. Además determinaciones del pH en el agua de riego, así como en el suelo de cultivo muestran acidez, debido al exceso de la aplicación de agroquímicos, con pH de 4.3 a 4.8, ocasionando retraso en el desarrollo de las plantas (Fernandez-Perez, 2017).

4.4.2. Plagas y enfermedades del agave

Las enfermedades de las plantas son sin duda consideradas como uno de los factores que afectan severamente a la producción agrícola. El cultivo de agave no

ha escapado a esta situación ya que en años recientes se ha visto afectado por una serie de fitopatógenos causando la muerte de las plantas (Martínez y col. 1998).

El hongo del género *Cladosporium* es conocido por ser un endófito común en diferentes plantas de interés comercial, sin embargo algunas especies pueden actuar como organismos oportunistas asociados a manchas foliares y otras lesiones similares en frutos de plantas con importancia agronómica (Schubert, 2005). *C. herbarum* ha sido documentado como un patógeno oportunista aislado del agave americana cultivado en Italia (**Figura 3A**) (Bensch y col. 2012). Sin embargo, la incidencia de cladosporiosis en plantas de Agave cultivadas en Latinoamérica ha sido poco descrita. Algunas regiones de México tales como Jalisco y Oaxaca dependen económicamente de los cultivos de Agave para comercializar destilados tradicionales. De este modo, la identificación de sus principales fitopatógenos, así como la formulación de alternativas para su biocontrol serían valiosas.

Por otro lado, la marchitez causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* es uno de los problemas fitosanitarios que afecta significativamente la productividad del agave tequilero; el proceso de infección se inicia en las raíces, posteriormente se observa un enrollamiento y muerte en las puntas de las hojas, que culmina con la marchitez de toda la planta (Vega-Ramos y col. 2013). Esta problemática fitosanitaria también se presenta en plantaciones de *A. cupreata* en Michoacán (**Figura 3B**).

Además de las enfermedades causadas por hongos, está la presencia de plagas causantes de daño en cultivos de interés comercial. En el estado de Guanajuato, el cultivo de agave está siendo afectado por diferentes plagas que están causando daños considerables. Entre las principales plagas destacan la escama amarilla causante de daño en ambos lados de las pencas donde succiona la savia de las plantas dando entrada a hongos fitopatógenos, el piojo arinoso que ataca principalmente la zona radicular, la base de las hojas e incluso se ha detectado ocasionando daño en las hojas del cogollo (González y col. 2007), y el picudo del agave, su daño inicial se nota en perforaciones y secreciones gomosas en la piña y penca causando pudrición. Debido a los daños que causan las plagas y enfermedades en el cultivo de agave, se han buscado estrategias de manejo que buscan reducir los niveles de daño a través de muestreo e identificación temprana del agente causal. Existen en el mercado algunos fungicidas e insecticidas de origen sintético que se han usado en plantaciones de agave, obteniendo resultados poco prometedores (**Tabla 1**).



Figura 3 Hongos fitopatogenos causantes de daño en plantaciones de agave.

A) Penca de agave infectada con el hongo fitopatógeno *Cladosporium*, se encuentra en la superficie de las hojas de los agaves causando pudrición blanda. Se considera un hongo oportunista. **B)** Planta de agave infectada con *Fusarium oxysporum*. Los síntomas de la infección es marchites de las pencas, además de clorosis en una infección temprana. SAGARPA. 2011; Trinidad cruz y col. 2017.

4.4.3. Estrategias agronómicas para el manejo del Agave

Se han realizado esfuerzos para la el control de plagas y enfermedades en cultivos de importancia económica. En el agave al establecer una nueva plantación, se recomiendan los diagnósticos fitosanitarios a los hijuelos que

formaran parte de la nueva zona de cultivo, esto con la finalidad de evitar la plantación de hijuelos con presencia de patógenos.

Tabla 1. Fungicidas e insecticidas usados en plantaciones de agave

I.A.	DOSIS	USO	EFFECTOS SECUNDARIOS
BIFENTRINA	20-30 Kg/ha	Aplicación en la base de la planta para el control de la gallina ciega	•Acumulación en sangre, causa efectos tóxicos
TCMTB+ MTC	1.5-2 L/ha	Contra pudrición del cogollo y raíz causado por <i>fusarium</i> spp	•Irritante
ZETA-CIPERMETRINA	200-300 ml/ha	Uso contra el escarabajo rinoceronte (<i>Strategus aloeus</i>)	•Afección a la microflora del suelo •Irritación en piel y ojos

TCMTB + MTC : 2-(tiocianometiltio) benzotiazol + metilen bistiocianato

Algunos de los agroquímicos de origen sintético usados para el tratamiento de plagas y enfermedades en el cultivo de plantas de interés comercial como el agave son la Bifentrina, empleada para enfrentar problemas de gallina ciega, TCMTB + MTC (2-(tiocianometiltio benzotiazol) + metilenbistiocianato) para tratar la pudrición del cogollo causado por *Fusarium*, uno de los principales hongos

fitopatógenos causantes de pérdidas en el agave, y la Zeta-Cipermetrina para el combatir al escarabajo rinoceronte (COFEPRIS, 2008). Sin embargo el control convencional de hongos y plagas del agave no siempre es efectivo, además de generar un incremento en los costos de producción y daños al medio ambiente (Bernal-Alcocer y col. 2005).

4.5. Alternativas al uso de agroquímicos de origen sintético

4.5.1. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

En años recientes, se ha retomado el interés por utilizar bacterias promotoras del crecimiento en la producción de cultivos. Estas bacterias se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Chanway y col., 1989).

Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal, debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Boonjawat y col., 1991; Elmerich y col., 1992; Döbereiner y col., 1995), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1998), solubilización de minerales y nutrimentos (Crowley y col., 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer y col., 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede y col., 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan y col., 1996b).

Estudios confirman que la inoculación de formulaciones con bacterias promotoras de crecimiento vegetal ha mostrado efectos positivos en la agricultura sobre el rendimiento y calidad de cultivos. Martínez Rodríguez y colaboradores en el 2014 mostraron el efecto benéfico de bacterias endófitas aisladas de la base de las hojas de plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul mediante diversos mecanismos de estimulación, mejorando el crecimiento de las plantas. Debido a que el género agave incluye varias especies de importancia económico, social y cultural para las personas, y ya que las plantas de agave tienen gran relevancia en México por ser considerado el punto de origen de la evolución y diversificación de este género, encontrar alternativas que mejoren el desarrollo del agave es una tarea primordial para el manejo de este cultivo.

4.5.2. Bacterias endófitas cultivables a partir de la base de hojas de *Agave tequilana* y su papel como promotores del crecimiento de las plantas

Martínez Rodríguez y colaboradores en el 2014 analizaron un total de cien plantas de *Agave tequilana* Weber var. azul de 6.5 años de edad, obtenidas de una plantación experimental en el estado de Nayarit, México para la obtención de bacterias endófitas con posible efecto promotor del crecimiento vegetal. Las hojas de los agaves fueron removidas para obtener únicamente las piñas de las que se analizó el jugo extraído de 100 gramos de tejido de la base de las hojas. El jugo obtenido se sometió a dilución seriada en solución salina al 0.85% para después plaquear cajas de agar soya tripticaseina (TSA), agar estándar (STD) y agar MRS.

Se obtuvieron un total de 350 microorganismos, a partir de los cuales, mediante morfología colonial y tinción gram, se seleccionaron 65 aislados representativos.

La capacidad de los microorganismos para promover el crecimiento vegetal se analizó mediante la determinación de los parámetros de fijación de nitrógeno, producción de ácido indol acético (IAA) y la capacidad de solubilizar fosfatos. (**Tabla 2**). Los aislados analizados presentaron la capacidad de fijar nitrógeno, mostrando los mejores resultados *Acinetobacter* sp. JM58. Estos resultados muestran la capacidad de bacterias diazotrofas endófitas reportadas en la promoción del crecimiento de aquellas plantas en las que habitan (Sachdev y col., 2008; Doty y coll.2009; López y col., 2011; Bulgarelli y col., 2013). Por otro lado, *Enterococcus casseliflavus* JM47 y *Klebsiella oxycota* JM26 mostraron una producción de IAA. Ya se ha reportado la capacidad de *K. oxycota* en la producción de esta fitohormona (Jha y Kumar; 2007; Liu y col. 2013).

Tabla 2. Actividad de aislados endófitos en la promoción del crecimiento de plantas.

Cepa bacteriana	% de fijación de nitrógeno	Producción de IIA (ppm)	Índice de solubilización de fosfato
<i>Acinetobacter baumannii</i> JM12	0.16 (\pm 0.04)	4.1 (\pm 0.07)	8.9 (\pm 0.2)
<i>Acinetobacter</i> sp JM58	1.31 (\pm 0.36)	5.7 (\pm 0.62)	9.7 (\pm 2.6)
<i>Klebsiella oxycota</i> JM26	0.13 (\pm 0.08)	14.4 (\pm 0.56)	3.4 (\pm 0.5)
<i>Enterococcus casseliflavus</i> JM47	0.50 (\pm 0.06)	16.7 (\pm 1.04)	6.3 (\pm 0.2)

Para el índice de solubilización de fosfatos, *Acinetobacter* sp. JM58 y *Acinetobacter baumannii* JM12 presentan los valores más altos en el índice de solubilización, con 9.72 y 8.9 ± 0.2 respectivamente. Muchos microorganismos endófitos de plantas tienen la capacidad de solubilizar fosfatos (De Lima y col., 2011). De acuerdo a reportes, la capacidad de solubilizar fosfatos puede estar presente en microorganismos originarios del suelo o de aquellos que se encuentran presentes en la rizósfera.

4.5.3. Incremento de biomasa de plantas de Agave por la bacteria endófito *Bacillus tequilensis*, promotoras del crecimiento vegetal

Las plantas son naturalmente colonizadas por bacterias endófitas que habitan los espacios internos sin causar efectos de lesión en las plantas huésped (James, 2000). Las bacterias endófitas que pasan un tiempo en el suelo, entran en la raíz y algunas logran propagarse por todos los tejidos de las plantas, pasando a colonizar las semillas para ser transferidas a la siguiente generación de plantas (Reinhold y Hurek, 2011). La cepa de *Bacillus tequilensis* fue aislada de tejidos de plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul la cual al ser inoculada en plantas de agave, se observa un incremento de biomasa después de dos meses de realizada la inoculación de 1.63 g (**Figura 4**). Por otro lado, plantas que fueron tratadas con una solución nutritiva, presentaron un incremento de biomasa de 0.83 g, además, el efecto de la inoculación de la bacteria no endófito *Escherichia coli* mostró un incremento de biomasa de 0.71 g, y plantas que fueron tratadas únicamente con agua mostraron un aumento de biomasa de 0.15 g. Esto demuestra el efecto promotor que tiene la cepa de *Bacillus tequilensis* al incrementar la biomasa en plantas de agave después de dos meses de tratamiento (Martínez Rodríguez y col. 2016).

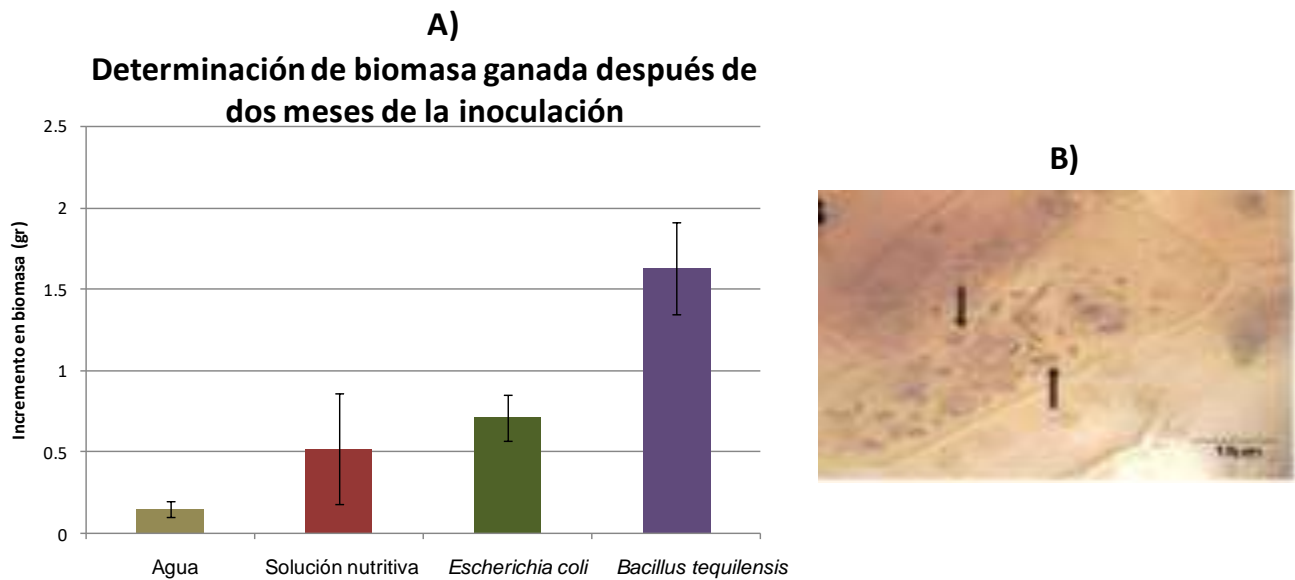


Figura 4 Efecto de promoción de crecimiento de *Bacillus tequilensis* en plantas de *Agave tequilana*.

A) La capacidad de promoción de crecimiento por parte de la cepa de *Bacillus tequilensis* se observa en la barra morada, mostrando un incremento de biomasa de 1.6 g, biomasa dos veces mayor a la ganada por las plantas que fueron tratadas con la cepa de *Escherichia coli* o con una solución nutritiva (barras verde y roja, respectivamente). Por otro lado, las plantas tratadas únicamente con agua, muestran un aumento de biomasa de 0.15 g, significativamente menos que las plantas que fueron tratadas con la cepa de *B. tequilensis*. B) Presencia de la cepa de *B. tequilensis* en células corticales de raíz de plantas de agave (Beltran Garcia y col. 2017).

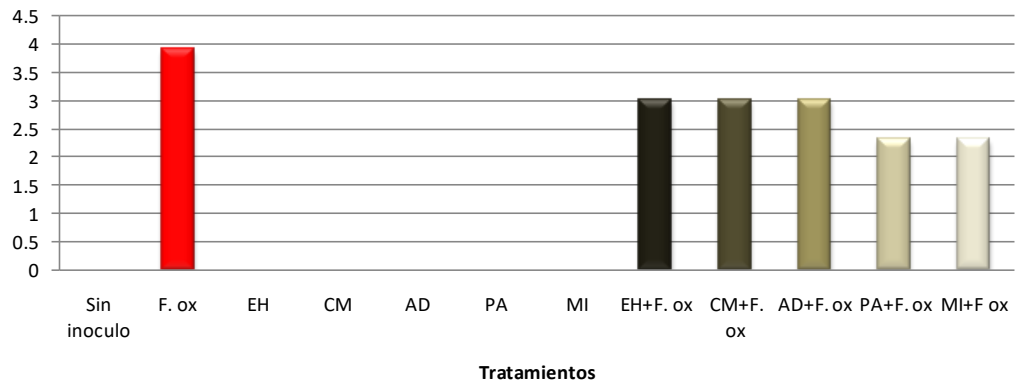
4.5.4. Biocontrol de *Fusarium oxysporum* a través de la micorrización de consorcios microbianos en plantas de *Agave cupreata*

Durante el año 2013, diversos municipios de Michoacán obtuvieron la denominación de origen mezcal. Debido a esto, la superficie cultivada de agave incremento, trayendo consigo la necesidad de efectuar un mejor manejo fitosanitario para mantener la sustentabilidad de este cultivo (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013). El aumento en la superficie de cultivo incrementa de manera potencial la incidencia de enfermedades como ha sucedido en plantas de *Agave tequilana* (Ávila-Miranda y col., 2010). El control convencional de hongos fitopatógenos a través de fungicidas generan problemas al ambiente, deterioran el suelo, generan resistencia e incrementan los costos de producción (Bernal-Alcocer y col., 2005)

En las últimas décadas, el control de hongos fitopatógenos ha sido a través del uso de microorganismos benéficos los cuales suprimen la densidad de población ó el impacto de patógenos, por lo que reduce su abundancia o efecto dañino (Eilenberg, 2006). Dentro de los microorganismos con efecto de biocontrol se encuentran los hongos micorrizicos arbusculares. Diversos reportes indican que plantas micorrizadas pueden originar en la mayoría de los casos una reducción de la incidencia y/o severidad de las enfermedades causadas por diversos hongos fitopatógenos del suelo incluyendo a *Fusarium oxysporum*. (Akhtar y Siddiqui, 2008; Saldajeno y col., 2008; Tripathi y col., 2008). Consorcios de hongos nativos de diferentes zonas de Michoacán fueron evaluados para determinar su capacidad de control de *Fusarium oxysporum* mediante la determinación de la severidad del

daño causado en plantas de *Agave cupreata*. Las mezclas de los hongos micorrizicos arbusculares denominados como El huzachal (EH), Cerro del metate (CM) y Agua dulce no mostraron disminución de la severidad del daño (**Figura 5**), esto de acuerdo a la escala de De cal y col. 2000. Por otro lado, el consorcio de hongos micorrizicos arbusculares denominados como Paso ancho (PA) además de una mezcla de micorrizas comerciales, mostraron una disminución de la severidad del daño causado por *Fusarium oxysporum* en las plantas de *Agave cupreata*.

Severidad de la enfermedad después de 240 días de realizar la inoculación



Escala de daño:

- 1: Planta sana
- 2-2.9: Mas de una hoja amarilla y primer hoja muerta
- 3-3.9: Hojas inferiores muertas y algunas hojas superiores amarillas

EH: El huizachal

PA: Paso ancho

CM: Cerro del metate

AD: Agua dulce

MI: Micorriza comercial

F ox: *Fusarium oxysporum*

Figura 5 Biocontrol del Hongo Fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por mezclas de hongos micorrizocos arbusculares.

Biocontrol de los diferentes consorcios en el daño de severidad causado por *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave cupreata* (EH + Fox, CM + Fox, AD +Fox, PA+Fox, y MI +Fox) (Trinidad Cruz y col. 2017).

V.- JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia económica que representa el agave, como primer elemento en la cadena de valor de diversos productos, destacando las bebidas alcohólicas, es necesario encontrar alternativas para el manejo de este cultivo, sobre todo aquellas tendientes a mejorar su competitividad, en donde uno de los puntos críticos sea el generar cosechas en menor tiempo y/o plantas de mayor tamaño.

Una alternativa para mejorar el desarrollo vegetal es el uso de microorganismos promotores de crecimiento, los cuales aportan nutrientes indispensables, sintetizan reguladores de crecimiento, y protegen contra patógenos; permitiendo así, un manejo sustentable del cultivo y garantizando su inocuidad para su uso en la industria de bebidas.

Por lo tanto, es de vital importancia encontrar microorganismos promotores del crecimiento adecuados para el agave, y propiciar de esta forma mayor interés por el cultivo y manejo de la planta, con lo cual se contribuirá además en la conservación de los recursos silvestres.

VI. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar rizobacterias del agave que favorezcan el desarrollo vegetal

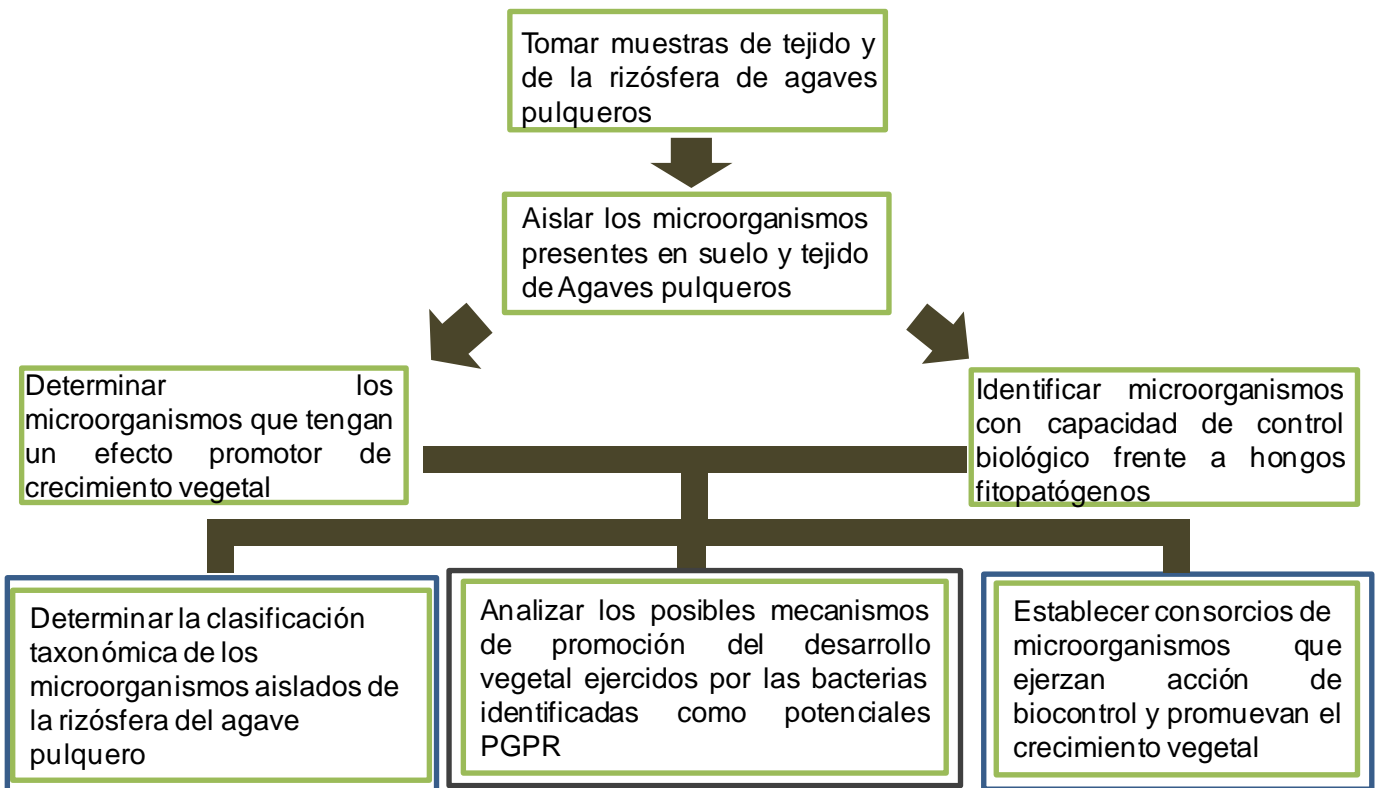
VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1.- Identificar y determinar la clasificación taxonómica de los microorganismos con efecto promotor del crecimiento vegetal, presentes en la rizósfera del Agave pulquero

2.- Establecer mezclas de microorganismo con efecto promotor del desarrollo vegetal y/o biocontrol de hongos fitopatógenos presentes en la rizósfera y tejido de agave pulquero.

3.- Analizar los posibles mecanismos de promoción del desarrollo vegetal ejercidos por las bacterias identificadas como PGPR.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IX. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Material biológico

- *Fusarium oxysporum*: Hongo fitopatógeno utilizada como control en los ensayos de control biológico. Causa daño en penca y pudrición del cogollo de plantas de Agave. Donada por la doctora Fabiola del laboratorio de fitopatología del centro de innovación y desarrollo agroalimentario del estado de Michoacán (CIDAM) (Figura 6).
- *Trichoderma viridae*: Utilizado como antagonista del desarrollo de hongos fitopatógenos en los ensayos de control biológico. Cepa comercial (Figura 7).
- *Arthrobacter agilis* UMCV2: Utilizada como control positivo en los ensayos de promoción del desarrollo vegetal y reducción de hierro, estimula el desarrollo a través de la producción de dimetilhexadecilamina para la solubilización y asimilación de hierro. Donada por el doctor Valencia Cantero del laboratorio de ecología microbiana del instituto de investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Figura 8A).
- *Bacillus* sp. L264: Empleada como control negativo de la reducción de hierro. Donada por el doctor Valencia Cantero del laboratorio de ecología microbiana del instituto de investigaciones Químico-

Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Figura 8B).

- *Burkholderia* sp. CCPES2: Empleada como control positivo en la producción de proteasas. Cepa donada por el doctor Santoyo del laboratorio de ecología microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Figura 9).

9.1.1. Colecta de muestras

Las muestras fueron obtenidas de diferentes zonas de cultivo de agave pulquero, en el municipio de Epitacio Huerta, Michoacán.

- Tejido: Se utilizó tejido de las hojas de diferentes plantas de agave pulquero. Las muestras fueron tomadas al azar a diferentes alturas de las hojas
- Suelo: Se tomaron 300 g de muestra, las cuales fueron tomadas del suelo que se encontraba alrededor de las raíces de plantas de agave pulquero.

9.1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados y sus componentes provienen de los laboratorios Bioxon de México S.A., Merck-México S.A.

- A) Caldo Nutritivo (CN): Para 1 litro de caldo nutritivo, pesar 8 g del medio y agregar 1 litro de agua destilada.
- B) Agar nutritivo (AN): Para preparar 1 litro de agar nutritivo, pesar 23 g del medio y adicionar 1 litro de agua destilada.
- C) Caldo soya tripticaseina: Para preparar 1 litro de caldo soya tripticaseina, pesar 30 g del medio y adicionar 1 litro de agua destilada.
- D) Agar soya tripticaseina (TSA): Para preparar 1 litro de agar soya tripticaseina, pesar 40 g del medio y adicionar 1 litro de agua destilada.
- E) Agar de papa y dextrosa (PDA): Para preparar 1 litro de agar de papa y dextrosa, pesar 39 g del medio y adicionar 1 litro de agua destilada.
- F) Medio Murashige and Skoog (MS): Para prepara 1 litro del medio Murashige and Skoog, pesar 10 g de Fitagar, 6 g de sacarosa y 0.9 g de sales basales, adicionar 1 litro de agua destilada.
- G) Agar papa levadura (PY): Para preparar 1 litro de agar papa levadura, pesar 5 g de peptona de caseína, 0.7 g de cloruro de calcio, 3 g de extracto de levadura y 15 g de agar bacteriológico, adicionar 1 litro de agua destilada.
- H) Agar leche (AL): Para preparar un litro del medio agar leche, pesar 13.5 g y adicionar un litro de agua destilada.
- I) Medio NBRIP (NBRIP): Para preparar un litro del medio NBRIP, pesar 10 g de dextrosa anhidra, 5 g de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, 5 g de $\text{MgCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de KCl, 0.1 g de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y 17 g de agar bacteriológico.
- J) Medio NFB: Para preparar un litro del medio NFB, se preparan por separado los siguientes componentes:

- ❖ Medio base (991 ml): 5 g de ácido málico, 0.5 g de K_2HPO_4 , 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g de NaCl y 0.02 g de $CaCl_2$.
- ❖ Elementos traza (2 ml): 0.2 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.235 g de $MnSO_4$, 0.2 g de H_3BO_3 y 0.24 g de $CuSO_4 \cdot 7H_2O$.
- ❖ Solución Fe EDTA al 1.64% (4 ml)
- ❖ Solución vitamínica (2 ml): Se disuelven 0.01 g de biotina y 0.02 g de piridoxina para un litro de agua destilada.
- ❖ Solución de KOH 0.2 N al 0.5% de azul de bromotimol (2 ml).

Todo se coloca en un matraz y se agregan 18 g de agar bacteriológico.

K) Caldo papa levadura (PY): Para preparar 1 litro de caldo papa levadura, pesar 5 g de peptona de caseína, 0.7 g de cloruro de calcio, 3 g de extracto de levadura y adicionar 1 litro de agua destilada.

L) Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4): Para preparar 1 litro de fosfato de potasio monobásico, pesar 2 g de la sal y adicionar 1 litro de agua destilada.

M) Fosfato de potasio di básico (K_2HPO_4): Para preparar 1 litro de fosfato de potasio di básico, pesar 8 g de la sal y adicionar 1 litro de agua destilada.

N) Agar B de King-Ácido casimino (BK-CAS): Para preparar un litro del medio de cultivo BK-CAS se realiza en dos pasos:

- ❖ Solución colorante CAS: 0.0605 g de CAS en 50 ml de agua destilada y 10 ml de solución Fe III (1mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 10mM HCl).
- 0.0729 g de HDTMA en 40 ml de agua destilada.

- ❖ Medio B de King: 37 g de agar BK y 10 ml de glicerol en 700 ml de agua destilada. 30.24 g de piperitas disueltas en 150 ml de agua destilada. Ajustar pH a 6.8

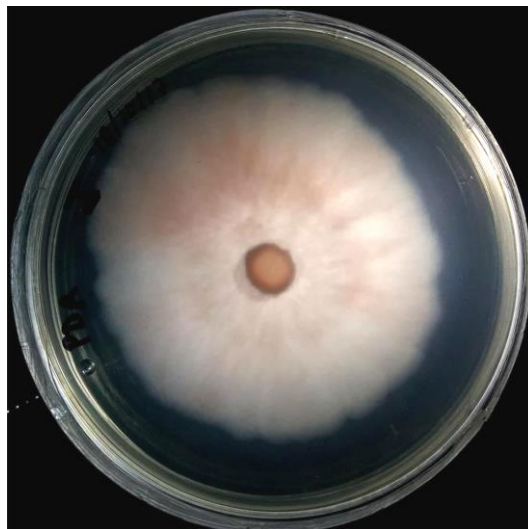


Figura 6 Hongo fitopatogeno *Fusarium oxysporum*.

El hongo de *Fusarium oxysporum* ha sido identificado como uno de los principales hongos fitopatogenos que afecta cultivos de agave. Causa marchitez en las plantas, terminando en necrosis y pérdida total del cultivo.



Trichoderma viridae

Figura 7. *Trichoderma viridae* con capacidad de inhibición del desarrollo de hongos fitopatógenos.

La cepa de *Trichoderma viridae* tiene un efecto de promoción de crecimiento vegetal en diferentes modelos biológicos y se ha demostrado que inhibe el desarrollo de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*.

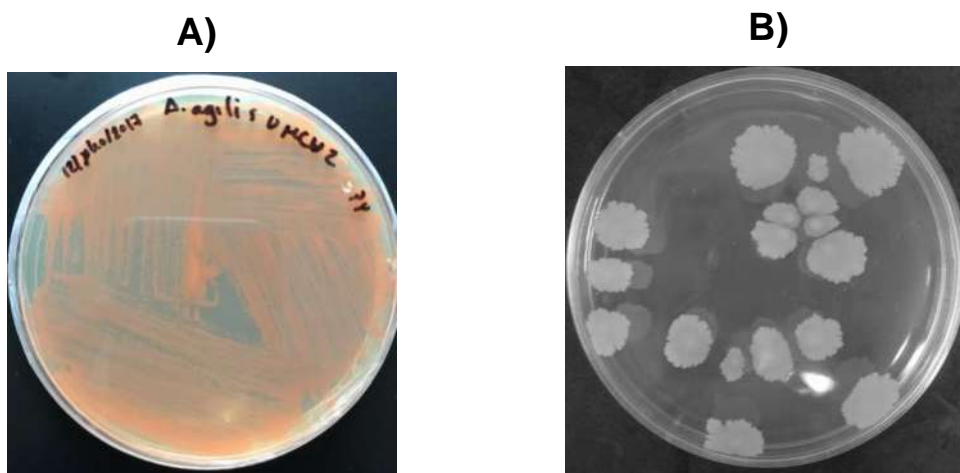


Figura 8. Microorganismos usados como controles en la determinación de la reducción de hierro..

A) La cepa de *Arthrobacter agilis* UMCV2 identificada como una bacteria PGPR, ha mostrado la capacidad de reducir hierro. B) *Bacillus* sp. L264, usada como control negativo en los ensayos de reducción de hierro debido a que no presenta capacidad reductora



Figura 9. *Burckolderia* sp. CCPES2.

La cepa de *Burckolderia* sp. CCPES2 tiene la capacidad de producir proteasas. Usada como control positivo en los ensayos de determinación de producción de proteasas.

9.2. Aislamiento de microorganismos de la rizósfera y de tejido de agaves pulqueros

Para el aislamiento de microorganismos, se preparó una solución madre en solución de fosfatos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) en una relación 1:10, tomando 10 g de muestra por cada 90 ml de solución. La solución madre se colocó en agitación constante durante 30 minutos a 80 rpm, se tomaron alícuotas de 1 ml y se inocularon tubos con 9 ml de solución de fosfatos c/u realizando diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} . Se tomaron alícuotas de 100 μl de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} para inocular cajas de agar nutritivo y agar soya tripticaseína. Las cajas se dejaron a temperatura ambiente hasta la obtención de microorganismos. Los aislados se reinocularon en cajas nuevas con agar para la obtención de aislados puros.

9.2.1. Determinación de la clasificación taxonómica de los microorganismos aislados de la rizósfera del agave pulquero

La clasificación taxonómica de la población microbiana de la rizósfera de agaves pulqueros se realizó mediante la técnica de MALDI-TOF. Para en análisis, las muestras fueron sometidas a un tratamiento previo el cual consistió en lo siguiente:

Los microorganismos a analizar fueron crecidos en cajas con agar soya tripticaseína durante 24 horas a 30°C . Se tomó una colonia y se suspendió en 300 μl de agua ultrapura, 900 μl de etanol grado reactivo fueron agregados para después aplicar vortex durante 5 segundos. Las muestras se sometieron a

centrifugación durante 2 minutos a 12 000 rpm para después retirar el sobrenadante y dejar el etanol residual colocando los tubos invertidos. Un volumen de ácido fórmico el cual dependerá el pelet de microorganismo que se obtenga, se agregó al tubo y se aplicó vortex durante 5 segundos para después agregar el mismo volumen de acetonitrilo, aplicar vortex y centrifugar durante 2 minutos a 12 000 rpm. Se tomó 1 µl del sobrenadante y se colocó en una placa de acero inoxidable para después agregar la matriz (mezcla de solución orgánica de Ácido α-ciano 4-hidroxicinámico y agua) la cual al secarse se co- cristaliza con la muestra. Las muestras se llevaron al analizador TOF (Time Of Flight) autoflex speed, y para su identificación se usó el software MALDI biotyper.

9.2.2. Identificación de PGPR por tamizado en Maíz y Frijol

El agave es una planta cuyo desarrollo vegetal es muy lento, mostrando efectos de crecimiento después de los 2 meses de germinación de las semillas. Debido a esta desventaja que presenta, no es un modelo adecuado para la identificación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Una forma de identificación de microorganismos con estos efectos, es a través de tamizados usando modelos vegetales con ciclos de vida cortos y que muestren efectos de promoción tempranos. Algunos de estos modelos vegetales y que se han usado para la identificación de PGPR, son el maíz y el frijol, donde los parámetros para la determinación de promoción pueden ser medidos a los diez días después de realizada la inoculación.

Se utilizó como sustrato Peat Moss, un conjunto de musgos rico en nutrientes para el desarrollo de plantas el cual se esterilizo durante 3 días consecutivos a 121°C y 15 lb de presión durante un periodo de 1 hora. A las semillas de maíz y frijol se les realizo un tratamiento de desinfección previo que consistió el colocar las semillas en agua durante 30 minutos, se descartaron aquellas que se les rompió la testa para después remover el agua y adicionar un solución de etanol al 70% durante cinco minutos. El etanol fue retirado y las semillas se lavaron con agua destilada hasta no percibir olor. Se agregó una solución de cloro al 10% durante un minuto y se lavaron con agua destilada hasta la eliminación de olor a cloro. Las semillas se colocaron sobre una base de algodón estéril húmedo durante 2 días hasta su germinación. Matraces con 50 ml de caldo nutritivo o caldo soya tripticaseína fueron inoculados con los aislados rizosféricos y puestos en agitación durante 24 horas. El crecimiento de los inóculos se estandarizó a una longitud de onda de $\lambda=590$ nm y 0.6 de absorbencia para después colocar las semillas germinadas durante 30 minutos. El sustrato se colocó en bandejas de plástico previamente desinfectadas y diez semillas por tratamiento se colocaron permitiendo el desarrollo durante diez días, regando con agua estéril cada tercer día. La determinación de promoción de crecimiento se realizó midiendo los parámetros de biomasa, numero de raíces y longitud del brote.

9.2.3. Análisis del efecto de consorcios de microorganismos con potencial PGPR aislados de agave pulquero, en modelo de sábila

Para el análisis de promoción de crecimiento se usó la cepa de *Trichoderma viridae* reportada en otros modelos vegetales como promotora del crecimiento. Los microorganismos con efecto promotor en el modelo de maíz y frijol, se crecieron en matraces de 225 ml con 50 ml de medio de cultivo líquido durante 24 horas en agitación constante a temperatura ambiente. El crecimiento de los microorganismos se ajustó a una absorbencia de 0.6 midiendo a una longitud de onda de $\lambda=590\text{nm}$. Se obtuvieron las esporas de *Trichoderma viridae* realizando un conteo en cámara de Neubauer para preparar inóculos con 200 mil esporas/ml. Las plantas de sábila adquiridas de invernadero, fueron inoculadas con los microorganismos de manera individual, así como con las diferentes mezclas en un volumen de 50 ml por planta. Los inóculos se reforzaron cada diez días al mismo tiempo que se medían los parámetros de biomasa, longitud de la raíz, volumen de raíz y contenido de clorofila. El ensayo se realizó durante un periodo de 60 días.

9.2.4. Evaluación de la capacidad inhibitoria de mezclas de microorganismos para el control de *Fusarium oxysporum* en plantas de agave

La capacidad de inhibir el daño causado por *Fusarium oxysporum* por parte de mezclas de microorganismos en plantas de agave fue analizada. Para ello, se usaron plantas de *Agave tequilana* Weber Var. azul de un año de edad obtenidas de invernadero. Los microorganismos empleados fueron la cepa de *Pseudomonas*

tolaasii WT-09 aislada de suelos de agave pulquero, y la cepa comercial de *Trichoderma viridae* que ha sido reportada con capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos hongos fitopatógenos. Se estableció un sistema de seis tratamientos con un total de seis plantas por tratamiento, quedando de la siguiente manera: Control sin inóculo (C.S.N.); Control Fitopatógeno (C.F.); Control Antagonista (C.A.) Tratamiento 1 (Fitopatógeno /10 días/Antagonista); Tratamiento 2 (Fitopatógeno/Antagonista); tratamiento 3 (Antagonista/10 días/Fitopatógeno). El ensayo se llevó a cabo durante un periodo de 60 días, reforzando el inóculo en las plantas cada 10 días para posteriormente analizar la capacidad de biocontrol de la mezcla de microorganismos sobre el fitopatógeno.

9.2.5. Determinación de la β -actina en el control de *Fusarium oxysporum* por antagonistas en tejido de plantas de agave

Una muestra de 30 mg de tejido de piña de *Agave tequilana* fue colocada en tubos limpios y se adicionaron perlas green bead (Roche) junto con 300 μ l de buffer de elución. Se adicionó al tubo 200 μ l de buffer de unión (Roche) y 40 μ l de proteinasa K. Se aplicó un pulso (6500 rpm durante /1 min) en equipo (Magnalyser, Roche) y se dejó incubar durante 10 min a 70°C. 600 μ l del sobrenadante fueron colocados en tubos nuevos para después agregar 100 μ l de isopropanol. La muestra se colocó en una columna de silica gel y se centrifugo 1 minuto a 7000 rpm. La columna se colocó sobre un nuevo tubo para columna donde se agregó 500 μ l de solución removedora de inhibidores (Roche) y se

centrifugo 1 min/8000 G. En tubo de columna nuevo se realizó un lavado con 500 µl de buffer de lavado (Roche) y se centrifugo 1 min/8000 G. una vez seca la muestra, un volumen de 100 µl de buffer de elución (Roche), se sometió a centrifugación 1 min/8000 G. La concentración de ADN de las muestras se ajustó a 20 ng/µl usando el nanofotometro de IMPLEN y para la cuantificación, las muestras se sometieron a q-PCR utilizando la sonda tipo Tack-Man específica para β- actina de *Fusarium oxysporum*. Las condiciones de reacción usadas en la determinación de la β-actina fueron las que se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones empleadas para la cuantificación de β- actina por

q-PCR

Temperatura	Tiempo
95°C	10 minutos
60°C	30 segundos
72°C	30 segundos
95°C	15 segundos
37°C	Fase de enfriamiento

9.2.6. Determinación de la capacidad de fijar nitrógeno por rizobacterias de suelos de agave pulquero

Para evaluar la capacidad de fijar nitrógeno de los microorganismos con potencial efecto promotor del desarrollo vegetal aislados de la rizósfera de agaves pulqueros, una azada fue tomada de un cultivo fresco y e inoculada por picadura en tubos con medio NFB. Los tubos se dejaron en incubación a 30°C durante 15 días. La capacidad de fijar nitrógeno se observó mediante el viraje de color del medio de verde a un tono azul.

9.2.7. Capacidad de solubilización de fosfatos por rizobacterias con efecto promotor aisladas de suelos de agave pulquero

Los microorganismos fueron inoculados en cajas petri con medio NBRIP el cual contaba con fosfato de calcio como única fuente de fosforo. Las cajas inoculadas por punción, fueron colocadas en incubación a 30°C durante 12 días. La capacidad de solubilizar fosfatos se determinó mediante la medición del radio del halo de aclaramiento. Las mediciones del halo de aclaramiento se realizaron a partir del día 5 y se repitió la medición cada 48 horas.

9.2.8. Análisis del potencial para producir proteasas por las rizobacterias con efecto promotor, aisladas de cultivos de agave pulquero

Cajas con agar leche fueron inoculadas por punción con las rizobacterias con efecto promotor aisladas de la rizósfera de agaves pulqueros. Cada microorganismo fue inoculado en caja petri por triplicado y puestas a incubar durante 3 días a una temperatura de 30°C. La capacidad de producción de proteasas por parte de los microorganismos de estudio se observó mediante la aparición del halo de aclaramiento del medio de cultivo. El potencial de producción se realizó mediante la medición del radio, tomando como centro la zona de inoculación.

9.2.9. Determinación de la capacidad para reducir hierro por parte de los microorganismos PGPR aislados de cultivos de agave pulquero

Tubos eppendorf con 1.5 ml de caldo nutritivo y Nitriloacetato ferrico (Fe-NTA 40 nM) fueron inoculados por azada y puestos en incubación durante 24 horas con los microorganismos con efecto promotor del desarrollo vegetal. A un volumen de 900 µl fue medida su Absorbencia a 590 nm. Posteriormente, 100 µl de ferrosina fueron agregados dejando reaccionar durante 2 minutos para después medir la Absorbencia a 562 nm. La capacidad reductora se analizó mediante la determinación de la reducción específica del hierro.

Tabla 4. Cepas y microorganismos utilizados para la determinación de los posibles mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

Microorganismo	Descripción
<p>MW-01</p> <p>WT-05</p> <p>WT-09</p>	<p>Aislados rizosféricos con efecto promotor, obtenidos de cultivos de agave pulquero en el municipio de Epitacio huerta, Michoacán.</p>

X. RESULTADOS

10.1. Aislamiento e identificación de microorganismos con efecto promotor en cultivos de agave pulquero

Para conocer la población microbiana presente en diferentes zonas de cultivo de agave pulquero, se colectaron muestras de la rizósfera y tejido de los agaves pulqueros de la región. Un volumen de 90 ml de solución de fosfatos se colocó en matraces con 10 g de las muestras obtenidas y se dejó en agitación constante durante 30 min a 80 rpm a temperatura ambiente para la obtención de la solución madre. Muestras de 1 ml fueron tomadas para realizar diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 ml de la solución de fosfatos. Una alícuota de 100 μ l de las diluciones 1×10^{-5} y 1×10^{-6} fue plaqueada en cajas de agar nutritivo y agar soya tripticaseína. Las cajas se dejaron a temperatura ambiente durante 5 días para la obtención de los microorganismos. Los criterios de selección para la obtención de aislados únicos fueron: borde, elevación, color, forma y superficie de las colonias (Koneman y col. 2008). Un total de 37 aislados fueron obtenidos de la rizósfera y del tejido de agaves pulqueros.

Para identificar los microorganismos que tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal presentes en suelos de agave pulquero, los diferentes aislados fueron sometidos a un tamizado en semillas de maíz, una especie monocotiledónea con un mecanismo fotosintético C4 y frijol, una especie dicotiledónea perteneciente al mecanismo fotosintético C3, su

capacidad de estimular el desarrollo vegetal se determinó mediante los parámetros de peso, longitud de la parte aérea y número de raíces. Del total de microorganismos obtenidos 6 mostraron los mejores resultados en los parámetros analizados para la determinación de promoción de crecimiento.

En la **figura 10** se muestran los aislados con los valores más altos obtenidos del tamizado para la identificación de PGPR, determinando la ganancia de biomasa en los dos modelos de Maíz y Frijol, presentando una diferencia significativa por el aislado MW-01 con una biomasa del 261% y 191% respectivamente, valores significativamente mayores que los obtenidos en el control sin inóculo que fueron de 1.3 g en ambos modelos. El aislado WT-05 muestra una estimulación de la ganancia de biomasa del 138% en el modelo de maíz y 181% en el modelo de frijol, valores que se encuentran por encima del control sin microorganismo. Los aislados WT-24, WT-14 y WT-03 muestran una ganancia de biomasa por encima del control sin microorganismo en ambos modelos de frijol y maíz.

En cuanto a la longitud de la parte aérea, en la **Figura 11** el aislado MW-01 presentó ganancias del 256% en el modelo de maíz y de 283% en el modelo de frijol, ganancias que son cerca de 3 veces mayores al control sin microorganismo.

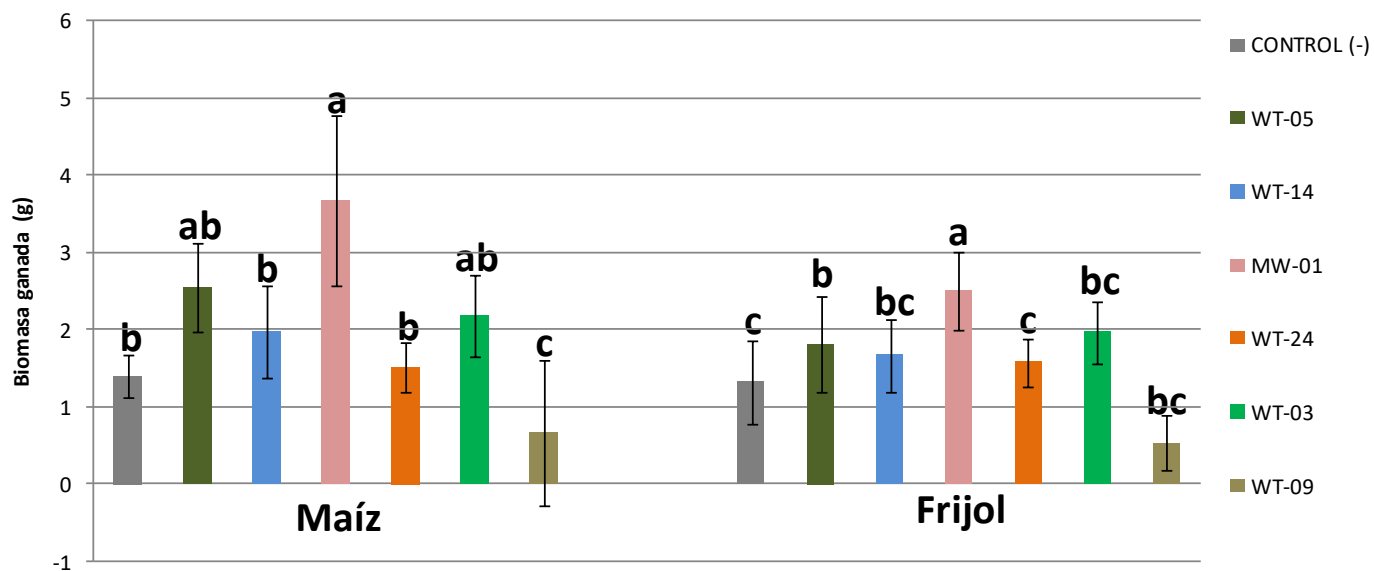


Figura 10. Ganancia de biomasa por la inoculación de microorganismos de suelo de agave pulquero en modelos de maíz y frijol.

Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 8. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado

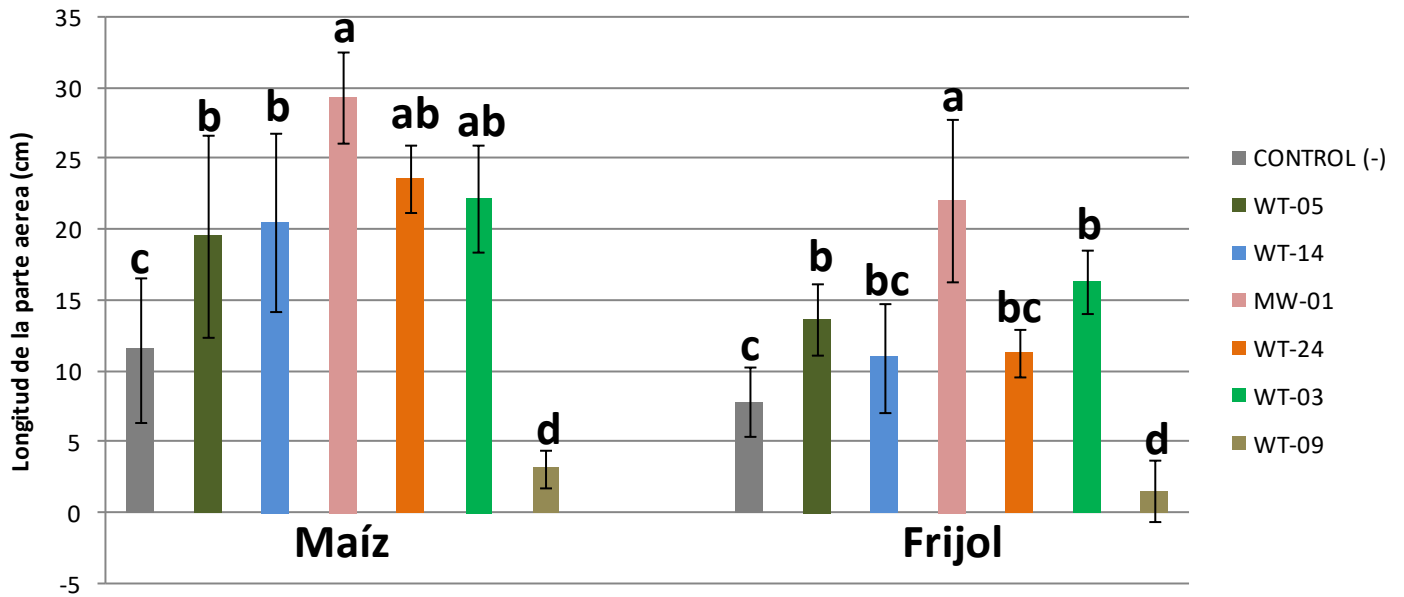


Figura 11. Estimulación de la parte aérea como efecto promotor de los microorganismos presentes en la rizósfera de agaves pulqueros.

Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 8. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado

Además, los aislados WT-24 y WT-03 obtuvieron los mejores resultados promoviendo la longitud de la parte aérea en el modelo de maíz con 205% y 193%, adicional a estos dos microorganismos, el aislado WT-05 muestra una promoción del 173% en la longitud de la parte aérea en el modelo de frijol, incluso mejor que los dos aislados antes mencionados.

Para identificar el efecto promotor de los aislados obtenidos de suelos de agave pulquero, además de biomasa y longitud de tallo, se contaron el número de raíces desarrolladas en ambos modelos biológicos. En este parámetro, el aislados MW-01 muestra nuevamente los valores más altos de promoción con un 263% en el modelo de maíz y 225% en el modelo de frijol, comparado con el tratamiento control sin inóculo que fue de 9 raíces en el modelo de maíz y 12 raíces en el modelo de frijol, estos valores son significativamente mayores (**Figura 12**). El aislado WT-05 presentó valores comparables con el aislado MW-01, mostrando un efecto de promoción del 244% de maíz y 175% en el modelo de frijol, los valores que se obtuvieron en maíz y frijol, con la inoculación de los aislados WT-24, WT-14 y WT-03 muestran de igual manera un efecto promotor comparado con el control sin inóculo. Sin embargo, este efecto de promoción no se observó en las semillas de maíz inoculadas con el aislado WT-09 debido a que presentó dispersiones grandes en los datos obtenidos.

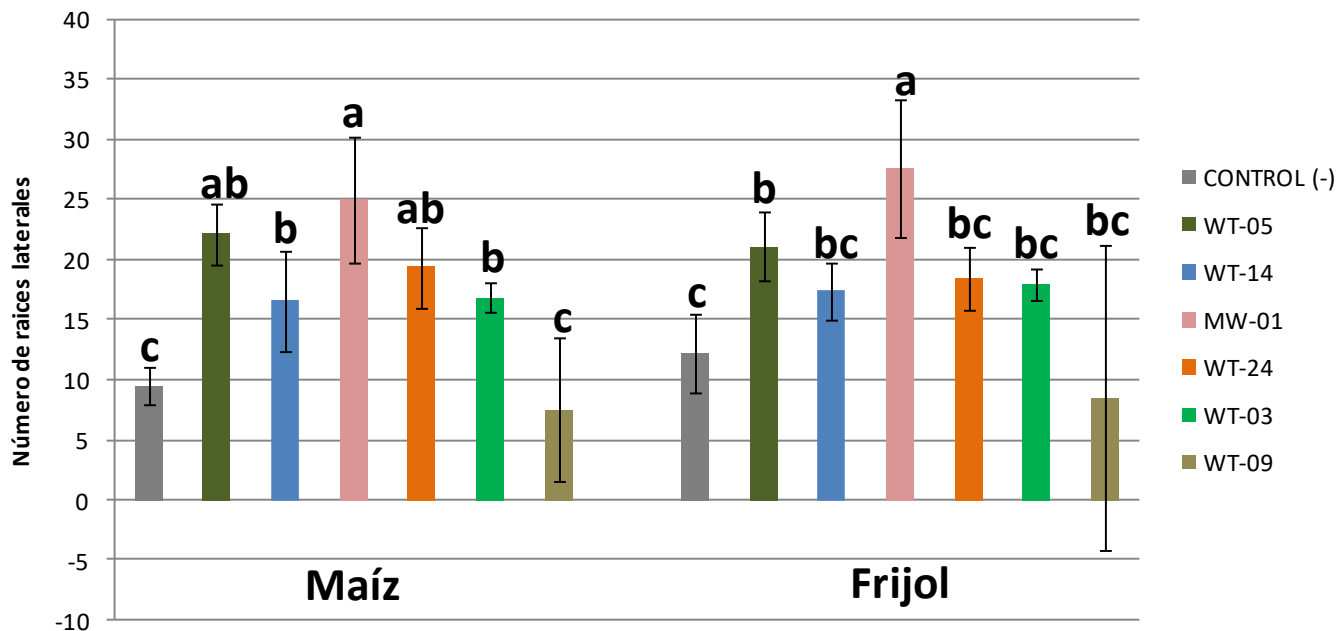


Figura 12. Estimulación de raíces laterales en maíz y frijol por la inoculación de microorganismos de la rizósfera de agave pulquero.

Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 8. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

10.1.1. Identificación de microorganismos con efecto promotor del desarrollo vegetal en cultivos de agave pulquero, usando como modelo *Arabidopsis thaliana*.

Debido a las ventajas que presenta como un ciclo de vida corto y rápido cultivo en condiciones de laboratorio, se usaron semillas de *Arabidopsis thaliana* para la identificación de los aislados de agave pulquero con posible efecto promotor. En la **Figura 13** se muestra el efecto promotor de los aislados con mejor resultado en los modelos de maíz y frijol, observando un mayor efecto de promoción en el tratamiento con el aislado WT-03 con un 100% al determinar la biomasa ganada, esto seguido por los aislados WT-24 con un 94% de biomasa ganada comparado con el control sin inóculo y MW-01 con 82% de biomasa. Sin embargo, al comparar con el tratamiento sin inóculo el cual se muestra en barra color gris, se observa un nulo efecto promotor y ninguna diferencia significativa por parte de los aislados.

10.1.2. Identificación de aislados rizosféricos de agave pulquero para el control biológico de hongos fitopatógenos

Como parte del efecto promotor indirecto de las rizobacterias, se realizó la identificación de los microorganismos capaces de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que ocasionan daño a cultivos de interés agrícola. Los aislados obtenidos se pusieron en confrontación con el hongo *Fusarium oxysporum* y dos hongos aislados de cultivos de agave pulquero. De los microorganismos

estudiados, solo el aislado WT-09 presento capacidad de inhibir el crecimiento de un hongo presente en la superficie de las pencas de agave pulquero (**Figura 14b**). En el caso de *Fusarium oxysporum*, no se logró inhibir su crecimiento con los aislados obtenidos de la rizósfera de agave pulquero, debido a esto se hizo uso de la cepa comercial de *Trichoderma viridae* capaz de inhibir algunos hongos fitopatógenos. Después de 15 días, se observó una disminución del crecimiento del hongo fitopatógeno (**Figura 14c**) al ponerse en contacto con la cepa de biocontrol.

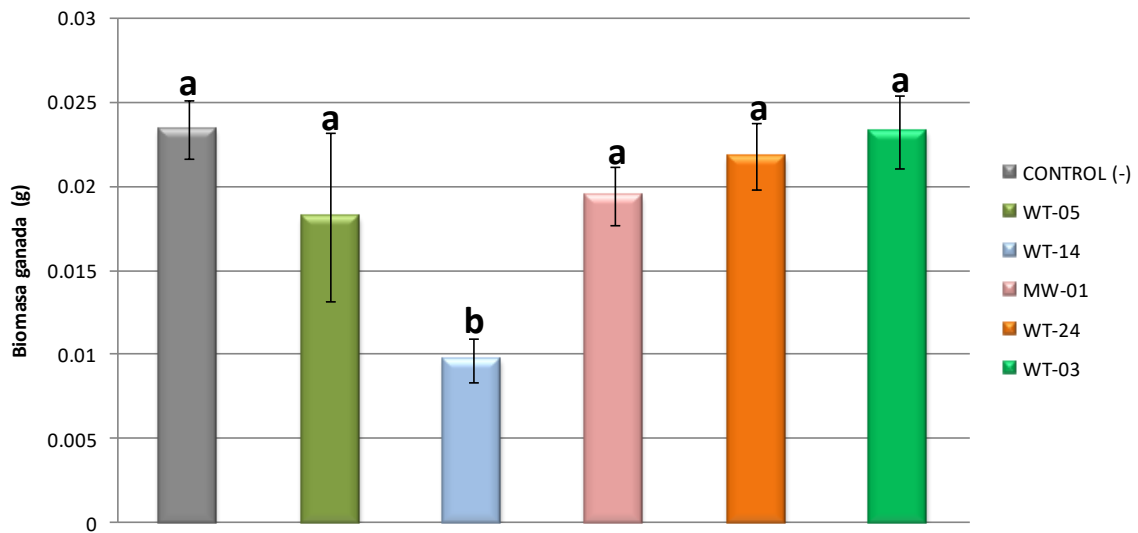


Figura 13. Efecto de la inoculación de los aislados rizosféricos de agave pulquero sobre el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Biomasa en plantas de *Arabidopsis thaliana* al inocularlas con los aislados rizosféricos de agave pulquero. Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 3. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado

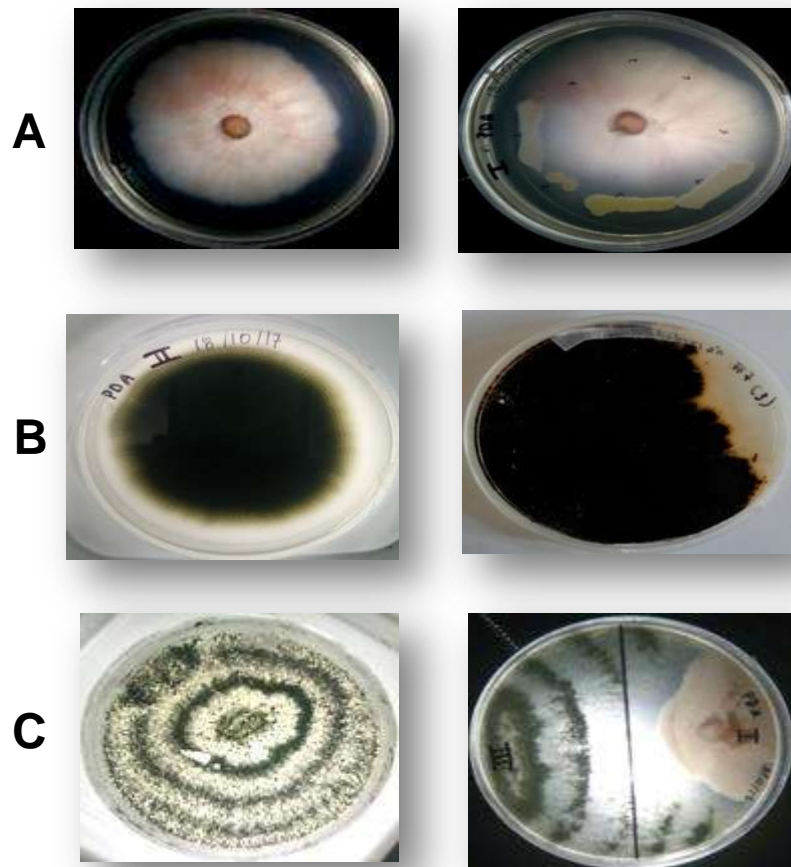


Figura 14. Capacidad de control biológico de rizobacterias de agave pulquero en hongos fitopatógenos.

A) Desarrollo del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en placa con PDA y el efecto de los diferentes aislados rizosféricos sobre su crecimiento. B) Hongo aislado de las pencas de agave pulquero causante de daño en tejido y el efecto del aislado WT-09 sobre su desarrollo. C) *Trichoderma viridae* y su capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en una caja de PDA al ponerlos en confrontación. Se muestran fotos representativas de los diferentes microorganismos.

10.1.3. Identificación taxonómica de la comunidad microbiana presente en suelos de agave pulquero

Para conocer la comunidad microbiana existente en la rizósfera de cultivos de agave pulquero y así como los microorganismos con potencial efecto promotor, además de conocer la diversidad microbiana dominante, se realizó la identificación taxonómica de los aislados mediante la técnica MALDI-TOF, una técnica de identificación microbiana con resultados rápidos. Para el análisis microbiológico y para calibrar el equipo, se usó la cepa de *Serratia marcescens*, en el caso de bacterias, y *Fusarium oxysporum* para la identificación de hongos. Del total de aislados obtenidos, se identificó una población microbiana dominante de *Bacillus* con un 48% de abundancia. Se identificó la presencia de *Pantoea* con un 13% del total de microorganismos analizados y la presencia de *Arthrobacter* con una abundancia de 11%. Con un porcentaje de 5% de abundancia en los suelos de agave pulquero, se identificaron microorganismos del género *Raultella* y *Lactobacillus* y en menor proporción, con un 3%, microorganismos del género *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Campylobacter*, *Streptomyces* y *Brevibacillus*. Además, se realizó la identificación de los dos hongos aislados de cultivos de agave que están presentando daño en el desarrollo de las plantas. El hongo presente en la superficie de las pencas, formador de manchas negras sobre la superficie de las mismas ocasionando daño, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis del MALDI-TOF, corresponde a *Cladosporium cladosporioides*. El hongo aislado de la lesión de una penca, ocasionando daño en tejido, fue identificado como *Penicillium dierckxii* (**Figura 15**).

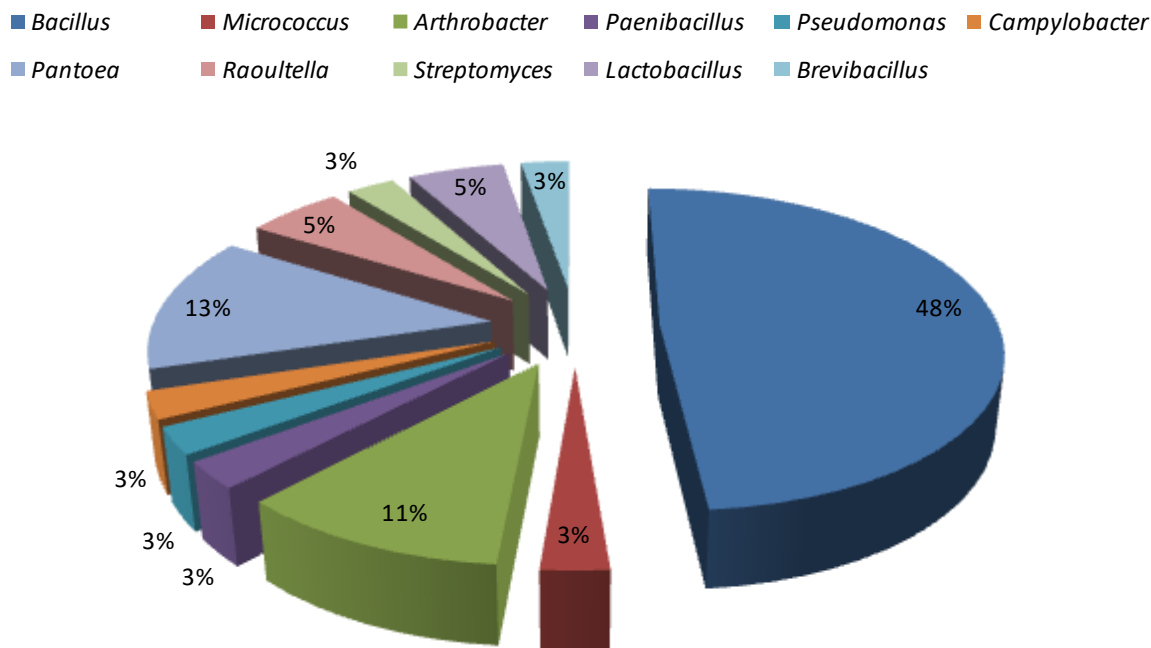


Figura 15. Diversidad microbiana presente en suelos de agave pulquero identificados por MALDI-TOF.

La población microbiana de la rizósfera de agaves pulqueros está conformada por microorganismos del género: *Bacillus*, *Pantoea*, *Micrococcus*, *Raultella*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus* y *Campylobacter*

Sin embargo, de los microorganismos identificados, los que presentaron mejor efecto promotor corresponden a las cepas de *Bacillus cereus* WT-03, *Bacillus megaterium* WT-05, *Arthrobacter* sp. MW-01, *Pseudomonas tolaasii* WT-09, *Bacillus mycoides* WT-14 y *Bacillus mycoides* WT-24.

Tabla 5. Resultados del análisis por MALDI-TOF de los aislados rizosféricos

MUESTRA	RESULTADO MALDI-TOF	SCORE
WT-01	<i>Bacillus cereus</i>	2.450
WT-02	<i>Micrococcus luteus</i>	2.240
WT-03	<i>Bacillus cereus</i>	1.830
WT-04	<i>Bacillus mycoides</i>	1.900
WT-05	<i>Bacillus megaterium</i>	1.690
WT-07	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.960
WT-08	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1.920
WT-09	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	1.930
WT-10	<i>Bacillus cereus</i>	1.740
WT-11	<i>Campylobacter jejuni</i>	1.250
WT-13	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1.530
WT-14	<i>Bacillus mycoides</i>	1.820
WT-15	<i>Bacillus mycoides</i>	1.950
WT-16	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.690
WT-17	<i>Arthrobacter histidinovorans</i>	1.630
WT-18	<i>Raoultella terrigena</i>	2.140
WT-19	<i>Raoultella terrigena</i>	2.350
WT-22	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.740
WT-23	<i>Streptomyces avidinii</i>	1.500
WT-24	<i>Bacillus mycoides</i>	1.810
WT-25	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.480
WT-28	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	1.210
WT-29	<i>Bacillus mycoides</i>	1.840
WT-31	<i>Bacillus cereus</i>	1.770
WT-32	<i>Bacillus cereus</i>	2.010
WT-33	<i>Bacillus cereus</i>	1.950
WT-34	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.230
WT-35	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	1.800
WT-37	<i>Bacillus cereus</i>	1.900
WT-38	<i>Bacillus cereus</i>	2.050
WT-39	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.390
WT-40	<i>Bacillus cereus</i>	1.860
WT-41	<i>Bacillus muralis</i>	1.34
WT-42	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i>	1.420
WT-43	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1.480
WT-44	<i>Bacillus cereus</i>	2.420

MW-01	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1.750
HONGOS		
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	1.180
Mancha negra en penca	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1.330
Hongo en lesión de penca	<i>Penicillium dierckxii</i>	1.080

10.1.4 Evaluación del efecto de mezclas de microorganismos con efecto promotor en el desarrollo vegetal

Con la finalidad de conocer el efecto promotor del desarrollo vegetal en un modelo biológico más cercano al agave, se realizó la inoculación de los diferentes microorganismos de manera individual y en mezclas en plantas de sábila y se evaluaron diversos parámetros para determinar el efecto que estos tenían sobre el desarrollo vegetal. La **Figura 16** se muestra el resultado de la biomasa ganada por las plantas en los diferentes tratamientos donde se observa que no hay una diferencia significativa, pero si una tendencia a la alta en plantas tratadas con la mezcla de *Trichoderma viridae* y la cepa aislada de *Arthrobacter* sp. MW-01 que en comparación con las plantas control, muestran una diferencia de biomasa de 50 gr. Adicionalmente, las plantas tratadas con la mezcla de *Trichoderma viridae* y *Bacillus megaterium* WT-05, así como aquellas que solo se inocularon con *Bacillus megaterium* WT-05 muestran, aunque en menor proporción, un efecto promotor.

Para ver el efecto que tienen los diferentes consorcios en el desarrollo de las plantas de sábila, el volumen de la raíz se muestra en la **Figura 17**, donde no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos, el consorcio de *Trichoderma viridae* y *Bacillus megaterium* WT-05, así como el consorcio con las tres cepas, muestran valores semejantes a las plantas control, sin embargo no se observa una diferencia estadística entre los tratamientos. Por otro lado, se muestra la longitud de la raíz (**Figura18**) en plantas tratadas con diferentes microorganismos, además de consorcios con diferentes composiciones. Los resultados mostraron que en los diferentes tratamientos no existe una diferencia

significativa de promoción en la longitud de la raíz; sin embargo, plantas inoculadas con *Trichoderma viridae* y con el consorcio de *Trichoderma viridae* con *Bacillus megaterium* WT-05, muestran una tendencia numerica en la longitud de la raíz con respecto a las plantas control. Los resultados indican que la inoculación únicamente de *Arthrobacter* sp. MW-01 o en consorcio con *Bacillus megaterium* WT-05 ejercen un mejor efecto de promoción en la longitud de la raíz y en el volumen de la misma pero no en la ganancia de biomasa foliar.

Con el propósito de ver la producción de clorofila como parte de un efecto de promoción en las plantas de sábila, se analizó la cantidad de clorofila de tejidos obtenidas de plantas de los diferentes tratamientos. La **Figura 19** muestra los resultados del contenido de clorofila donde no se observa diferencia significativa entre los distintos tratamientos; sin embargo, plantas de sábila inoculadas con *Arthrobacter* sp. MW-01 mostraron una tendencia en la promoción de la producción de clorofila numéricamente mayor comparado con las plantas control. Tratamientos con *Bacillus megaterium* WT-05 y el consorcio de los tres microorganismos muestran de igual manera tendencia a la alta comparado con el control en la producción de clorofila.

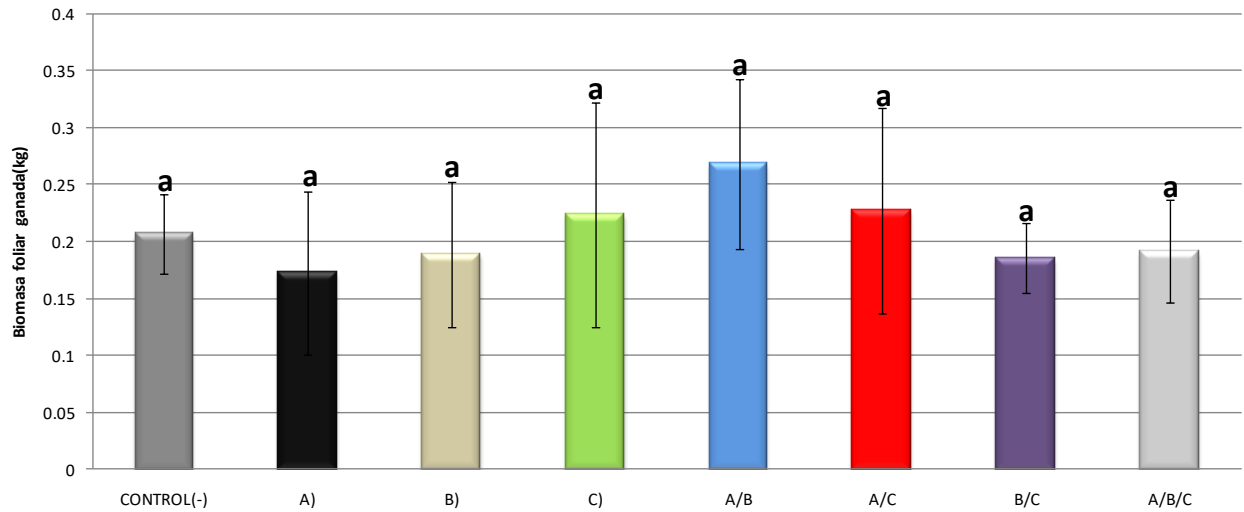


Figura 16. Incremento de Biomasa después de 60 días de inocular plantas de sábila con consorcios microbianos.

A) *Trichoderma viridae*, B) *Arthrobacter* sp. MW-01, C) *Bacillus megaterium* WT-05. Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 4. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

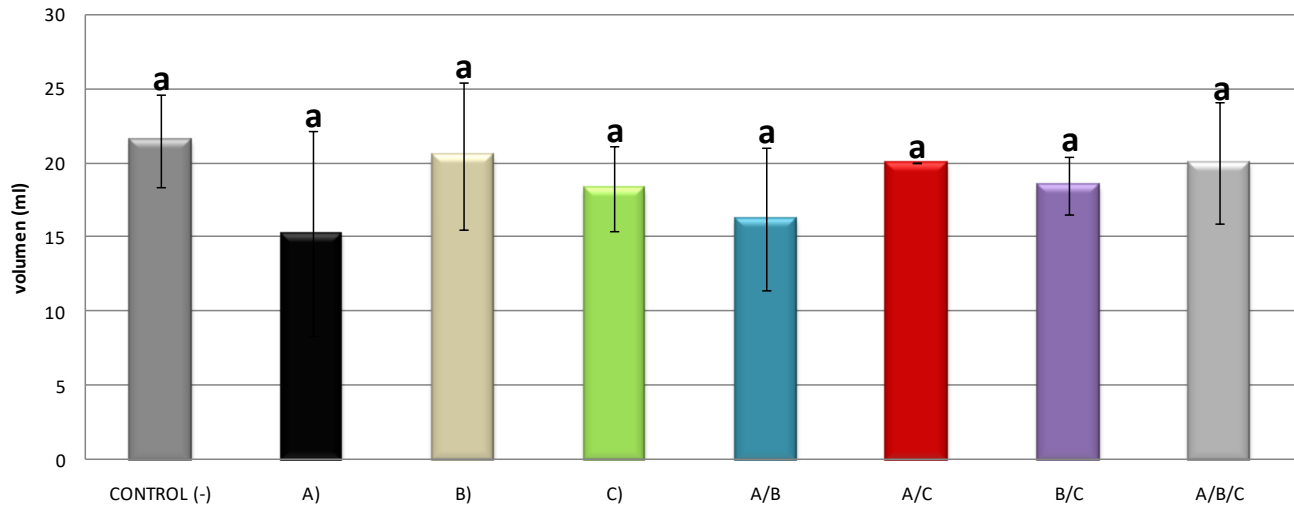


Figura 17. Efecto de la inoculación de microorganismos con potencial PGPR en el volumen radicular

A) *Trichoderma viridae*, B) *Arthrobacter* sp. MW-01, C) *Bacillus megaterium* WT-05. Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 4. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

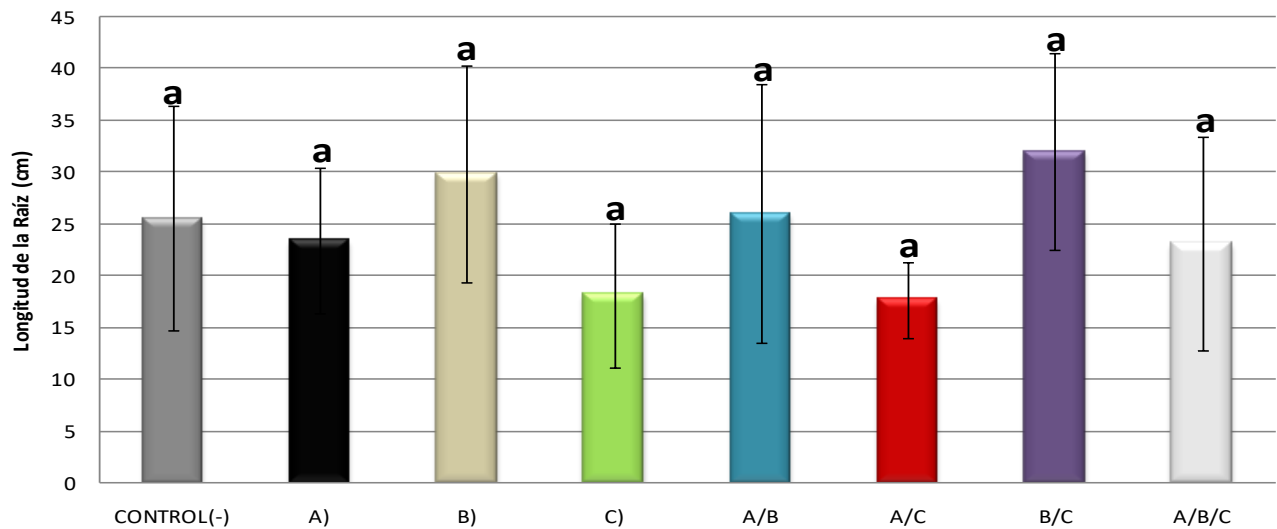


Figura 18. Efecto de la inoculación de microorganismos con potencial PGPR en la longitud de la raíz.

A) *Trichoderma viridae*, B) *Arthrobacter* sp. MW-01, C) *Bacillus megaterium* WT-05

.Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 4. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

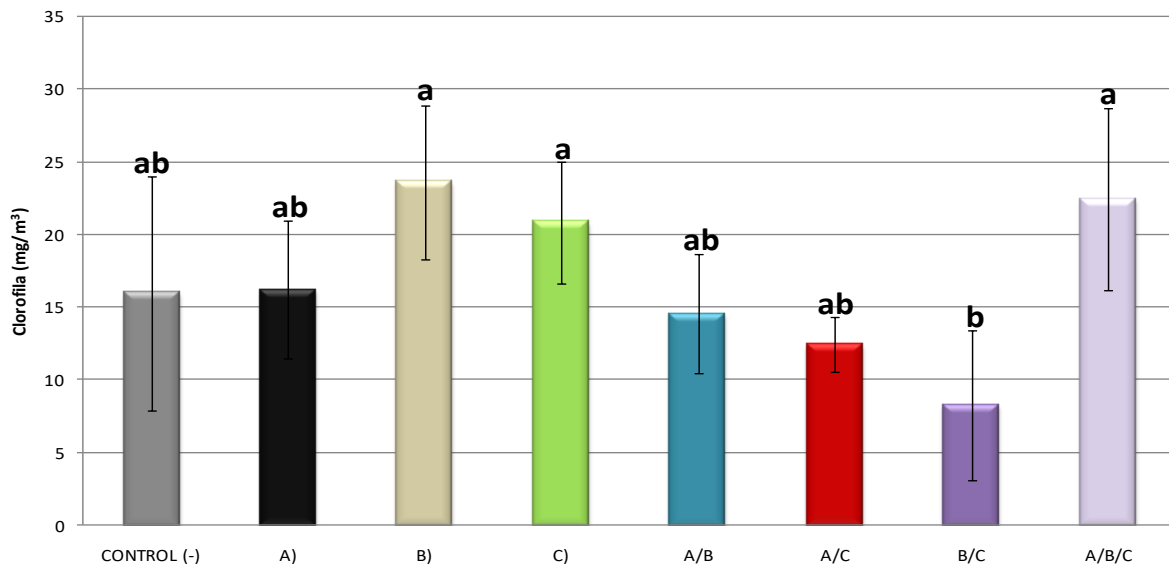


Figura 19. Contenido de clorofila en los diferentes tratamientos con los microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

A) *Trichoderma viridae*, B) *Arthrobacter* sp. MW-01, C) *Bacillus megaterium* WT-05 .Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 4. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

10.1.5 Evaluación de la capacidad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma viridae* y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 en el control del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*

Con el propósito de ver si *Trichoderma viridae* y el *Pseudomonas tolaasii* WT-09 en consorcio ó de manera individual tienen un efecto de biocontrol sobre *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* y su efecto en el desarrollo de plantas de *Agave tequilana* Wever var. azul, se realizaron las inoculaciones correspondientes y tiempos distintos inoculando en un tratamiento las cepas de biocontrol y pasados 10 días el fitopatógeno, en un segundo tratamiento las cepas de biocontrol y el fitopatógeno fueron inoculadas en la plantas en conjunto, y en un tercer tratamiento el fitopatógeno primeramente y 10 días después las cepas de biocontrol durante un periodo de 60 días, tiempo en el cual se analizaron las condiciones de salud de las plantas (**Figura 20**). Los resultados muestran una mayor longitud de las hojas de aquellas plantas donde fueron inoculadas con las cepas biocontrol y el fitopatógeno en conjunto, alcanzando una ganancia de 3.5 cm después de 60 días de tratamiento, en comparación con las plantas sin inóculo donde la longitud después de 60 días fue de 2.5 cm. El crecimiento de las plantas tratadas con el fitopatógeno se retrazó, aumentando solo 0.5 cm la longitud de las plantas; sin embargo, plantas tratadas únicamente con las cepas biocontrol no mostraron incremento en la longitud de sus hojas, a diferencia de los tratamientos E1 y E3 (**Figura 21**) donde se muestra un aumento de la longitud de 1.5 cm.

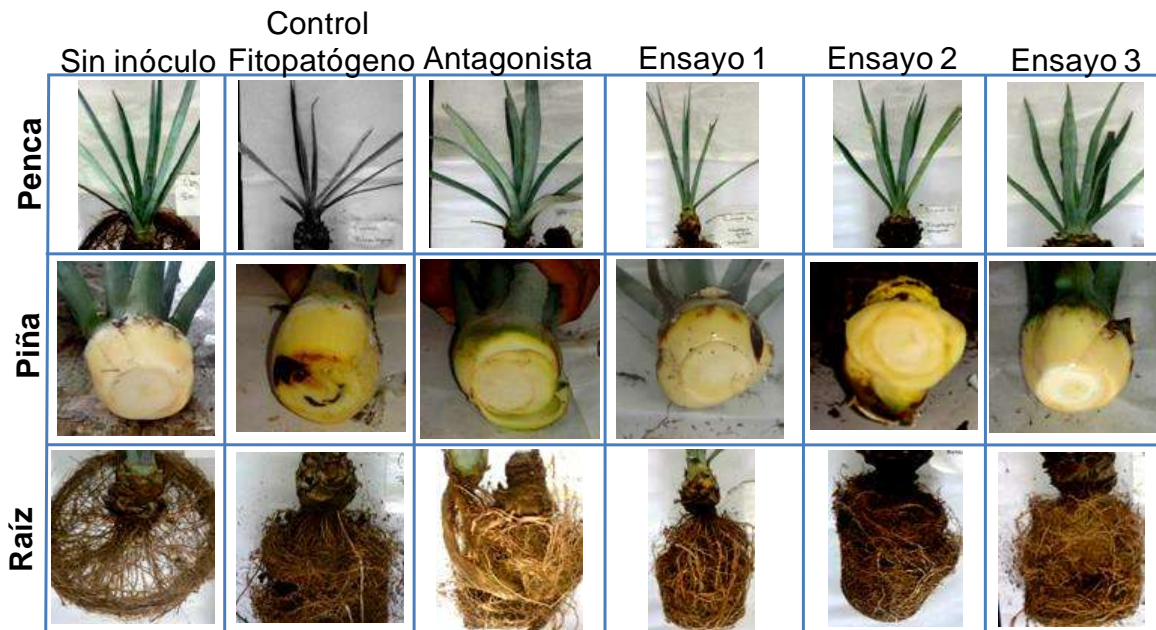


Figura 20. . Estado general de las plantas de agave 60 días después de la primera inoculación.

Se muestra el estado de los tejidos de tres partes de las plantas de agave en los diferentes tratamientos. Sin inóculo, control fitopatógeno, antagonista, fitopatógeno / 10 días / antagonista (E1), antagonista/fitopatógeno (E2), antagonista / 10 días / fitopatógeno (E3).

Se contabilizaron las pencas existentes en cada una de las plantas para ver si al final del tratamiento se habían perdido o ganado pencas. La **Figura 22** muestra la pérdida de una penca por planta en los tratamientos con el fitopatógeno y el

tratamiento E1; sin embargo, los tratamientos con las cepas biocontrol, además de el tratamiento E2 y E3, no presentan diferencias en el número de pencas al final del tratamiento.

Debido a que, al realizar cortes, el mayor daño observado en las plantas fue en la piña de los agaves tratados únicamente con el fitopatógeno, se realizó la extracción del ADN de esta zona de la planta para cuantificar la carga de ADN de *Fusarium oxysporum* presente, a través de la determinación de la β -actina de *Fusarium*. Tomando como 1 el valor más alto de carga de ADN en los tejidos de las piñas de agave obtenido en los tratamientos únicamente con el fitopatógeno, los resultados mostraron que las plantas que fueron inoculadas primero con *Fusarium oxysporum* y 10 días después con las cepas de biocontrol, presentaban mayor contenido de la β -actina de *Fusarium* (**Figura 23**). Los tratamientos sin inóculo, así como las plantas inoculadas con los antagonistas y aquellas que fueron inoculadas con el fitopatógeno y las cepas antagónicas al mismo tiempo no mostraron la presencia de la β -actina.

El tratamiento E3 muestra una disminución de la presencia de ADN de *Fusarium oxysporum* en los tejidos de las piñas de *Agave tequilana*. Estos resultados sugieren que la capacidad de biocontrol de *Trichoderma viridae* y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 es principalmente preventiva y su efecto de antagónico disminuye una vez establecido el fitopatógeno.

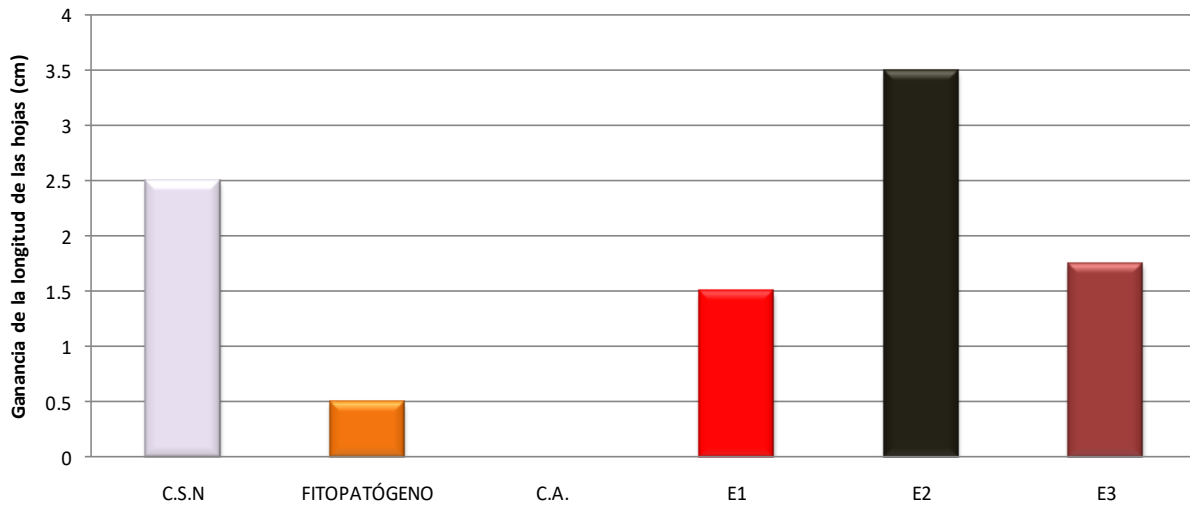


Figura 21. Efecto de la inoculación de microorganismos con efecto de biocontrol en el desarrollo de las hojas de agave.

Plantas sin inoculo (C.S.N.), Fitopatógeno, Control antagonista (C.A.), Fitopatógeno / 10 días / antagonista (E1), antagonista/Fitopatógeno (E2), antagonista / 10 días / Fitopatógeno (E3). n=4

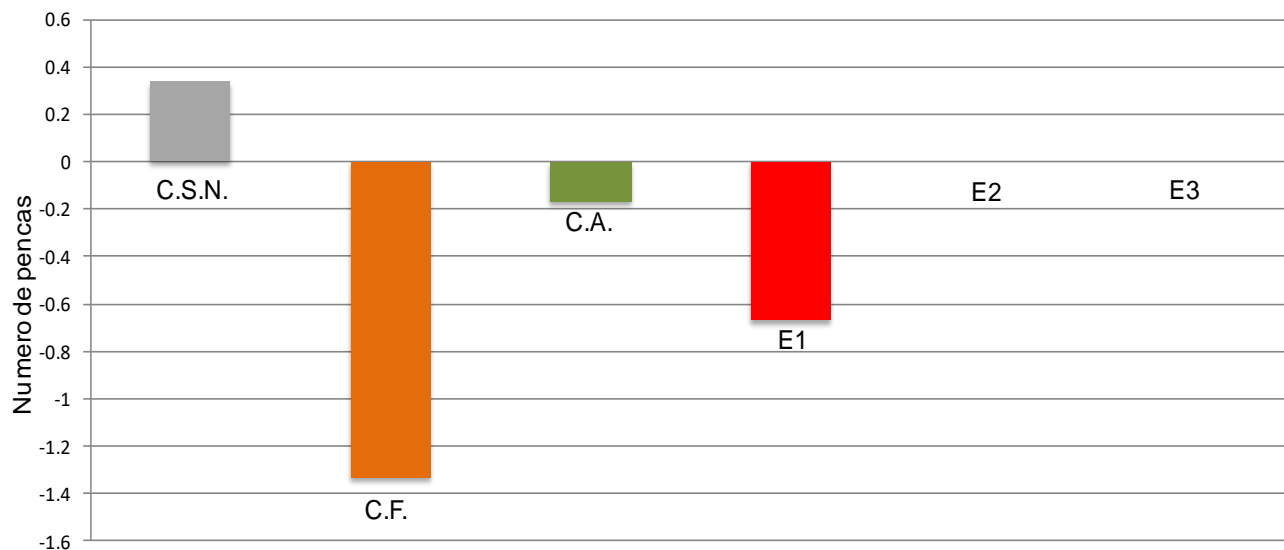


Figura 22. Efecto de microorganismos con capacidad de biocontrol en el desarrollo de pencas de agave.

Plantas sin inoculo (C.S.N.), Fitopatógeno, Control antagonista (C.A.), Fitopatógeno / 10 días / antagonista (E1), antagonista/Fitopatógeno (E2), antagonista / 10 días / Fitopatógeno (E3). n=4

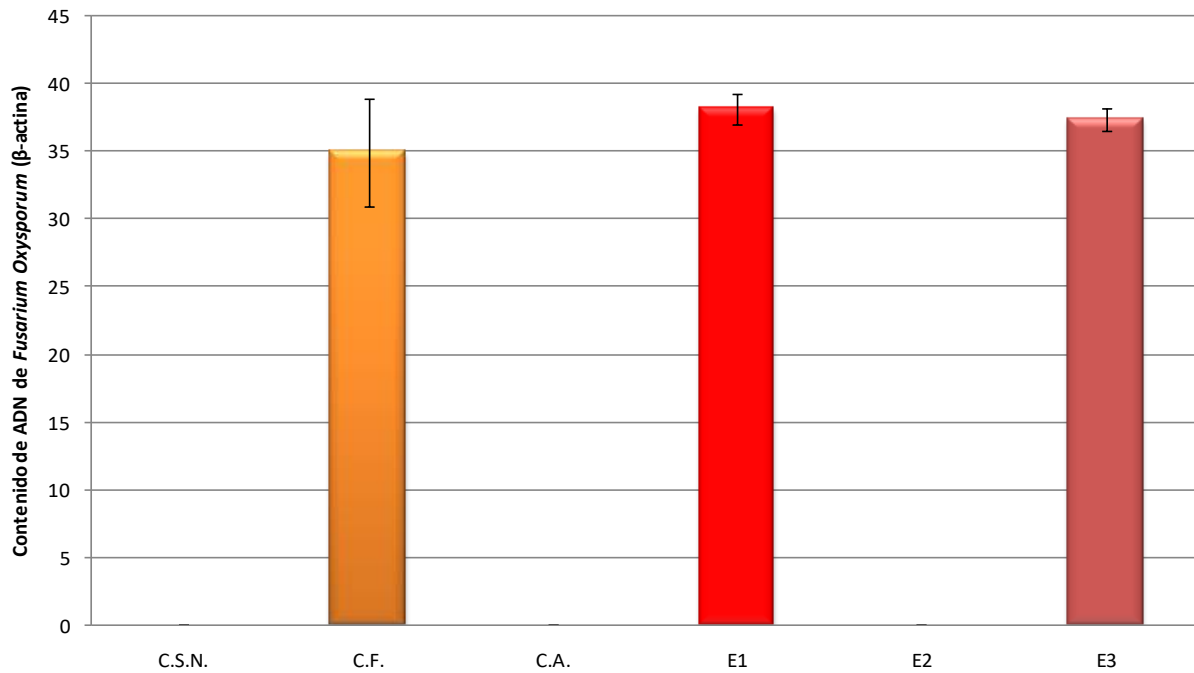


Figura 23. Contenido de ADN de *Fusarium oxysporum* en plantas de *Agave tequilana* con diferentes tratamientos.

Se muestra el contenido de la β -actina de *Fusarium oxysporum* en tejido de piña de agave tequilana. se muestran las plantas control sin inoculo (C.S.N.) control con Fitopatógeno (C.F.), control antagonista (C.A.) y los diferentes tratamientos, Fitopatógeno / 10 días / antagonista (E1), antagonista/ Fitopatógeno (E2), antagonista / 10 días / Fitopatógeno (E3). n=4

10.1.6. Determinación de la capacidad solubilizadora de fosfatos por PGPR aisladas de cultivos de agave pulquero

Con la finalidad de conocer el mecanismo a través del cual ejercen un efecto promotor los microorganismos aislados, se realizó la determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos, un nutriente esencial en el desarrollo vegetal. La capacidad de solubilizar fosfatos se observó a través de un halo de aclaramiento (**Figura 24**). Los resultados obtenidos fueron dos cepas con capacidad solubilizadora, siendo *Pseudomonas tolaasii* WT-09 la que presentó el mayor halo de aclaramiento, seguido por *Bacillus megaterium* WT-05 que también presentó capacidad de solubilizar fosfatos. La cepa de *Arthrobacter* sp. no presentó capacidad solubilizadora ya que no se observó la presencia de un halo alrededor del crecimiento.

10.1.7. Evaluación del potencial para fijar nitrógeno de las PGPR aisladas de cultivos de agave pulquero

Para determinar la capacidad de fijar nitrógeno, y debido a la importancia de este elemento en el desarrollo de cultivos, los microorganismos con potencial efecto promotor fueron inoculados en tubos con medio de cultivo NFB libre de nitrógeno. Los resultados mostraron capacidad de fijación de nitrógeno por la cepa *Pseudomonas tolaasii* WT-09 al día 15 de la inoculación (**Figura 25**). La capacidad de fijar nitrógeno se determinó mediante el viraje de color del medio de cultivo de un color verde claro a una tonalidad azul por el indicador azul de bromotimol, esto resultado de la alcalinización del medio

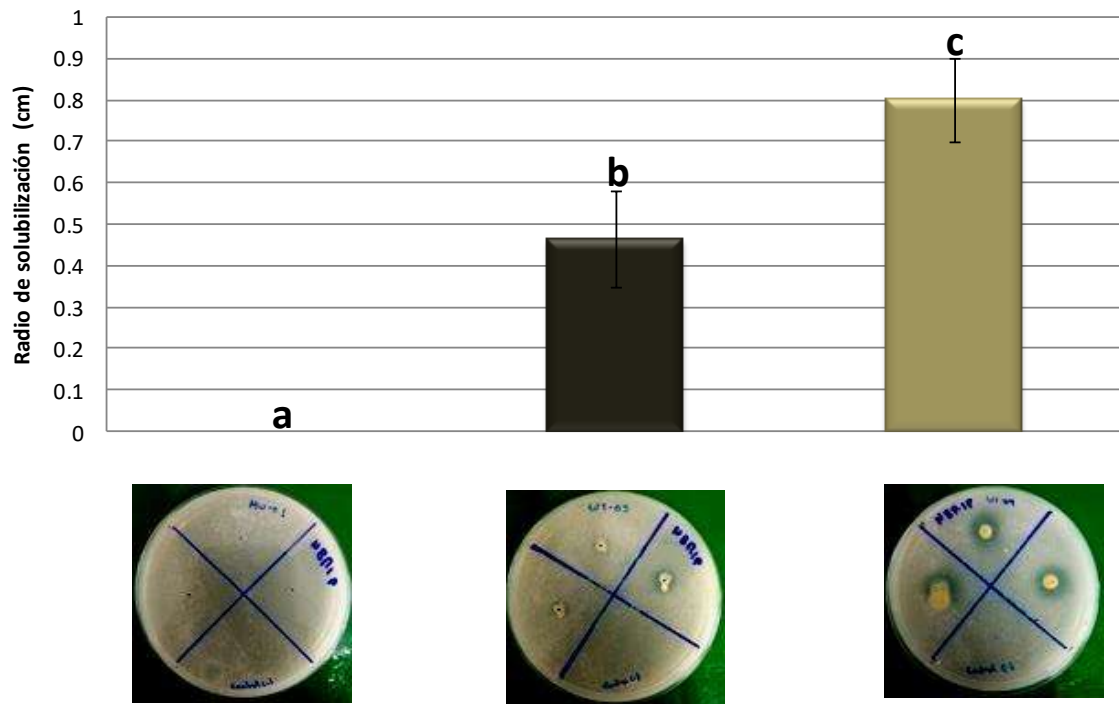


Figura 24. Evaluación de los aislados con efecto promotor en la solubilización de fosfatos.

Se muestran las barras de desviación estándar de la media, $n= 3$. ANOVA, Tukey; $\alpha: 0.05$ barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado



Figura 25. Capacidad fijadora de nitrógeno por PGPR aisladas de la rizosfera de agave pulquero.

Tubos con medio de cultivo NFB para la determinación de la fijación de nitrógeno atmosférico. Un viraje de color representa la conversión de N_2 en NH_4 .

10.1.8 Producción de proteasas de los microorganismos con potencial PGPR obtenidas de cultivo de agave pulquero.

Para determinar la producción de proteasas, un mecanismo indispensable de competición de las PGPR, cajas con medio de cultivo agar leche fueron inoculadas con los microorganismos que presentaron los mejores efectos de promoción.

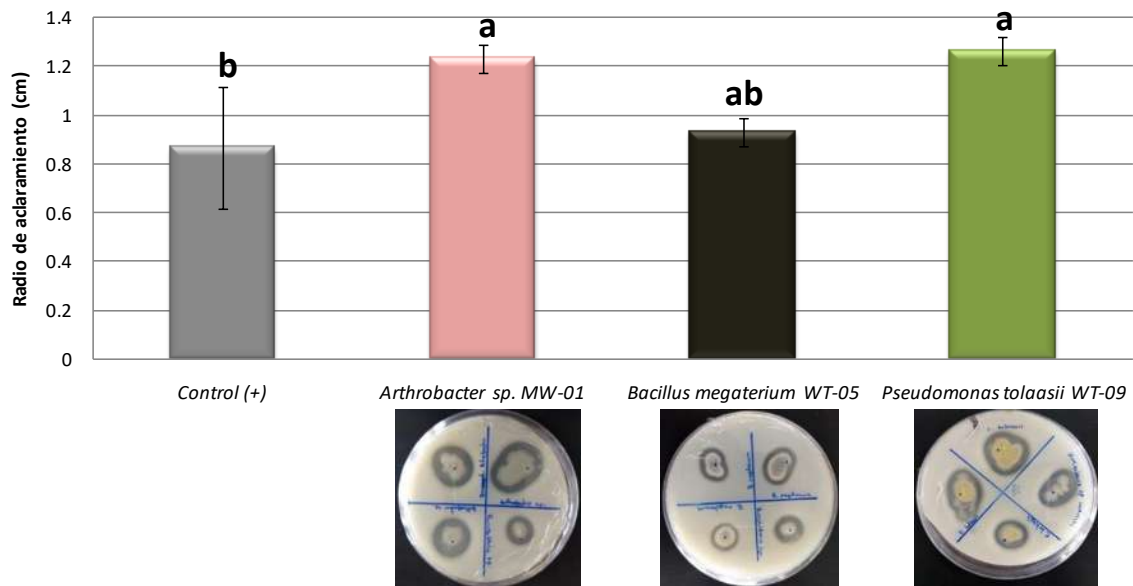


Figura 26. Producción de proteasas por microorganismos del suelo de agaves pulqueros con potencial efecto promotor.

La capacidad de producción de proteasas se observa mediante la presencia de un halo de aclaramiento del medio alrededor del crecimiento bacteriano. Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n= 3. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

Como se observa en la **Figura 26**, la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01 muestra la mayor capacidad de producción de proteasas, valores que están por encima del control positivo, mismos resultados se observan en el tratamiento donde las cajas fueron inoculadas con la cepa de *Pseudomonas tolaasii* WT-09. La capacidad de producir proteasas por *Bacillus megaterium* WT-05 fue igual que el control positivo.

10.1.9. Capacidad reductora del hierro de los microorganismos con efecto promotor obtenidos de suelo de agave pulquero

El hierro es el cuarto metal más abundante en los suelos (Crichton y Charlotheaux-Wauters, 1987) y es uno de los micronutrientes esenciales para prácticamente todos los seres vivos. Con el propósito de determinar si los microorganismos obtenidos con efecto promotor del crecimiento vegetal tienen la capacidad de reducir el hierro, se realizaron pruebas de reducción de este nutriente usando como fuente de hierro ferrosina al 0.1%. Los resultados mostraron que la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01 tiene una capacidad de reducción de hierro mayor con respecto al control positivo (**Figura 27**). Sin embargo, la cepa de *Bacillus megaterium* WT-05 muestra poca capacidad de reducción, similar al control negativo de *Bacillus* sp. L264. Por otro lado, la cepa de *Pseudomonas tolaasii* WT-09 tiene una capacidad de reducción de hierro mayor con respecto al control positivo y similar a la cepa de *Arthrobacter* sp MW-01.

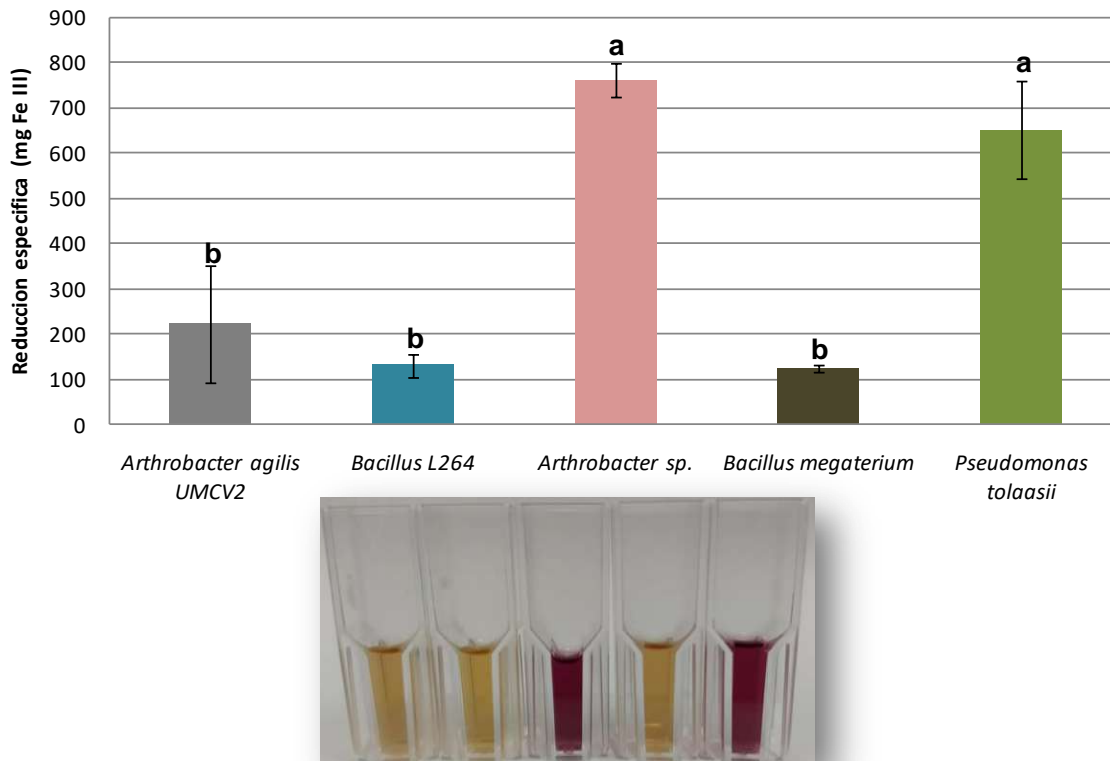


Figura 27. Reducción de hierro de los microorganismos con efecto promotor aislados del suelo de agave pulquero.

Barra gris representa el control positivo, barra azul corresponde al control negativo. La coloración roja en las celdas indica una potencial reducción de hierro. Se muestran las barras de desviación estándar de la media, n=3. ANOVA, Tukey; α : 0.05 barra= SD, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado.

10.1.10 Producción de sideróforos por microorganismos con efecto promotor, aislados de agave pulquero

Para determinar si los microorganismos promotores del crecimiento vegetal tienen la capacidad de producir sideróforos, se llevo a cabo el ensayo en cajas con medio BK-CAS donde las cepas se inocularon por punción y dejaron crecer durante 10 días a 30 C°. En la **Figura 28** representado en grafica, se muestra la capacidad de producción de sideróforos observando que la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01 presenta el mayor radio de coloración de 0.5 cm, además de la capacidad de *Bacillus megaterium* WT-05 con un radio de coloración de 0.37 cm. Por otra parte, la cepa de *Pseudomonas tolaasii* WT-09 presenta un alo de coloración como parte de la capacidad de producción de sideróforos de 0.18 cm. Estos resultados sugieren que entre los diferentes mecanismos de promoción, la producción de sideroforos como parte de un mecanismo de obtención de hierro y de competición, principalmente por *Arthrobacter* sp. MW-01 es empleado.

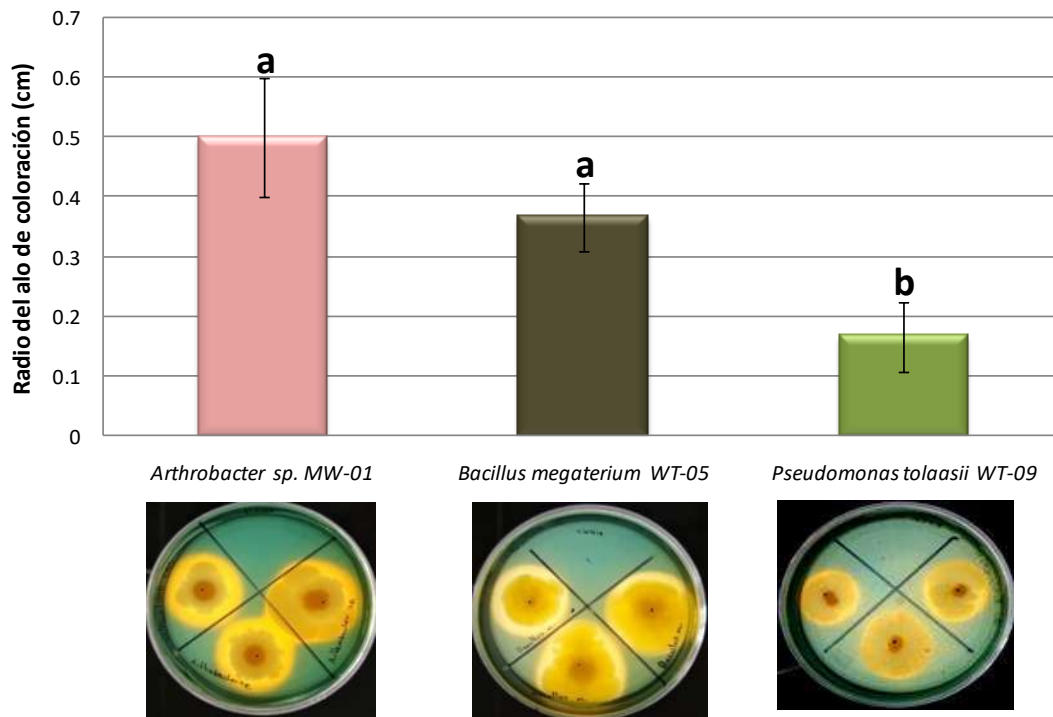


Figura 28. Capacidad de producción de sideróforos por las cepas aisladas de agave pulquero con efecto promotor.

Se muestra un viraje de color de verde a amarillo como resultado de la producción de sideróforos. Se muestran las barras de desviación estándar de la media. $n=3$. ANOVA, Tukey; $\alpha: 0.05$ barra= DS, letras diferentes denotan diferencia significativa entre cada aislado

XI. DISCUSIÓN

Los agaves se caracterizan por tener un ciclo de vida extenso; las especies grandes alcanzan su madurez entre los 10 y los 25 años (Figura 1). Durante los años de desarrollo del agave, las plantas son vulnerables a patógenos y condiciones ambientales adversas que afectan su crecimiento (Gómez-Ortiz y col., 2011). Para enfrentar este problema se ha hecho uso de diferentes herramientas como son fertilizantes de origen químico para el rápido crecimiento, agentes químicos para el control de hongos fitopatógenos e insecticidas para el control de plagas. Sin embargo, los fertilizantes que se aplican y entran en contacto con el agua del suelo, se disocian formando iones que pueden interactuar y precipitarse, formando compuestos insolubles. Estos fertilizantes que se precipitan no están disponibles para las raíces y aumentan el riesgo de disminuir, consecuentemente, la eficiencia de aplicación de nutrientes (Estrada, 2013). Algunas bacterias que habitan en torno a las raíces de las plantas pueden promover el crecimiento de éstas. A dichas bacterias se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (Ortíz-Castro y col., 2013). El uso de bacterias como biocontrol de fitopatógenos y promotoras de crecimiento vegetal representa una promisorio estrategia y son una alternativa atractiva como respuesta a la reducción del uso de agroquímicos (Figura 3) (Martínez-Rodríguez y col., 2014). La inoculación de microorganismos ha mostrado mejoras significativas en el crecimiento y rendimiento de cultivos (Tabla 1) (Figura 2) (Bashan y col., 2004) (Lugtenberg y Kamilova, 2009) usando inoculantes formulados con PGPR mostrando efectos positivos en la calidad de cultivos (Tabla 2) (Bashan y de-

Bashan, 2005). El uso de bacterias promotoras de crecimiento es una importante alternativa como reemplazo al uso de fertilizantes químicos para el cultivo de plantas en la agricultura. La búsqueda de PGPR así como trabajos enfocados en determinar sus propiedades biológicas ha incrementado rápidamente gracias a su capacidad de ser explotadas comercialmente como inoculantes (De la Torre-Cruz y col., 2016). Varios aspectos sobre la comunidad microbiológica asociada con plantas de agave son aún desconocidas y solo unos cuantos trabajos relacionados al tema sugieren la hipótesis de que la inoculación de PGPR incrementan significativamente el crecimiento y desarrollo de las plantas de agave (Desgarenes y col., 2014).

Mediante un tamizado donde se usó como modelo biológico semillas de maíz, frijol y *Arabidopsis thaliana*, se identificaron los microorganismos con capacidad de promoción de crecimiento aislados de la rizósfera de cultivos de agave pulquero. La biomasa ganada en los modelos de maíz y frijol, al ser inoculadas con la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01, *Bacillus megaterium* WT-05 y *Bacillus cereus* WT-03 mostraron un efecto de promoción (Figura 8). La longitud de la parte aérea se estimuló en semillas inoculadas con las cepas de *Arthrobacter* sp. MW-01, *Bacillus cereus* WT-03 y *Bacillus megaterium* WT-05 en el modelo de frijol, además de *Bacillus mycoides* WT-24 en modelo de Maíz (Figura 9). Por otro lado, la mayor producción de raíces en maíz y frijol fue estimulada por las cepas de *Arthrobacter* sp. MW-01, *Bacillus megaterium* WT-05 y en segundo plano *Bacillus mycoides* WT-24 y *Bacillus cereus* WT-03 (Figura 10). A diferencia de otros reportes de aislamiento de microorganismos promotores del crecimiento vegetal como el caso

de Martínez- Rodríguez y col. en el 2017, donde colectaron más de 300 microorganismos de cultivos de agave tequilero, la cantidad de aislados obtenidos a partir de agave pulquero es muy escasa, esto debido al uso desmedido de fertilizantes de origen sintético en la región. Sin embargo, independientemente de la escases de aislados obtenidos y la poca cantidad de microorganismos con efecto promotor, la probabilidad de encontrar microorganismos con potencial efecto promotor en el agave pulquero es mayor debido a la adaptación que han generado dichos microorganismos al entorno en el que se desarrollan, generando mecanismos para crecer bajo las condiciones del suelo y teniendo un efecto sobre el desarrollo del agave. En el modelo de *Arabidopsis thaliana* estos efectos no se vieron reflejados (Figura 11), una posibilidad es que dichas cepas no logran hacer simbiosis con las plantas de *Arabidopsis thaliana* o que debido al espacio reducido de las cajas donde se realizó el ensayo, la inoculación de los diferentes microorganismos haya generado estrés. Debido a que el control biológico de patógenos de plantas usando bacterias es una estrategia atractiva como uso alternativo a los agroquímicos (Martínez-Rodríguez y col., 2014) se identificó en pruebas de confrontación con hongos fitopatógenos a la cepa de *Pseudomonas tolaasii* WT-09 capaz de detener el crecimiento de algunos hongos como *Cladosporium cladosporioides* (Figura 12), aislados de las pencas de agave pulquero causante de pudrición de tejidos. Además de usar a la cepa de *Trichoderma viridae* para el control de *Fusarium oxysporum*.

Mediante un análisis de comparación peptídico a través de MALDI-TOF se identificaron los microorganismos estimuladores del crecimiento y la población

microbiana presente en los agaves pulqueros (Tabla 5). Dicha población microbiana se encuentra conformada por un 48% de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* seguido del 13% de microorganismos del género *Pantoea* y 11 % de *Arthrobacter*. En menor cantidad, se encontraron microorganismos del género *Raultella*, *lactobacillus* además de *Campylobacter*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Micrococcus* con un 5% y 3% respectivamente (Figura 13). Esta comunidad microbiana es comparable con otras poblaciones aisladas de leguminosas, donde los microorganismos predominantes son el género *Bacillus*.

Del total de la población microbiana, los que presentaron mejores efectos de promoción fueron las cepas de *Bacillus cereus* WT-03, *Bacillus megaterium* WT-05, *Pseudomonas tolaassi* WT-09, *Bacillus mycoides* WT-14, *Bacillus myciodes* WT-24 y *Arthrobacter* sp MW-01. Se identificaron dos hongos presentes en las pencas de los agaves pulqueros, ocasionando daño a tejido. Estos hongos fueron identificados como *Cladosporium cladosporioides* presente como una mancha negra en la superficie de las hojas d los agaves, *Penicillium dierckxii*, presente en la lesión de una penca. La certeza del análisis de microorganismos a través de MALDI-TOF se ha evaluado con diferentes microorganismos; bacterias gram negativas, bacterias gram positivas y levaduras, evaluando diferentes compuestos orgánicos que reaccionen con la muestra para su identificación. Se ha demostrado que la efectividad del equipo en la identificación de microorganismos es de un 96%, presentando mayor exactitud en bacterias. Tomando en cuenta la presencia de factores que intervienen en resultados confiables, la precisión del equipo se ha

demostrado realizando la identificación mediante la secuenciación del ADN ribosomal 16s comparando los resultados y confirmando así los datos obtenidos por MALDI-TOF.

Para determinar si los microorganismos con efecto promotor en maíz y frijol tienen la capacidad de estimular el desarrollo de manera conjunta, se establecieron mezclas de microorganismos y se evaluó su capacidad promotora en plantas de sábila, un modelo biológico de velocidad de crecimiento más lento y un sistema de fotorrespiración igual al que presentan las plantas de agave. Los resultados indican que las plantas inoculadas con las diferentes mezclas no muestran diferencia significativa en la biomasa ganada (Figura 14). Sin embargo, después de sesenta días de realizada la primera inoculación, se muestra una tendencia numérica en las plantas inoculadas con *Trichoderma viridae* y *Arthrobacter* sp. MW-01 respecto a las plantas control. Esto no se observa en el volumen de raíz de los diferentes tratamientos ya que no hay una tendencia en comparación con las plantas control (Figura 15). Se observó la promoción de la longitud de la raíz al inocular de manera individual a *Arthrobacter* sp. MW-01 además de aquellas plantas cuya mezcla estaba conformada por *Arthrobacter* sp. MW-01 y *Bacillus megaterium* WT-05, sin mostrar diferencia estadística al ser comparadas con las plantas control (Figura 16). Las plantas que fueron inoculadas con la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01 ó *Bacillus megaterium* WT-05 y las inoculadas con la mezcla de los tres microorganismos, aumentaron el contenido de clorofila presente en las hojas numéricamente en comparación con las plantas control (Figura 17). Esto sugiere que la mezcla de microorganismos para promover el crecimiento

vegetal, es mayor en plantas de sábila que inoculando de manera individual, ejerciendo un efecto en la promoción de la longitud de la raíz, generación de masa y producción de clorofila total. En un modelo distinto, como lo es el modelo de agave, Trinidad Cruz y colaboradores en el 2017 mostraron el efecto de mezclas de hongos promotores del crecimiento vegetal observando mayor biomasa foliar y de raíz además de la aparición de nuevas hojas. Al analizar los diferentes parámetros de crecimiento de las plantas de sábila inoculadas con mezclas de microorganismos promotores de crecimiento vegetal, no se observan diferencias estadísticas significativas en los diferentes tratamientos como los encontrados en agave al ser inoculados con mezclas de hongos, sin embargo, los valores de clorofila mostrados en plantas inoculadas con *Arthrobacter* sp. MW-01 muestran un efecto de promoción comparadas con aquellas plantas tratadas sin inoculo, esto da lugar a suponer la necesidad de repetir los tratamientos de las plantas de sábila cambiando la duración del ensayo para de este modo observar diferencias significativas en el contenido de clorofila, esperando además, diferencias en la biomasa, incremento en el sistema radicular y la aparición de nuevas hojas.

Algunos microorganismos además de promover el desarrollo vegetal, cuentan con mecanismos que ejercen un efecto protector mediante la producción de componentes que estimulan la defensa de la planta (Harman y col. 2004). Por ejemplo, cepas de *Trichoderma* han mostrado tener la habilidad de colonizar la raíz de las plantas y frecuentemente mejorar su crecimiento y desarrollo, además de incrementar la productividad de cultivos (Arora y col. 1992). Por otro lado, cepas de *Trichoderma* tienen la capacidad de proteger a las plantas contra

patógenos de la raíz, esto se le atribuye a un efecto antagónico contra la invasión de patógenos (Chet y col. 1997). Sin embargo, estas asociaciones hongo-raíz permiten además la estimulación de mecanismos de defensa contra numerosas clases de patógenos (Harman y col. 2004). Para observar el efecto de estimulación del crecimiento y capacidad antagónica contra patógenos de plantas, Trinidad Cruz y colaboradores en el 2017 inocularon semillas de *Agave cupreata* con mezclas de hongos micorrizicos durante 240 días donde pudieron observar una mayor ganancia de biomasa en las plantas inoculadas con algunas de las mezclas de microorganismos, además de una disminución del grado de severidad del daño causado en las plantas por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Esto sugirió que la capacidad de inducción en la promoción y control de fitopatógenos aumentaba cuando se aplicaban los hongos en consorcios que realizando las inoculaciones de manera individual. Para poder determinar si la mezcla de *Trichoderma viridae* y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 tienen la capacidad de estimular el desarrollo de plantas de agave e inhibir el daño a tejido causado por *Fusarium oxysporum*, se realizó el tratamiento de plantas de *Agave tequilana* Wever var. azul en diferentes tiempos de inoculación. Se observó daño en penca y piña de plantas inoculadas únicamente con el hongo fitopatógeno (Figura 18) en comparación con el resto de tratamientos. Sin embargo, se muestra un aumento en la longitud de las hojas de plantas inoculadas con la mezcla y el fitopatógeno en conjunto, y una reducción de las hojas inoculadas con *Fusarium oxysporum*, comparado con las plantas control (Figura 19). El número de hojas en las plantas tratadas con el hongo fitopatógeno se redujo una hoja por planta del día 0 al día 60, pero en los demás tratamientos no se observó una diferencia (Figura 20).

Debido a que el daño principal se observó en la piña de los agaves, se determinó el contenido de la β -actina de *Fusarium oxysporum* encontrando que el mayor contenido de ADN de fusarium se encontraba en plantas donde fue inoculado primeramente el hongo y después la mezcla de biocontrol, comparado con el control del fitopatógeno. Además, las plantas control sin inóculo, inoculadas con la mezcla y aquellas inoculadas en conjunto fitopatógeno/mezcla mostraron menor contenido de ADN del hongo (Figura 21). La capacidad de biocontrol de estos antagonistas muestran la eficiencia frente a fusarium, inhibiendo su crecimiento y daño a tejido antes de establecerse, siendo un candidato preventivo para atender a este problema, ya que no se observan resultados alentadores de biocontrol una vez que el fitopatógeno infecta la planta.

Las PGPR pueden promover el crecimiento mediante mecanismos de biofertilización en donde los principales son la fijación de nitrógeno (Hassan, 2013), solubilización del fosfato (Ramos y col., 2007) reducción de hierro (Valencia-Cantero y col., 2007) y producción de compuestos orgánicos volátiles que actúan como moléculas señal (Velázquez-Becerra y col., 2011 y 2013). Por ejemplo, la cepa de *Arthrobacter agilis* UMCV2 se comporta como PGPR, promoviendo el crecimiento de plantas leguminosas como es el caso de *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* y *Medicago truncatula* (Valencia-Cantero y col., 2007) (Velázquez-Becerra y col., 2011) (Orozco-Mosqueda y col., 2013) mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles que acidifican el medio, mejorando la actividad de la enzima férrico reductasa, aumentando la generación

de biomasa y el contenido de clorofila en las plantas (Orozco-Mosqueda y col., 2013).

Para conocer el posible mecanismo de promoción de las diferentes cepas, se realizaron pruebas cualitativas de fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, generación de sideróforos y producción de proteasas además de la cuantificación de la capacidad reductora de hierro. La determinación de la capacidad de solubilizar fosfato, se realizó mediante inoculaciones en cajas con medio NBRIP donde la única fuente de fosfato era fosfato de calcio. Se observó que las cepas tenían la capacidad de solubilizar a través de la presencia de un alo de aclaramiento alrededor de la colonias de *Bacillus megaterium* WT-05 y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 pero no así en *Arthrobacter* sp. MW-01 (Figura 22). Esta capacidad de solubilización de fosfatos por parte de *Pseudomonas tolaasii* WT-09 se ha reportada con otros ensayos donde se observa un alo de aclaramiento alrededor de la colonia, demostrando su potencial como bioinoculante en suelos donde la disponibilidad de este elemento es escasa o como parte de un tratamiento de suelo en el que el fosforo no se encuentra en el suelo. La fijación de nitrógeno se realizó en tubos eppendorf con 1 ml de medio NBF libre de nitrógeno y con azul de bromotimol como indicador. Se observó un viraje de color del medio de cultivo de verde a azul por parte de la cepa de *Pseudomonas tolaasii* WT-09 indicando la capacidad de este microorganismo de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) y convertirlo en amonio (NH_4) al alcalinizar el medio (Figura 23). La producción de proteasas como parte de un mecanismo de competición con otros microorganismos se observó en las tres cepas,

principalmente por *Arthrobacter* sp. MW-01 y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 mostrando un mayor halo de aclaramiento del medio alrededor del crecimiento en comparación con el control (Figura 24). Para observar la capacidad de reducción del hierro por las cepas con efecto promotor, se realizaron ensayos de reducción de hierro en presencia de ferrosina al 0.1%. Se observó la capacidad de reducción por las cepas de *Arthrobacter* sp. MW-01 y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 mayor que la mostrada por el control positivo. Sin embargo, esta capacidad no fue observada por la cepa de *Bacillus megaterium* WT-05 donde sus resultados son comparables con el control negativo (Figura 25). *Arthrobacter agilis* UMVC2 se ha demostrado su capacidad de reducción de hierro, pero al evaluar a *Arthrobacter* sp. MW-01 y su papel en la reducción de hierro, se observan mejores resultados. Dentro de las ventajas que presenta *Arthrobacter* sp. MW-01 como potencial reductora de hierro, es su rápido crecimiento, que a diferencia del control positivo, solo son necesarias 24 h para su crecimiento.

Los sideroforos microbianos son moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrar el que se encuentra en su entorno limitando así el crecimiento de microorganismos fitopatógenos (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Dowling y col., 1996). Para poder determinar si los microorganismos con efecto promotor tienen la capacidad de producir sideroforos, las cepas fueron inoculadas en cajas con medio de cultivo BK-CAS. Se observó que la cepa de *Arthrobacter* sp. MW-01 presentó el mayor halo de cambio de color representando la producción de sideroforos, mostrando un nivel de producción

menor la cepa de *Bacillus megaterium* WT-05 y en menor proporción *Pseudomonas tolaasii* WT-09 (Figura 26).

En este trabajo se pudo obtener la población microbiana presente en cultivos de agave pulquero y los microorganismos que ejercen un efecto promotor a través de la estimulación del desarrollo vegetal o como agentes de control de fitopatógenos. Además los posibles mecanismos que utilizan los microorganismos considerados PGPR se dieron a conocer.

XII. CONCLUSIONES

1. La rizosfera de agave pulquero está conformada en su mayoría por microorganismos del genero *Bacillus*.
2. Las cepas de *Arthrobacter* sp. MW-01, *Bacillus megaterium* WT-05 y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 tienen un efecto de promoción de crecimiento vegetal usando diferentes mecanismos.
3. El consorcio conformado por *Trichoderma viridae* y *Pseudomonas tolaasii* WT-09 muestran capacidad de disminuir el daño causado por *Fusarium oxysporum* en plantas de agave.

XIII. Bibliografías

1. Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer, Berlín.
2. Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts
3. Medallo-Mojica, E. y Lopez-Perez, M. (2013). Análisis comparativo entre jarabe de agave azul (*Agave tequilana* Weber bar. azul) y otros jarabes naturales. *Agrociencia*, 47, 233-244.
4. Montañés-Soto, J., Venegas-Gomez, J. y Vivar-Ver, M. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas de *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*. 23(3), 199-206.
5. Molina-Guerrero, J., Botello-Álvarez, J., Estrada-Baltazar, A., Navarrete-Bolaños, J., Jimenez-Islas, H., Cárdenas-Manríquez, M. y Rico-Martínez, R. (2007). Compuestos volátiles en el mezcal. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6 (1), 41-50.
6. Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, A., Gonzales, A., Coria, R. y Gschaedler, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentation from *Agave salmiana*. *Antonie van leeuwenhaeck*. 100 (4), 497-506.
7. Escalante, A., López-Soto, D., Velázquez-Gutiérrez, J., Giles-Gómez, M., Bolivar, F. y López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7 (1026), pag 18.

8. Chanway, C.P., R.K. Hynes y L.M. Nelson. (1989). Plant growth promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta Moench.*) and pea (*Pisum sativum L.*). *Soil Biol. Biochem.* 21: 511-517.
9. Boonjawat, J., P. Chaisiri, J. Limpananont, S. Soontaros, P. Pongsawasdi, S. Chaopongpang, S. Pornpattkul, B. Wongwaitayakul y L. Sangduan. (1991). Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria. *Plant Soil.* 137: 119-125.
10. Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. (1992). Associative nitrogen fixing bacteria. pp. 212-258. In: Stacey, G., R.H. Burris y H.J. Evans (eds.). *Biological nitrogen fixation.* Chapman and Hall. New York
11. Döbereiner, J., S. Urquiaga, R. M. Boddey y N. Ahmad. (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res.* 42: 339-346.
12. Arshad, M. y W. T. Frankenberger Jr. (1998). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Adv. Agron.* 62: 45-151.
13. Crowley, D. E., Y. C. Wang, C. P. P. Reid y P. J. Szanislo. (1991). Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil.* 130: 179-198.
14. Bowen, G. D. y A. D. Rovira. (1999). The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1-102.
15. Van Peer, R., G. J. Niemann y B. Schippers. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of

- carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*. 81: 728-734.
16. Utkhede, R. S., C.A. Koch y J. G. Menzies. (1999). Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 265-271.
 17. Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra*. 14: 195-210.
 18. Martínez - Rodríguez, J.C., De la Mora-Amutio, M., Plascencia-Correa, L.M., Audelo-Regalado, E., Peña-Ramírez, Y.J., Escalante, A. Beltrán-García, M. J. y Ogura, T. (2014). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45, 4, 1333-1339.
 19. Hidroponia.mx (2016). Producción del pulque en México
 20. Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. Pag. 8, 13,14, 269, 339, 473, 603, 606, 610-612.
 21. Beneduzi, A., Ambrosini, A. y Passaglia L. M. P. (2012). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1044-51.
 22. Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M., y Govindappa, M. (2012). "Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review". *Biocontrol Science and Technology* 22:8, 855-872.

23. Rojas-Solís, D., Contreras Pérez, M. y Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del genero *Bacillus*. *Biológicas*. 15 (2): pp. 36-41.
24. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326: 99-108.
25. Ortiz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4: 701-12
26. Babaloba O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-70
27. Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F, Rodríguez-Navarro D. (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
28. Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46: 454-64.
29. Oliveira ALM, Stoffels M., Schmid M., Reis V.M., Baldani J.I., Hartmann A. (2009). Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology.* 45: 106-113.
30. Van Loon, L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243-54.
31. Bordiec S, Paquis S, Lacroix H, Dhondt S, Ait Barka E, Kauffmann S, Jeandet P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clement C, Baillieul F, Dorey S. (2011)

Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *psis* in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot.* 62: 595-603.

32. Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, EUA. 674 pp.
33. Zuñiga, Estrada, L. (2013). Nutrición de *Agave tequilana* y manejo de los fertilizantes en un sistema de producción intensiva (riego por goteo). INIFAP. 1-46 pp.
34. Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17, 29–54.
35. Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. (2006). Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: Regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann. Bot.*, 97, 883–893.
36. Ahmed, A.; Hasnain, S. (2010). Auxin producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. *Pure Appl. Chem.* 2010, 82, 313–319.
37. Han, H.S.; Lee, K.D. (2005). Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. *Res. J. Agric. Biol. Sci.*, 1, 176–180.

38. Han, H.S.; Supanjani, S.; Lee, K.D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. *Plant Soil Environ.* 2006, 52, 130–136.
39. Beneduzi, A.; Ambrosini, A.; Passaglia, L.M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.*, 35, 1044–1051.
40. Mazzola, M.; Fujimoto, D.K.; Thomashow, L.S. (1995). Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to Antibiotics Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp. and Effect on Biological Control of Take-All of Wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2554–2559.
41. Garcia-Fraile, P.; Carro, L.; Robledo, M. (2012). Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*, 7, e38122.
42. Flores-Felix, J.D.; Menendez, E.; Rivera, L.P. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 176, 876–882.
43. Kumar, H.; Bajpai, V.K.; Dubey, R.C. (2010). Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer. *Crop Protect.*, 29, 591–598.
44. Khan, A.L.; Waqas, M.; Kang, S.M. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *J. Microbiol.*, 52, 689–695.

45. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. (2012). Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326: 99-108.
46. Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav.* 4: 701-12.
47. Babaloba O.O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol. Lett.* 32: 1559-70.
48. Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F, Rodríguez-Navarro D. (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
49. Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46: 454-64.
50. Oliveira ALM, Stoffels M, Schmid M, Reis VM, Baldani JI, Hartmann A. (2009). Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology* 45: 106-113.
51. Annan H, Golding A, Zhao Y, Dong Z. (2012). Choice of hydrogen uptake (Hup) status in legume-rhizobia symbioses. *Ecol. Evol.* 2: 2285-90.
52. Fernandez-Aunion C, Hamouda TB, Iglesias-Guerra F, Argandona M, Reina-Bueno M., Nieto J.J, Aouani M.E., Vargas C. (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiol* 10: 192.

53. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5308-19.
54. Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G., Estrada-de los Santos P. (2004). Burkholderia unamae sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1165-72.
55. Guzmán A, Obando M., Rivera D., Bonilla R. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Rev Colomb Biotecnol.* 14: 182-90.
56. Castagno L.N., Estrella M.J., Sannazzaro A.I., Grassano A., Ruiz O.A. (2011). Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). *J Appl. Microbiol.* 110: 1151-65.
57. Lugtenberg B., Kamilova F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
58. Vyas, P. y Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol.* 9: 174-89.
59. Ahemand M. y Khan M. (2012). Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-

- tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451-59.
60. Aguilar-Piedras J., Xique-Vásquez M., García S. y Baca B.E. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50: 29-37.
61. Bal H.B., Das S., Dangar T.K. y Adhya T.K. (2012). ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *J. Basic. Microbiol.* 53: 972-84.
62. Vilchez, S. y Manzanera, M. (2011). Biotechnological uses of desiccation-tolerant microorganisms for the rhizoremediation of soils subjected to seasonal drought. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 1297-304.
63. Stearns, J.C., Woody, O.Z., McConkey, B. J. y Glick B.R. (2012). Effects of bacterial ACC deaminase on *Brassica napus* gene expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25:668-76.
64. Tenorio-Salgado S. Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., Caballero-Mellado, J. y Pérez-Rueda, E. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered.* 4: 236-43.
65. Rajkumar M., Sandhya S., Prasas M.N. y Freitas H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 30: 1562-74.
66. Sunar K., Dey P., Chkraborty U. y Chakreborty B. (2013). Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills. *J. Basic Microbiol.* 10: 1002-1014.

67. Morales-García Y.E., Herrera M.C. y Muñoz-Rojas J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 38: 58-69.
68. Kannan R. R., Prakash V. S. (2011). Molecular characterization of antagonistic *Streptomyces* isolates from a mangrove swamp. *Asian J. Biotechnol.* 3: 237:45.
69. Poupin M.J., Timmermann T., Vega A, Zuñiga A., y González B. (2013). Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8: 69435.
70. Lucas JA, García-Villaraco A, García-Cristobal J, Algar E, Gutierrez-Mañero J. (2013). Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. *J. Appl. Microbiol.* 115: 218-35.
71. O'Sullivan, D.J. y O'Gara, F. (1992). Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* 56: 662-676.
72. James, E. K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop.* 65:197-209.
73. Reinhold, H. y Hurek, T. (2011). Living inside plants. *Curr Opin Plant Biol.* 4: 435-443.
74. De Cal, A., Garcia, R. y Melgare, P. (2000). Induced resistance by *penicillium oxalicum* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stems. *Phytopathology. PHYTO.* 90:260-268.

75. De la Torre-Ruz, N; Ruiz-Valdiviezo, M.V; Rincon-Molina, C. I; Rodriguez-Mendiola, M; Arias-Castro, C; Gutierrez-Miceli, F. A; Palomeque-Dominguez, H. y Rincon-Rosales, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. *Environmental Microbiology*. 47: 587-596.
76. INIFAP-SAGAR (1997). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Relación área siembra escurrimiento en el establecimiento de pasto buffel. In: Tecnologías Llave en Mano. Tomo I. División Pecuaria. México. D.F.
77. Loredó, O.C., S. Beltrán L. y J.L. Barrón C. (1998). Reconversión de áreas agrícolas marginales a uso pecuario con módulos forrajeros. Pub. Téc. 10. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural-Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Palma de la Cruz. San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
78. Aguirre-Dugua, X. y Eguiarte L.E.(2013). Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments*. 90:36-44.
79. Ávila-Miranda, M. E; López-Zazueta, J. G, Arias-Castro, C; Rodríguez-Mendiola, M. A; Guzmán-de Peña, D. A; Vera-Núñez, J. A. y Peña-Cabriales J. J. (2010). Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 12:166-180.

80. Bernal-Alcocer. A; Zamora-Natera, J. F; Virgen-Calleros, G. y Nuño-Romero, R. (2005). Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23:140-146.
81. Calzada-Rovirosa, J. E; Naváez-Naváez, A. J; Romero-Celis, M; Castillo-Aguilar, R; López-Sánchez, M; Roccatti-Velázquez, M; Hernández-García, M; Gurria-Treviño, F; Urteaga-Treani, R; García-Quiñones H. R; Vázquez-Salido, M; Ornelas-Ruiz, M; Sánchez-Cruz, E; Flores-Lui, L. F; Osorno-Magaña, L. N. y Elías-serrano, A. (2017). Planeación Agrícola Nacional. SAGARPA. 1: 1-29.
82. Conabio. (2017). La diversidad biológica de México. Citado de http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html el 2 de junio de 2017.
83. Vázquez A. (2016). El agave en México. Tematica socioeconómica. CIATEJ.