



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA
A LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

Q.F.B. ITZI VELÁZQUEZ SEPÚLVEDA

TUTOR: DR. GUSTAVO SANTOYO PIZANO

Morelia, Mich.

Noviembre de 2010

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Recombinación y Diversidad Genómica en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Gustavo Santoyo Pizano. Para la realización del presente estudio se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIA

A mis padres a quienes les debo todo lo que soy y a mis
hermanos por su gran ejemplo de superación.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la vida y poner en mi camino a personas maravillosas.

Al Dr. Gustavo Santoyo Pizano por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y confianza ya que en todo momento me dio ánimo para seguir adelante.

Deseo expresar mi reconocimiento al Dr. Campos, Dr. Cervantes, Dr. Farías y Dr. Valencia gracias por sus sabios consejos y orientación en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio Carmen, Liz, Ido, Chio, Julie y Cris por todo el tiempo compartido a lo largo de estos 2 años, la constante comunicación con ellos ha contribuido a hacer de mí una mejor persona ya que me brindaron cariño, apoyo y comprensión.

A Cesar y Luis José por el tiempo que se tomaron para ayudarme y la paciencia que esto les implico.

A mis grandes amigas Esther, Susana, Mireya, Silvia, Laura y Claudia que han sido más que una familia para mí, por apoyarme y darme aliento en todo momento.

A mis padres que han sido los pilares en mi vida y que me han brindado todo el apoyo necesario para lograr mis metas y sueños.

A mis hermanos por su apoyo incondicional, comprensión y cariño.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La importancia del trigo	1
1.2 El suelo como sistema de estudio	2
1.3 Diversidad bacteriana	4
1.4 La rizósfera de plantas	5
1.4.1 Diversidad bacteriana de la rizósfera de plantas	6
1.5 Estudios sobre la diversidad bacteriana cultivable y no cultivable	9
1.5.1 Reasociación de genomas	9
1.5.2 Hibridación <i>in situ</i>	10
1.5.3 Secuenciación de genes ribosomales	11
1.6 Construcción de filogenias	13
2. ANTECEDENTES	15
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 Sitio del muestreo	22
6.2 Análisis físico-químico	22
6.3 Extracción de ADN	22
6.4 Amplificación de los genes ribosomales	24
6.5 Aislamiento del ADN genómico	24
6.5.1 Purificación del producto de PCR	25
6.6 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 mediante electroporación	26
6.7 Extracción de plásmidos por lisis alcalina	27
6.8 Electroforesis en geles de agarosa	28
6.9 Secuenciación de clonas con inserto	28
6.9.1 Búsqueda de homología tipo Blastn	28

6.10 Análisis filogenético	28
6.11 Medición de la diversidad bacteriana en la rizósfera	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Análisis físico-químico del suelo	30
7.2 Extracción del ADN metagenómico	30
7.3 Amplificación y clonación de los genes ribosomales 16S	31
7.4 Búsqueda de homologías	33
7.5 Diversidad cultivable versus no cultivable	36
7.6 Clases y géneros bacterianos asociados a la rizósfera de plantas de trigo	37
7.7 Filogenia molecular	39
7.7.1 Alineamiento múltiple	39
7.7.2 Construcción de los árboles filogenéticos	40
7.8 Índice de Shannon-Wiener	46
8. DISCUSIÓN	47
9. RESUMEN DE RESULTADOS	54
10. CONCLUSIÓN	55
11. PERSPECTIVAS	56
12. PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES	57
13. LITERATURA	58

RESUMEN

El estudio del suelo se considera enorme ya que este alberga una gran diversidad genética microbiana. En particular, la porción de suelo que rodea a la raíz vegetal se le conoce como rizósfera y es aquí donde existen diferentes interacciones entre los microorganismos y la planta. La composición de la comunidad microbiana, y en particular las bacterias de la rizósfera puede verse influenciada por diversos factores bióticos y abióticos. Se sabe que las bacterias juegan diversos papeles ecológicos dentro de este ecosistema, en muchos casos promoviendo el desarrollo vegetal y/o controlando el crecimiento de fitopatógenos. Sin embargo, el conocimiento de las interacciones bacteria-planta es aún limitado, más aún el estudio de aquellas bacterias que no se pueden cultivar en el laboratorio. Es por ello importante conocer la diversidad y el papel ecológico que juegan las bacterias cultivables y no cultivables en la rizósfera. En este trabajo, ahondamos en el conocimiento de la diversidad bacteriana cultivable y no cultivable aislada de la rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) de la comunidad de las Cadenas Municipio de Zamora Michoacán. Para ello, se amplificaron por PCR los genes rARN 16S del metagenoma de la rizósfera y se secuenciaron. Los resultados en búsquedas tipo Blastn mostraron una diversidad principalmente de bacterias cultivables del 79%, mientras que aquellas con similitud a no cultivables fue del 21%. Las clases que se identificaron son: gammaproteobacteria con un 37%, betaproteobacteria 16%, actinobacteria 11%, bacilli 11%, alfa proteobacteria 7%, delta proteobacteria 5%, clostridia 2% y bacterias no cultivables 11%. Dentro de la clase gammaproteobacteria los géneros de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* fueron los más abundantes, ya que componen el 29.41% del total de la biblioteca de genes ribosomales obtenidos. El análisis filogenético mostró que la mayoría de las secuencias ribosomales se agrupan en clados que pertenecen a bacterias rizosféricas. Para conocer que tan diverso es el sistema de estudio, se realizó la prueba de diversidad de Shannon-Wiener, reportando un índice de 3.8 bits por individuo. Lo anterior sugiere que la rizósfera de plantas de trigo alberga una gran diversidad bacteriana que puede jugar importantes papeles ecológicos.

ABSTRACT

The soil is a reservoir of microbial genetic diversity and therefore is considered a major challenge study. In particular, rhizosphere is the portion of soil surrounding the root and here is where different interactions between microorganisms and plants occur. The composition of the microbial community, especially rhizobacteria, can be influenced by several biotic and abiotic factors. It is known that bacteria play different ecological roles in the ecosystem, such as plant growth-promoting or avoiding plant pathogens to growth. However, our knowledge of bacteria-plant interactions is still limited, in particular those that cannot be cultivated in laboratory. Therefore, it is important to understand the diversity and the ecological role of cultured and uncultured bacteria. In this work, we focused on the diversity of cultured and uncultured bacteria isolated from the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) at Las Cadenas, Zamora Michoacán. To that end, the 16S RNAr genes from the metagenome of the rhizosphere were amplified by PCR and sequenced. The 16S sequences and results of the Blastn searches showed a 79% identity with cultured bacteria, while only a 21% showed similarity to uncultured bacteria. The main classes identified: gammaproteobacteria with 37%, betaproteobacteria 16%, 11% actinobacteria, Bacilli 11%, alfabroteobacteria 7%, deltaproteobacteria 5%, clostridia 2% and 11% of uncultured bacteria. Within the gammaproteobacteria class, the genera *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* were the most abundant, since they correspond to 29.41% of our ribosomal library. Phylogenetic analysis showed that most of the ribosomal sequences are grouped into clades that belong to rhizospheric bacteria. To determine whether the sample is significantly diverse, a Shannon-Wiener test was performed, resulting in a rate of 3.8 bits per individual. Our results suggest that the rhizosphere of wheat plants contains a wide variety of bacteria which might play important ecological roles.

1.1 La importancia del trigo

Los cereales como el arroz, el maíz y el trigo, son los principales granos que sustentan a la humanidad. En particular, los cultivos de trigo ocupan el 17% de la superficie de cultivos en todo el mundo y la alimentación de aproximadamente el 40% de la población mundial. El trigo provee más calorías y proteínas a la dieta que cualquier otro grano (Laegreid et al. 1999), proporciona el 20% de las calorías totales de alimentos y proteínas en la nutrición humana. En su estado natural el trigo es rico en vitaminas B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (niacina), B₆ (piridoxina), E (α -tocoferol), hierro y zinc.

El trigo puede crecer a diferentes altitudes, latitudes, climas y suelos, por esto es posible encontrar cosechas de trigo en todos los continentes. Los principales países productores de trigo son China, con una producción total en el año 2008 de 96.3 millones de toneladas, India con una producción total en el año 2008 de 72.0 millones de toneladas y Estados Unidos con una producción total de 57.1 millones de toneladas. México es el principal productor de trigo en América central y el Caribe ocupando el 9°. lugar como exportador de trigo en el mundo (Fuente: FAO).

Los principales estados productores de trigo en México son Sonora, Guanajuato, Baja California, Sinaloa, Michoacán y Jalisco. En el año 2009 se sembraron en el estado de Michoacán 36,402 hectáreas obteniéndose una producción de 183,544.33 toneladas con un valor total de 483, 828,751 miles de pesos, englobando a los cultivos de riego y de temporal (SIAP-SAGARPA).

Con la relación al tipo de trigo que se cultiva en México, destacan los trigos suaves y cristalinos. En la caracterización se identifican cinco grupos dependiendo del tipo y características del gluten:

Tabla 1. Tipos de trigo que se cultivan en México.

Grupo	Tipo y características del gluten	Usos industriales	Características
I	Fuerte y elástico	Industria mecanizada de la panificación	Produce harina panificable
II	Medio fuerte y elástico	Industria del pan hecho a mano o semi-mecanizado. Mejorador de trigos suaves	Produce harina panificable
III	Suave y extensible	Industria galletera y elaboración de tortillas y frituras.	No produce harinas panificables por sí solos, se necesita mezclar con trigos fuertes y medio fuertes.
IV	Corto y tenaz	Industria pastelera y elaboración de galletas	No produce harinas panificables por sí solos. Requiere de trigos fuertes.
V	Tenaz, corto y cristalino con contenido de caroteno	Industria de pastas, espaguetis y macarrones	No es panificable

SIAP-SAGARPA 2010

Así mismo, el trigo es muy importante en la dieta alimenticia del mexicano, ya que con este se elaboran productos de consumo masivo como panes, pastas, tortillas, galletas, papillas, obleas y pasteles (SIAP-SAGARPA 2010).

1.2 El suelo como sistema de estudio

El suelo se define como la capa superficial de la tierra, que comprende la interfase entre la litósfera y la atmósfera. Debido a su ubicación geográfica, topología y clima, los suelos de México son complejos, pues se encuentran al menos 15 tipos. Por su extensión destacan tres de ellos: Regosol, Litosol y Xerosol.

1. Regosol: es el de mayor extensión y puede definirse como la capa de material suelto que cubre la roca; sustenta cualquier tipo de vegetación dependiendo del clima; su uso es principalmente forestal y ganadero, aunque también puede ser utilizado en proyectos agrícolas y de vida silvestre. Abarca la mayoría de las sierras del territorio y también se localiza en lomeríos y planos así como en dunas y playas.
2. Litosol: puede sustentar cualquier tipo de vegetación, según el clima. Predominantemente forestal, ganadero y agrícola.
3. Xerosol: suelo de zona seca o árida; la vegetación natural que sustenta son matorrales y pastizales; el uso pecuario es el más abundante, aunque si existe riego se obtienen buenos rendimientos agrícolas. Su ubicación está restringida a las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del país.

Tabla 2. Tipos de suelo en México

Tipo	Características de los tipos de suelos
Regosol	Suelos poco desarrollados, constituidos por material suelto semejante a la roca.
Litosol	Suelos muy delgados, su espesor es menor de 10 cm, descansa sobre un estrato duro y continuo, tal como roca, tepetate o caliche.
Xerosol	Suelos áridos que contienen materia orgánica; la capa superficial es clara, debajo de ésta puede haber acumulación de minerales arcillosos y/o sales, como carbonatos y sulfatos.
Yermosol	Suelo semejante a los xerosoles, difieren en el contenido de materia orgánica.
Cambisol	Suelo de color claro, con desarrollo débil, presenta cambios en su consistencia debido a su exposición a la intemperie.
Vertisol	Suelos muy arcillosos, con grietas anchas y profundas cuando están secos; si se encuentran húmedos son pegajosos; su drenaje es deficiente.
Feozem	Suelo con superficie oscura, de consistencia suave, rica en materia orgánica y nutriente.
Rendzina	Suelos poco profundos (10 - 15 cm) que sobre yacen directamente a material carbonatado (ejemplo roca caliza).
Otros	Luvisol, Acrisol, Andosol, Solonchak, Gleysol, Castantildeozem, Planosol.

INEGI 2010

La organización estructural del suelo crea un mosaico de microambientes, que difieren en términos de sus propiedades físico-químicas y estructurales que constituyen referencias para los diferentes hábitats (Ranjard 2001). La vida microbiana se produce en los poros del suelo que representan hasta un 50% del volumen total del suelo.

Basándose en el tamaño de las partículas, pH, capacidad de cambio de cationes o contenido en materia orgánica el suelo puede afectar la estructura de la comunidad microbiana directamente, proveyendo un hábitat específico que selecciona a los microorganismos específicos o indirectamente afectando la función de la raíz de las plantas y la exudación de una manera específica en el suelo (Garbeva et al. 2004). Las prácticas para el mantenimiento del suelo, tales como la rotación del grano, fertilizantes, composta o la aplicación de pesticidas y la irrigación, también influyen en los parámetros microbianos del suelo (Anderson and Gray 1990, Omay et al. 1997).

Así mismo, el suelo es considerado como un ambiente complejo para la vida microbiana (Robe et al. 2003). El suelo contiene más de 1×10^9 bacterias por gramo representando de 4000 a 7000 diferentes genomas (Torsvik et al. 1990). Otros estudios muestran que un gramo de suelo forestal contiene un estimado de 4×10^7 células procariotas, mientras que un gramo de suelo cultivado y pastizales contiene aproximadamente de 2×10^9 células procariotas (Paul and Clark 1989).

1.3 Diversidad bacteriana

La diversidad procariota es producto de alrededor de 3.8 billones de años de evolución, 2 billones de años más que los organismos eucariotas. Las bacterias son microscópicas, morfológicamente simples y están altamente distribuidas en todos los ambientes, incluyendo aquellos con condiciones extremas. La larga historia y la gran importancia de los microorganismos ayudan a explicar la gran diversidad morfológica, fisiológica y genética de esta forma de vida (Torsvik 2002). Esta enorme variabilidad genética es el resultado de mutaciones y eventos de recombinación (entre otros mecanismos) que les permitan responder a los cambios del medio ambiente. La bacteria puede intercambiar y adquirir genes de organismos lejanamente emparentados por la transferencia horizontal de genes, consecuentemente incrementa los ritmos de especiación, los cuales pueden ser considerados mayores que en eucariotas (Cohan 2001, Horner et al.

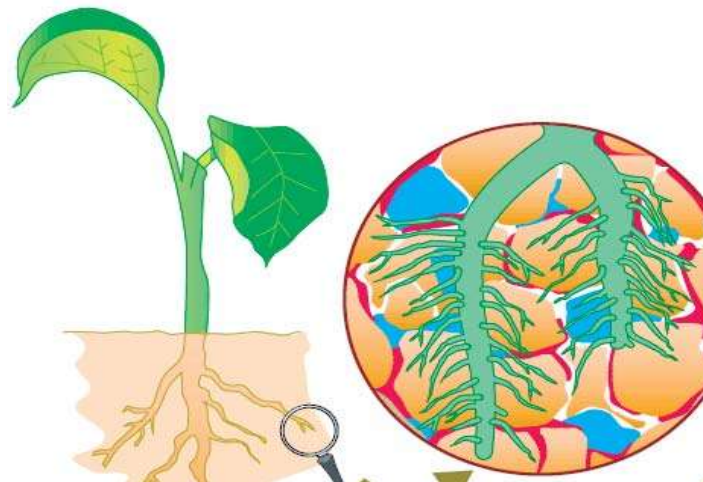
2004) Es por esto que las bacterias son los organismos más diversos y abundantes sobre la tierra (Whitman et al. 1998; Torsvik et al. 2002; Venter et al. 2004).

Las bacterias no solo desempeñan un papel clave en el funcionamiento biológico de los suelos a través de su participación biogeoquímica, también se encuentran involucradas en la formación del suelo por la alteración de la roca madre, y en la estructuración del suelo (Paul and Clark 1989).

1.4 La rizósfera de plantas

La rizósfera fue descrita por primera vez por Hiltner (1904) para describir la porción del suelo donde los microorganismos que median procesos, están bajo la influencia del sistema radicular.

Fig 1. Representación de la porción que suelo que rodea a la raíz (rizósfera).



Las funciones de la rizósfera son muy importantes para la nutrición, salud y calidad de la planta. La composición de la comunidad de la rizósfera puede influenciar el desarrollo de fitopatógenos (Nehl et al. 1997), adquisición de nutrientes (Lynch 1990) y resistencia a metales pesados (Bradley et al. 1981). La

composición en la comunidad de bacterias en la rizósfera está afectada por una compleja interacción entre el tipo de suelo, la especie de la planta y la localidad (Marschner et al. 2001).

La composición de los exudados de las raíces varía dependiendo de la variedad o especie de la planta y afecta la relativa abundancia de los microorganismos en la vecindad de la raíz (Somers et al. 2004). Las plantas no sólo proporcionan nutrientes para los microorganismos, algunas especies de plantas también contienen metabolitos antimicrobianos únicos en sus exudados.

1.4.1 Diversidad bacteriana de la rizósfera de plantas

La abundancia, así como la riqueza de microorganismos es por lo general mayor en la rizósfera y el rizoplano (interface del suelo y la raíz) que en las regiones del suelo desprovistas de raíces, porque las raíces excretan cantidades significativas de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas (Madigan et al. 2009). Estos materiales crean un ambiente único para los microorganismos que viven en asociación con las raíces de las plantas. Las bacterias responden de manera diferente a los compuestos liberados por la raíz de la planta y esta diferente composición de los exudados de la raíz es esperada para la diferente selección de las comunidades rizosfericas.

A las bacterias que habitan en la rizósfera se les conoce como rizobacterias, las cuales pueden tener efectos benéficos sobre la planta, potencializando su crecimiento y/o controlando ciertas enfermedades causadas por fitopatógenos (Kloepper et al. 1993; Rammette et al. 2003; Weller et al. 2002).

El efecto general de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) es incrementar el crecimiento y la productividad de las plantas. Las rizobacterias pueden promover el crecimiento vegetal mediante dos mecanismos:

Directos: son aquellos que actúan en la ausencia de patógenos.

- Biofertilizantes. las rizobacterias aportan a la planta nutrientes tal como lo hacen las bacterias diazótrofes fijando el nitrógeno atmosférico y convirtiéndolo en amonio utilizable por la planta (Spaink 1998, Van Rhijn 1995). Algunas PGRP solubilizan fosfatos de enlaces fosfatos tanto orgánicos como inorgánicos para facilitar el crecimiento de la planta (Lipton 1987, Vassilev 2006). Existen diferentes enzimas tales como fosfatasa no específicas, fitasas, fosfonatasas y liasas que liberan el fosfato soluble de compuestos orgánicos en el suelo. La liberación del fósforo del fosfato mineral se relaciona con la producción de ácidos orgánicos, como el ácido glucónico. *Rhizobium* es una bacteria simbiótica que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y lo entrega en forma utilizable para la planta en forma de ion amonio (NH₄)⁺.
- Fitoestimuladores: algunas bacterias producen sustancias que estimulan el crecimiento vegetal tales como auxinas, citoquininas, giberelinas y compuestos volátiles como el cofactor quinona pirrolquinolina. La hormona auxina es sintetizada a partir de aminoácidos como el triptófano (Kamilova et al. 2006, Kravchenko et al. 2004). Por ejemplo, las *Pseudomonas* son bacterias promotoras del crecimiento vegetal ya que segregan auxinas (Thomashow et al. 2002).
- Controladores del estrés: existen bacterias que contienen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) la cual facilita el crecimiento y desarrollo de la planta disminuyendo los niveles de etileno en la planta (Glick et al. 2007). El etileno es una hormona natural de la planta que en altas concentraciones puede afectar el desarrollo de la misma.

Indirectos o de biocontrol: actúan en presencia de un patógeno.

- Producción de antibióticos: algunas bacterias producen antibióticos, los cuales atacan a los patógenos. La bacteria debe producir el antibiótico correcto sobre la superficie de la raíz (Pliego 2008). Dentro de los antibióticos que se han encontrado aparecen fenacinas (Chin et al. 2003), pioluteorina (Nowak 1999) y pirrolnitrina (Kirner et al. 1998). *Bacillus cereus* puede producir zwintermicina y kanosamina (Milner et al. 1996). Las bacterias del género *Stenotrophomonas* producen el antibiótico xantobacina el cual ataca al hongo *Rhizoctonia solani* patógeno de plantas (Thomashow et al. 2002).
- Compuestos volátiles: aparece el cianuro de hidrogeno y el 2,3-butanediol producidos por *Bacillus spp* (Ryu et al. 2003).

Las PGPR pueden inducir programas de defensa, tales como resistencia sistémica adquirida y la resistencia sistémica inducida, por lo tanto reduciendo las comunidades microbianas fitotóxicas. También pueden provocar tolerancia sistémica inducida (IST) a estrés abiótico (Mantelin et al. 2004, Yang et al. 2009).

Los fitopatógenos pueden causar enfermedades en las plantas de diferentes modos. Algunos causan la degradación de componentes vegetales clave, como los pigmentos fotosintéticos. Otros causan daño físico directo a la planta, lo que abre la posibilidad a infecciones por insectos de plagas vegetales. Otros fitopatógenos causan problemas relacionados con el crecimiento que se manifiesta mediante la reducción de la biomasa, de las semillas, de los frutos o de otros componentes de las plantas. La planta sana y sin estrés constituye una barrera física natural para las infecciones microbianas. El estrés de la planta debido a la sequía, las temperaturas elevadas, la limitación de nutrientes, la alimentación de insectos u otros factores pueden aumentar su susceptibilidad a la infección microbiana y las enfermedades (Madigan et al. 2009).

1.5 ESTUDIOS SOBRE LA DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE

Las bacterias cultivables son aquellas que se pueden recuperar en el laboratorio por técnicas de cultivo. El término de bacteria no cultivable es utilizado para describir organismos que aun no han logrado crecer en medios artificiales *in vitro* (Vartoukian et al. 2010), debido a que este tipo de bacterias pueden tener requerimientos exigentes de crecimiento, incluyendo la necesidad de nutrientes específicos, condiciones de pH, la temperatura de incubación o los niveles de oxígeno en la atmósfera (Kopke et al. 2005). Existen diferentes técnicas y métodos para el estudio de la diversidad cultivable y no cultivable de diversos ambientes. A continuación se mencionan algunos que son importantes.

1.5.1 Reasociación de genomas

Este método es usado para determinar el número total de especies presentes en la muestra de una comunidad y está basado en varias hipótesis acerca de la pureza de la muestra y la composición de la comunidad. La cinética de reasociación de genomas se usa basándose en las propiedades bioquímicas de las moléculas de ADN para medir la complejidad del ADN en una muestra y por lo tanto estimar la diversidad de la muestra (el número de genomas presentes). La complejidad es definida como el número de nucleótidos en el ADN de una célula haploide sin ADN repetitivo (Torsvik et al. 1990). En esta técnica se extrae el ADN y se fragmenta por agitación en aprox. 1kb, el ADN es derretido completamente y llevado a una temperatura por debajo de su temperatura de fusión usualmente 25°C. La absorbencia de la reasociación del ADN es medida en un espectrofotómetro. El ADN de doble cadena absorbe más radiación UV que el de cadena sencilla, la absorbencia incrementa mientras el ADN se está renaturalizando. Cuando la absorbencia se detiene el ADN está completamente renaturalizado. Se mide el $C_0t_{1/2}$ donde: C_0 : es el producto de la concentración

molar de los nucleótidos y $t_{1/2}$ es el tiempo requerido para el 50% de reasociación. Este valor es considerado para ser proporcional a la complejidad de la muestra de ADN. (Spiegelman et al. 2005).

1.5.2 Hibridación *in situ*

Cuando el DNA se desnaturaliza, las cadenas sencillas pueden formar moléculas de doble cadena con otras moléculas de ADN o ARN de cadena sencilla, para formar moléculas híbridas con secuencias de bases complementarias, a esto se le conoce como hibridación y es utilizado para detectar, caracterizar e identificar segmentos de ADN.

Los segmentos de ácidos nucleicos de cadena sencilla cuya identidad ya se conoce y se utiliza en la hibridación se llaman sondas. Para favorecer la detección, las sondas pueden ser radiactivas o marcarse con sustancias químicas coloreadas o que generen productos fluorescentes. La hibridación puede ser útil para encontrar secuencias relacionadas en cromosomas diferentes u otros elementos genéticos, o para encontrar la ubicación de un gen en específico (Madigan et al. 2009).

Las sondas pueden ser generales o específicas. Las sondas universales de SSU (subunidad pequeña) rARN están diseñadas para unirse a secuencias conservadas en el rARN de cualquier organismo, independientemente del organismo al que pertenezca. Pueden diseñarse sondas específicas que reconozcan exclusivamente especies del dominio bacteria, gracias a secuencias firma que sólo se encuentran en su ARN. También pueden diseñarse sondas filogenéticas que reconozcan grupos específicos dentro de un dominio, como determinadas familias, géneros o especies (Madigan et al. 2009).

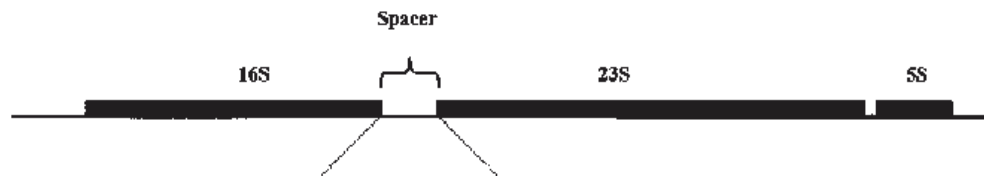
La unión de una sonda a los ribosomas de una célula puede observarse por microscopía si dicha sonda ha sido marcada con un marcador fluorescente. Esta técnica se ha denominado FISH (hibridación fluorescente *in situ*) y puede aplicarse directamente a células en cultivo o en su ambiente natural. Básicamente FISH es una tinción filogenética. Esta técnica puede proporcionar un método para estimar la composición de comunidades microbianas mediante la observación directa en el microscopio (Madigan et. al. 2009).

1.5.3 Secuenciación de genes ribosomales

El análisis de ácidos nucleicos extraídos directamente de la rizósfera provee una oportunidad para estudiar un amplio espectro de microorganismos que residen en la rizósfera. La mayoría de los fragmentos del gen rARN, son con frecuencia amplificados a partir del ADN total de la comunidad y, posteriormente por técnicas de huella digital (Berg and Smalla 2008).

Los ribosomas son estructuras de la célula donde se sintetizan las proteínas. La estructura de los ribosomas está ampliamente conservada en los tres dominios de la vida. En los procariontes el ribosoma está compuesto por 2 subunidades: una grande 50S y una pequeña 30S. La subunidad 50S contiene a los ARNs 23S, 5S y más de 30 proteínas. La subunidad 30S contiene a 16S rARN más 20 proteínas (Doolittle 1999).

Fig. 2 Representación gráfica del operón rARN de organismo procariontes



Los genes más útiles y usados para definir relaciones entre organismos son los que codifican el rARN 16S y sus equivalentes en eucariotas, los genes rARN 18S. Estos genes se utilizan porque: 1. Están distribuidos universalmente, 2. Son estables en su función (síntesis de proteínas) 3. Están lo suficientemente conservados (cambian lentamente), 4. Tienen la longitud adecuada aprox. 1500 pb (Madigan et al. 2009) y 5. Este gen es afectado débilmente por la transferencia horizontal de genes (Rossello 2001).

Los genes rARN ribosomales poseen regiones con secuencias conservadas entre todas las bacterias, facilitando el alineamiento de las secuencias, mientras otras regiones exhiben diferentes grados de variación, que permite distinguir entre diferentes grupos. Estas diferencias proveen la base para una taxonomía filogenética y permite la cuantificación de las diferencias evolutivas entre diferentes grupos (Prosser 2002).

El análisis de las secuencias 16 rARN ha sido usado para aclarar las afinidades taxonómicas de una amplia gama de taxones (McInnery et. al. 1995; Baker et. al. 1999) y como una poderosa herramienta para evaluar la genética y la diversidad de muestras ambientales (Groflkopf et al. 1998; ; Whitehead and Cotta 1999; van Waasbergen et al. 2000; Baker et al. 2001). La amplificación del 16S rADN por PCR de organismos que aun no pueden ser cultivables ha proporcionado una experiencia invaluable de nuestra comprensión de la estructura de la comunidad, especialmente de comunidades que habitan ambientes extremos donde las condiciones de crecimiento pueden ser difíciles de imitar en el laboratorio (Baker et al. 2003). La amplificación de los genes rARN 16S de un ambiente natural frecuentemente revela secuencias que son altamente divergentes de los conocidos phyla que se pueden cultivar, incluso entre las divisiones bacterianas bien representadas (Hugenholtz et al. 1998; Henne et al. 1999). Muchos de los genes rARN 16S altamente divergentes comprenden nuevas líneas procariotas formando nuevas divisiones (Hugenholtz et al. 1998).

El uso de los genes ribosomales 16S cambió radicalmente el punto de vista de la evolución de un paradigma de dominio de cinco reinos a tres dominios proporcionando un marco filogenético objetivo en el cual se clasifica la vida celular (Woese 1987), y a través de la clonación y la secuenciación de los genes 16S directamente del medio ambiente utilizando oligonucleótidos específicos en regiones conservadas (16S) demostraron que la diversidad microbiana es mucho más extensa de lo que imaginamos en estudios basados en métodos de cultivo (Pace 1997).

1.6 Construcción de filogenias

La filogenética es la ciencia que estima la evolución de las especies, genes o genomas. En el caso de la filogenia molecular, se basa en la comparación de secuencias de ADN o proteínas. La idea de representar esta hipótesis como árboles ha sido usada desde Darwin, pero el empleo de cálculos numéricos de los árboles usando métodos cuantitativos es relativamente reciente (Sneath and Sokal, 1973).

Los análisis filogenéticos solían estar restringidos a los estudios descriptivos y especulativos de las relaciones evolutivas, pero los recientes avances en la metodología nos permiten reconocer y aprovechar las dependencias estadísticas entre las secuencias (Harvey et al. 1996).

El análisis filogenético provee información sobre el número de secuencias que caen dentro de diferentes grupos y pueden identificarse nuevos grupos con secuencias de organismos no cultivables. Las secuencias obtenidas de esta manera pueden ser usadas para refinar los oligonucleótidos existentes incrementando su sensibilidad y especificidad y para diseñar oligonucleótidos y pruebas para nuevos grupos de organismos no cultivables (Prosser 2002).

Los árboles filogenéticos representan las relaciones jerárquicas entre los organismos que surgen a través de la evolución. Hoy en día estas relaciones están usualmente representadas por un “árbol” esquemático que comprende un

conjunto de nodos unidos entre sí por ramas. Los nodos terminales suelen representar secuencias conocidas de los organismos existentes. Nodos internos representan divergencias ancestrales en dos o más grupos genéticamente aislados; cada nodo interno se adjunta a una de las ramas que representan la evolución de su antepasado, y dos o más ramas representan a sus descendientes. Las longitudes de las ramas en el árbol pueden representar la distancia evolutiva que separa los nodos, la topología del árbol es la información en el orden de las relaciones, sin la consideración de la longitud de las ramas (Whelan et al. 2001).

Los árboles están basados en agrupamientos. Un nodo y todo alrededor de él es un “clado” o un “grupo monofilético”. Un grupo monofilético es un grupo natural; todos los miembros están derivados de un único ancestro común (con respecto al resto del árbol) y han heredado una serie de rasgos únicos comunes (caracteres) del mismo. Un grupo que excluye a algunos de sus descendientes es un grupo parafilético. Una mezcla de los OTUs (unidad taxonómica operacional) lejanamente emparentados quizás superficialmente conocidas entre sí o la conservación de características similares primitivas es polifilético, es decir no es un grupo en absoluto (Baldauf 2003).

2.- ANTECEDENTES

Los microorganismos en el suelo son fundamentales para el mantenimiento del mismo, ya sea natural como en los suelos agrícolas, por su participación para la estructura del suelo, así como la descomposición de materia orgánica y la eliminación de toxinas; el ciclo del nitrógeno, carbono, fósforo y azufre (Van Elsas 1997). Además, los microorganismos juegan un papel importante en la supresión de las enfermedades de las plantas transmitidas por el suelo, en la promoción del crecimiento de las plantas, y en cambios de la vegetación (Doran 1996).

El estudio de las comunidades microbianas en suelos agrícolas provee información sobre la diversidad bacteriana, riqueza de especies, y la variación estacional en la composición bacteriana de suelos agrícolas.

Los microorganismos en la rizósfera dominan los procesos de descomposición en el suelo y el ciclo de nutrientes en los sistemas de las plantas. Germida et al. (1998) basaron su trabajo en la diversidad de la rizósfera de plantas de trigo, de Saskatchewan Canadá. Las características del suelo eran franco con un pH de 7.5 y porcentaje de materia orgánica de 4.5. Las bacterias se aislaron por métodos de cultivos y fueron identificadas por la técnica de ácidos grasos metil esterificados (FAME) donde el género más abundante fue *Bacillus* (63%), seguido de *Pseudomonas* y muy pocas cantidades de *Arthobacter*, *Micrococcus*, *Aureobacterium* y *Curtobacter*. En este trabajo también se evaluó el índice de diversidad de Shannon-Weaver con un valor de 0.851 bits por individuo. En este trabajo se concluyó que las características de este suelo no son indicativas de las especies que habitan esta rizósfera.

Debido a que las plantas influyen la composición y el dinamismo de las comunidades microbianas en la rizósfera, Germida y Siciliano (2001) identificaron a las especies bacterianas que habitan la rizósfera de trigo de tres cultivares diferentes de éste. Las muestras se tomaron cerca de Kernan (suelo negro) y Saskatoon (zona oscura) también en Saskatchewan Canadá. Las plantas de trigo

tenían 41 días de haber sido plantadas, las características del suelo fue de una textura franco arcilloso con un pH de 7.5 las bacterias fueron recuperadas por técnicas de cultivo y derivatizadas por FAME y analizados por cromatografía de gases. El género más abundante en estos cultivares fue *Pseudomonas*, principalmente *chlororaphis* y *corrugata* pertenecientes al filo de las proteobacterias, seguidas de la bacteria Gram positiva *Arthrobacter* perteneciente al filo actinobacteria. El índice de diversidad de Shannon-Weaver dió un valor de 2.5 bits por individuo.

Con el objetivo de estudiar la magnitud de los cambios en las comunidades bacterianas como el resultado de la actividad antropogénica, Smith et al. (2001) analizaron la diversidad bacteriana en suelos agrícolas donde se cultiva trigo en las diferentes estaciones del año, basándose en técnicas tanto de cultivo como métodos moleculares. Los aislados más abundantes fueron sometidos a un análisis de ácidos grasos y las clonas más abundantes fueron identificados por una secuencia parcial y un análisis filogenético. La comunidad total de la diversidad del suelo fue visualizada por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) de fragmentos específicos de secuencias de 16S rARN. Las muestras fueron tomadas de Noordoostpolder en los Países Bajos. En los meses de septiembre, enero, mayo y junio se encontraron principalmente bacterias con un alto contenido de GC (*Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Oerskovia*, *Clavibacter*, *Rhosococcus*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Streptoverticillium*, *Nocardia* y *Aureobacterium*) dentro de éstas *Micrococcus* y *Arthrobacter* aparecieron en todas las muestras. Dentro de las bacterias de bajo contenido de GC se encontraron *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*; dentro de la división de las alfa proteobacterias aparecieron *Methylobacterium* y *Agrobacterium*. Beta proteobacteria sólo apareció *Hydrogenophaga*. Gamma proteobacteria se encontró *Pseudomonas*. La porción de bacterias de crecimiento rápido fue menor en enero (17%) y relativamente alto en julio (35%). los miembros del género de *Pseudomonas* se reducen en verano y se encontraron sólo en septiembre, mayo y enero. Con respecto al índice de Shannon-Weaver este fue mayor en mayo con un valor de 1.12 y menor en enero

con un valor de 0.881. Las clonas de 16S rARN detectadas con métodos moleculares estuvieron más distribuidas entre las divisiones Proteobacteria, Acidobacterium, Nitrospora, cianobacteria y bacterias verdes del azufre. En este trabajo se observó que ciertos géneros de bacterias aislados del suelo en periodos fríos pueden experimentar un shock cuando se siembran e incuban a relativamente altas temperaturas, lo cual puede impedir su crecimiento. Las mismas especies pueden crecer muy bien en los medios de cultivo cuando son aisladas del suelo en un periodo tibio.

Con el objetivo de conocer cuáles eran los phyla bacterianos más abundantes en el suelo, Janssen (2006) realizó un compendio de 32 bibliotecas de genes ribosomales 16S; estas bibliotecas fueron hechas en suelos de diferentes partes del mundo para tratar de abarcar todo tipo de suelos. El promedio de las secuencias contenidas en las bibliotecas fue de 100 secuencias, con un tamaño de las secuencias mayores a 300 nucleótidos ya que secuencias menores a los 300 nucleótidos pueden ser poco fiables. Los phyla más abundantes en estas bibliotecas fueron *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* y *Firmicutes* los miembros de estos 9 phyla hacen un promedio del 92% de las bibliotecas del suelo. El número de diferentes factores físicos, químicos y biológicos que pueden influir la abundancia de diferentes grupos bacterianos es muy grande. Por ejemplo se ha visto que la abundancia de *Verrucomicrobia* está influenciada por la humedad del suelo y que los miembros de *Acidobacteria* pueden estar controlados por el pH del suelo (Sait et al. 2006).

Debido a que las PGPR están consideradas como una alternativa al uso de los agentes químicos en los cultivos, Fisher et al. (2006) aislaron bacterias de la rizósfera de plantas de trigo para evaluar su capacidad como promotoras del crecimiento vegetal. Las plantas de trigo se obtuvieron de la región de Córdoba, Argentina. Las bacterias fueron recuperadas por métodos de cultivo y fueron caracterizadas mediante un análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), mediante la amplificación de los genes ribosomales 16S. El género

más abundante en este ambiente fue *Pseudomonas* y para probarla como promotora del crecimiento vegetal estas cepas aisladas de la rizósfera fueron inoculadas en semillas de trigo estériles y se observó que este género bacteriano si promovió el crecimiento vegetal de plantas de trigo.

Una bacteria promotora del crecimiento vegetal es *Bacillus*, las bacterias que pertenecen a este género han evolucionado regulando las redes para la protección de cambios repentinos y desfavorables, entre ellos, la falta de nutrientes, cambios en la temperatura y la humedad, el estrés oxidativo y la elevación súbita en la temperatura y la humedad. La producción de plantas en suelos alcalinos se reduce considerablemente debido a una nutrición inadecuada de la planta junto con el estrés osmótico y la sequía. El uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) puede resultar útil en el desarrollo de estrategias para facilitar el crecimiento del trigo en condiciones salinas, ya que estas son inoculantes de bajo costo, fáciles de usar y no tienen efectos adversos en la tierra. Basándose en esto Sudhir et al. (2009) analizaron las bacterias que habitaban la rizósfera de plantas de trigo en un suelo alcalino mediante un análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la amplificación de los genes ribosomales 16S. Los aislados encontrados en este trabajo presentaron identidad a diferentes especies del género *Bacillus*, y mostraron una alta tolerancia a estrés por NaCl. Esto debido a que la salinidad juega un papel importante en los procesos de selección microbiana como en ambientes de estrés, donde se ve reducida la diversidad bacteriana.

3.- JUSTIFICACIÓN

La rizósfera es un ecosistema complejo que alberga una gran diversidad de microorganismos. En este sistema se llevan a cabo diversas interacciones, en las cuales las bacterias pueden promover el desarrollo y la salud vegetal. Sin embargo, sólo podemos tener acceso a una pequeña muestra de los genomas bacterianos. Es por ello importante emplear métodos moleculares que nos permitan conocer y analizar la diversidad bacteriana.

4.- HIPÓTESIS

La rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) es un microecosistema que alberga una gran diversidad bacteriana.

General

Analizar la diversidad bacteriana asociada a la rizósfera de plantas de trigo

(*Triticum aestivum* L.).

Específicos

1. Analizar los genes 16S rARN del metagenoma bacteriano de la rizósfera de plantas de trigo.
2. Determinar las relaciones filogenéticas de los géneros bacterianos encontrados.
3. Determinar el índice de diversidad.

6.1 Sitio del muestreo

Para estudiar la comunidad microbiana del suelo rizosférico, las muestras fueron tomadas de la raíz de plantas de trigo de la comunidad de Las Cadenas municipio de Zamora, Michoacán. Este sitio tiene las coordenadas: 19°59' de latitud norte y 102°17' de longitud oeste. La altitud es de 1,560 msnm. Las muestras se tomaron a 10 cm de profundidad, y se transportaron en hielo para finalmente ser almacenadas a 4°C. La rizósfera fue separada de la raíz con la ayuda de puntas de micropipeta y fue secada a 37°C durante 48 hrs. y pulverizada en un mortero para ser procesada de inmediato. La muestra que no fue procesada de inmediato se conservo a 4°C.

6.2 Análisis físico-químico

Se colectaron aproximadamente dos kilos de suelo del campo agrícola y se enviaron al Laboratorio de Nutrición de Suelos y Fertilidad del INIFAP Celaya, esto se hizo con la finalidad de conocer las características generales del suelo rizosferico.

6.3 Extracción de ADN

El ADN de la rizósfera de las plantas de trigo se aisló con el kit de MoBio: Power Soil ADN Isolation Kit siguiendo el protocolo de la casa comercial:

1. A los tubos PowerBead, adicionar 0.25 gm de muestra de suelo
2. Agitar en vortex para mezclar.
3. Checar la solución C1. Si la solución C1 esta precipitada, calentar la solución a 60°C el precipitado tiene que estar disuelto antes de usarse.
4. Adicionar 60 µl de la solución C1 e invertir varias veces o agitar en vortex brevemente.

5. Asegurar los tubos horizontalmente usando un adaptador para tubos en el vortex o asegurar los tubos horizontalmente sobre una cama plana en el vortex. Agitar en vortex a máxima velocidad por 10 min.
6. Asegurar que los tubos roten libremente en la centrifuga. Centrifugar los tubos a 10, 000 x g por 30 seg. a temperatura ambiente.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml.
8. Adicionar 250 μ l de la solución C2 y agitar en el vortex por 5 seg. incubar a 4°C por 5 min.
9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10, 000 x g.
10. Evitar la pastilla, transferir 600 μ l del sobrenadante a un tubo limpio de colección.
11. Adicionar 200 μ l de la solución C3 y agitar brevemente al vortex. Incubar a 4°C por 5 min.
12. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 min. a 10, 000 x g.
13. Transferir 750 μ l del sobrenadante a un tubo limpio de colección.
14. Adicionar 1.2ml de la solución C4 al sobrenadante y agitar al vortex por 5 seg.
15. Cargar aproximadamente 675 μ l dentro de un Spin Filter y centrifugar a 10,000 x g un minuto a temperatura ambiente. Descartar el flujo y adicionar 675 μ l del sobrenadante dentro de un Spin Filter y centrifugar a 10, 000 x g por un minuto a temperatura ambiente. Cargar el resto del sobrenadante dentro del Spin Filter y centrifugar a 10, 000 x g por un minuto a temperatura ambiente.
16. Adicionar 500 μ l de la solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg. a 10, 000 x g.
17. Descartar el flujo del tubo de colección.
18. Centrifugar a temperatura ambiente por 1 min. a 10, 000 x g.
19. Cuidadosamente colocar el Spin Filter en un tubo limpio de colección. Evitar cualquier salpicadura de la solución C5 dentro del Spin Filter.
20. Adicionar 100 μ l de la solución C6 al centro blanco de la membrana
21. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 seg. a 10, 000 x g.

22. Descartar el Spin Filter. El ADN en el tubo esta ahora listo para posteriores aplicaciones.

Se recomienda almacenar el ADN de -20°C a -80°C. La solución C6 no contiene ningún EDTA.

6.4 Amplificación de los genes ribosomales

Para obtener la colección de las clonas de los 16S rADN se tomo 1 µl del ADN aislado con el kit y mediante amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers Fd1 5'-CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' y Rd1 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' (Weisburg et al 1991). La mezcla de 50 µl de PCR contenía 25 µl de Master Mix (Taq ADN polimerasa, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, MgCl₂), 2.5 µl de Fd1 20 nM y 2.5 µl de Rd1 20 nM, 1 µl de templado de ADN y 19 µl de agua desionizada estéril. Para la incubación de la mezcla de PCR, el programa consistió de una temperatura de 94°C por 5 min, 40 ciclos que consistían de 95°C 1 min, 50°C 1 min y 72°C 2 min, la temperatura final de extensión fue de 72°C 5 min este se realizo en un termociclador Techne TC-412. Como control se utilizo el ADN de *Escherichia coli* HB101.

6.5 Aislamiento de ADN genómico.

Se utilizó el kit Wizard SV Genomic ADN purification system:

1. Usar al menos 1×10^4 células a un máximo de 5×10^6 células. Lavar las células una vez con PBS 1X.
2. Si las células lisadas no van a ser usadas inmediatamente, pueden ser congeladas a -70°C hasta que se necesiten.
3. Transferir la muestra lisada del cultivo celular a la columna Wizard SV.
4. Colocar la mini columna en el tubo de colección con la muestra y centrifugar 3 min. a 13, 000 x g. si el lisado permanece en la columna centrifugar de nuevo 1 min. a 13, 000 x g.
5. Quitar la columna del tubo, tirar el sobrenadante y regresar la columna al tubo de colección.

6. Adicionar 650 μl de la solución de lavado Wizard SV a cada mini columna/ensamblada al tubo de colección.
7. Centrifugar 1 min. a 13, 000 x g.
8. Descartar el sobrenadante. Repetir el lavado 3 veces.
9. Después del último lavado, con el vacío centrifugar 2 min. a 13, 000 x g para secar la matriz de unión.
10. Remover la mini columna. Marcar un tubo de 1.5 ml y colocar ahí la minicolumna.
11. Centrifugar 1 min a 13, 000 x g.
12. Remover la mini columna y descartarla. Almacenar el tubo de -20°C a -70°C .

6.5.1 Purificación del producto de PCR

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit de promega Wizard SV and PCR clean-up system.

1. Amplificar blanco usando condiciones estándar.
2. Adicionar un volumen igual de solución de unión a membrana a la reacción del PCR.
3. Colocar la SV minicolumna en un tubo de colección para cada reacción de PCR.
4. Transferir el producto preparado a la SV minicolumna ensamblada e incubar 1 min. a temperatura ambiente.
5. Centrifugar la mini columna ensamblada a 16, 000 x g por 1 min. remover la SV mini columna del tubo y descartar el líquido del tubo de colección. Regresar la mini columna al tubo.
6. Lavar la columna adicionando 700 μl de solución de lavado de membrana y centrifugar 1 min. a 16, 000 x g. remover la mini columna del tubo y descartar el líquido del tubo de colección. Repetir el lavado con 500 μl de solución de lavado de membrana y centrifugar la mini columna ensamblada por 5 min. a 16, 000 x g.

7. Remover la mini columna, vaciar el tubo, ensamblar la columna de nuevo y centrifugar 1 min. a 16, 000 x g.
8. Cuidadosamente transferir la mini columna a un tubo de 1.5 ml. Aplicar 50 μ l de agua libre de nucleasas directamente en el centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar 1 min. a temperatura ambiente. Centrifugar 1 min. a 16, 000 x g.
9. Descartar la mini columna y almacenar el tubo de 4°C a -20°C.

6.6 Transformación de *E. coli* TOP10 mediante electroporación

1. Producto de PCR purificado 4 μ l, agua estéril 1 μ l, TOPO TA vector 1 μ l.
2. La reacción se mezcló suavemente y se incubó de 5-10 min a temperatura ambiente.
3. Se transfirió a una cubeta de electroporación pre enfriada de 0.1 cm de ancho. Se mantuvo la celda en el hielo hasta que se electroporó.
4. La electroporación se llevó a cabo a 1800 volts en un electroporador eppendorf 2510.
5. Se añadió a la cubeta 200 μ l de medio SOC (2% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10mM de NaCl, 10mM de MgSO₄ y 10mM de MgCl₂).
6. Se Incubó 2 hrs a 37°C para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina.
7. Se tomaron 40 μ l y distribuyeron en toda la caja petri con medio Luria-Bertani (LB 0.5% de extracto de levadura, 1.0% de peptona de caseína y 1.5% de cloruro de sodio), ampicilina 50 μ g/ml. Incubar durante toda la noche a 37°C.

6.7 Extracción de plásmidos por lisis alcalina

Se empleo un método para extraer plásmidos de cepas bacterianas las cuales se analizan como posibles transformantes (Sambrook and Rusell, 2001).

El método se describe a continuación:

1. Se partió de una fase estacionaria crecida durante toda la noche en 3 ml de medio LB.
2. Se transfirió 1.5 ml de cultivo en un tubo Eppendorf. Centrifugar a 12, 000 rpm por 20 seg. Desechar el sobrenadante.
3. Se resuspendió la pastilla en 200 μ l de solución I (50mM de glucosa, 25mM de Tris-Cl pH 8.0, 10mM de ácido etildiaminotetraacético EDTA pH 8.0).
4. Se Adicionó 2 μ l de lisozima (100mg/ml), mezclar cuidadosamente e incubar a 37°C durante 5 min.
5. Se adicionó 200 μ l de la solución II (NaOH 0.2N/SDS dodecilsulfato de sodio 1%). Mezclar vigorosamente e incubar durante 5 min a 25°C.
6. Se agregaron 150 μ l de la solución III (acetato de potasio 5M pH 4.8 con acido acético glacial). Se mezcló por inversión e incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 12, 000 rpm por 20 min.
7. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 ml (este contiene el plásmido), cuidando que el precipitado se elimine completamente.
8. Se adicionó 1 ml de etanol absoluto al sobrenadante. Se mezcló 10 min a 12, 000 rpm y descartó el sobrenadante.
9. A la pastilla de ácidos nucleicos se le agregaron 0.5 ml de etanol al 70% y se agitaron brevemente.
10. Se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min y descartó el sobrenadante.
11. Se secó la pastilla y disolvió en 60 μ l de agua estéril desionizada o destilada o TE pH 8.0. Agregar 1 μ l de RNasa libre de DNasa 20 μ g/ml.
12. Se visualizó el plásmido en gel de agarosa al 1%.

6.8 Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN aislado se sometieron a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris base, ácido acético glacial y EDTA). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo amortiguador. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga azul de bromofenol y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder y se sometió a un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora. Las bandas de ADN teñidas con una solución de bromuro de etidio (BrEt) se observaron en un transluminador de luz UV de onda corta (Bio Rad).

6.9 Secuenciación de clones con inserto

Se seleccionaron aquellas clonas que se comprobó contenían un inserto equivalente al tamaño del gen ribosomal (de aproximadamente 1500 pb) y se enviaron a secuenciar comercialmente.

6.9.1 Búsquedas de homología tipo Blastn

Los análisis de homología fueron llevados a cabo con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

6.10 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se empleó el software Bioedit para agrupar a las secuencias que alineaban unas con otras para formar grupos de secuencias. El programa clustalW se utilizó para la alineación de secuencias de ADN. En este programa se producen alineamientos múltiples y se calcula la mejor coincidencia para las secuencias seleccionadas. El programa MEGA 4.1 (por sus siglas en inglés Molecular Evolutionary Genetics analysis), se utilizó para inferir los árboles filogenéticos. Se siguieron 4 algoritmos distintos los cuales fueron: Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean (UPGMA), Vecino Más Cercano (NJ-Neighbor-Joining), Mínima Evolución (ME) y Máxima Parsimonia (MP)

Mediante el método del vecino más cercano basado en el modelo de dos parámetros de Kimura (Kimura 1980). Como prueba estadística se efectuó un análisis Bootstrap de 500 repeticiones para cada árbol. Para colocar la raíz del árbol se utilizaron como grupos externos se utilizaron un par de arqueas *Archaeoglobus profundus* (NC_013741) y *Nanoarchaeum equitans* (NC_005213).

6.11 Medición de la diversidad bacteriana en la rizósfera

La diversidad bacteriana se calculo a partir de la ecuación de Shannon-Wiener:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

- H' = índice de diversidad de especies
- S – número de especies
- p_i – proporción de la muestra total pertenecientes a la especie i

7.1 Análisis físico-químico del suelo

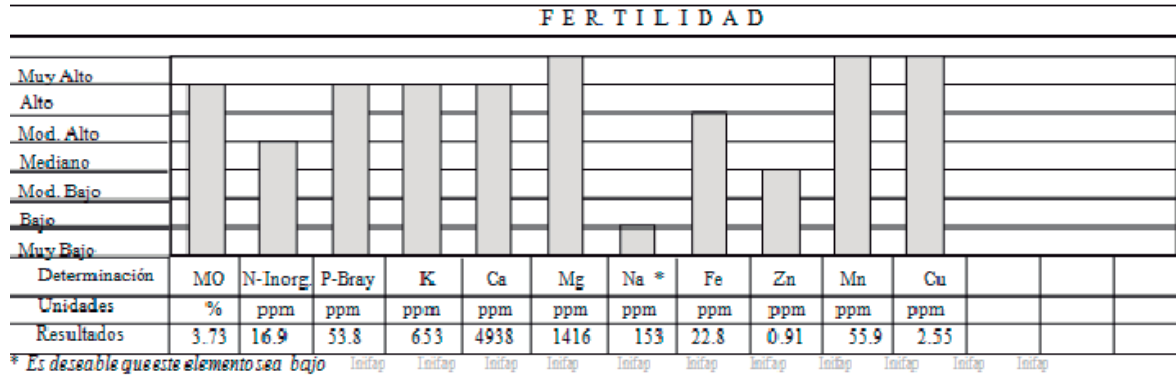


Tabla 3. Índice de fertilidad del suelo rizosferico de plantas de trigo

El análisis fisicoquímico del suelo mostró que se trata de un suelo con una textura franco arcillosa, con un pH neutro (7.17) y el índice de fertilidad esquematiza que la mayoría de los macro y micronutrientes se encuentran en cantidades altas o muy altas a excepción del sodio, lo cual es bueno ya que el sodio en altas concentraciones hace impermeable el agua impidiendo su penetración en las raíces. Se les conoce como micronutrientes a los oligoelementos que las plantas absorben en grandes cantidades, mientras que los micronutrientes son absorbidos en cantidades menores.

Esto sugiere que las condiciones de este suelo son las adecuadas para el buen desarrollo de plantas agrícolas.

7.2 Extracción del ADN metagenómico

Para obtener el ADN metagenómico de la rizósfera de plantas de trigo se empleó un kit de aislamiento de ADN de muestras ambientales.

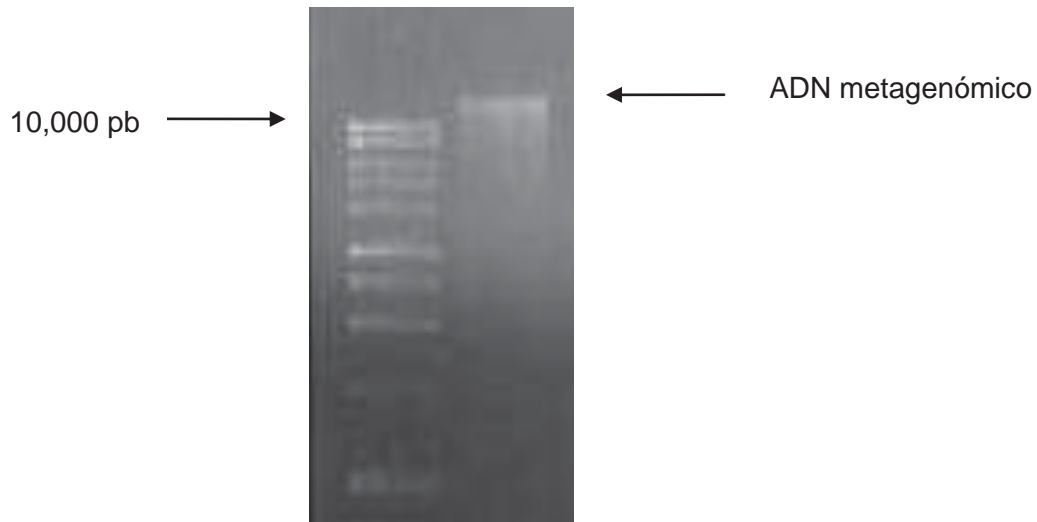


Fig 3. Extracción del ADN metagenómico de rizósfera de plantas de trigo donde se muestra la fotografía del gel de agarosa 1%. Del lado izquierdo se indica el tamaño molecular del marcador y a la derecha el ADN metagenómico.

En la figura 3 se muestra la banda del ADN metagenómico con un tamaño superior a las 10,000 pb observándose un barrido característico del aislamiento del ADN metagenómico y con un tamaño similar al ADN aislado de cultivos puros. Este resultado sugiere que este proceso de extracción no causa una ruptura grave del ADN. En el ADN metagenómico se encuentran contenidos todo tipo de genomas, incluyendo bacterias, arqueas, virus, protozoarios y hongos.

7.3 Amplificación y clonación de los genes ribosomales 16S

Para identificar a las bacterias presentes en la rizósfera de trigo los oligonucleótidos Fd1 y Rd1 fueron usados para amplificar al gen 16S el cual es altamente conservado dentro del genoma bacteriano. Como se muestra en la figura 4.

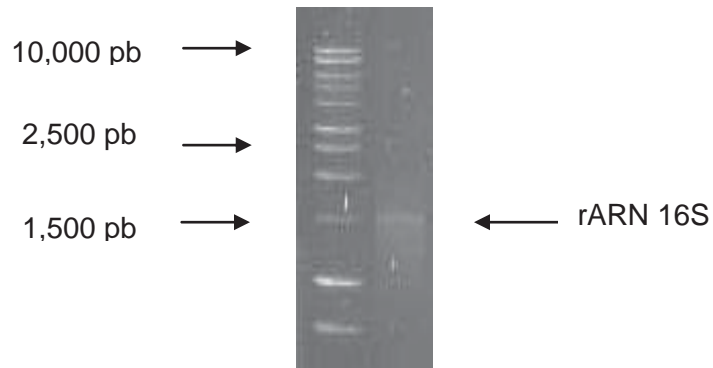


Fig. 4 Amplificación del gen rARN 16S donde se muestra la fotografía del gel de agarosa 1%. Del lado izquierdo se indica el tamaño molecular del marcador y a la derecha el rARN.

Como se puede observar en la figura 4, se muestra una única banda a la altura de 1500pb lo que corresponde al tamaño aproximado de los genes ribosomales 16S, dependiendo de la bacteria que se trate. Se realizó PCR a 3 muestras, estas se mezclaron, para purificarlas y clonarlas en un vector.

La clonación se llevó a cabo en el vector TOPO-TA (3.9kb) empleando células de *E. coli* TOP10. Para corroborar la clonación del fragmento se llevó a cabo la purificación del plásmido mediante el método de lisis alcalina, esta es usada ya que se rompe la pared celular de la bacteria con una solución alcalina, los plásmidos no se ven afectados debido a su pequeño tamaño y su capacidad de superenrollarse.



Fig 5. Gel de agarosa representativo de una lisis alcalina donde se muestra la fotografía del gel de agarosa 1%. Del lado izquierdo se indica el tamaño molecular del marcador.

En la figura 5 se muestran en los carriles algunas de las clonas a la que se les realizó la extracción de plásmido, donde se observan 2 patrones de bandeo, uno a la altura de 5, 000 pb que corresponde al ADN en forma lineal y uno a la altura de 2, 000 pb que corresponde al ADN superenrollado, esto debido a que las formas circulares de ADN migran a través del gel de agarosa claramente de manera diferente al ADN lineal de la misma masa. Esta es una imagen característica de una lisis alcalina ya que muestra las dos formas topológicamente diferentes del ADN.

7.4 Búsqueda de homologías

Una vez clonados los fragmentos de aprox. 1500 pb en el vector TOPO-TA se secuenciaron comercialmente utilizando los oligonucleótidos T3 y T7. Para determinar las similitudes de las secuencias se realizaron búsquedas tipo blastn en la base de datos del NCBI. Fig 6.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
DQ386262.1	Gallionella capsiferiformans strain ES-2 16S ribosomal RNA gene, c	776	776	100%	0.0	100%	
CP002159.1	Gallionella capsiferiformans ES-2, complete genome	767	2302	99%	0.0	99%	
FJ823160.1	Uncultured bacterium clone 081202-OL-PP69:1-5 16S ribosomal RN	767	767	99%	0.0	99%	
EF562568.1	Uncultured beta proteobacterium clone CF 7 16S ribosomal RNA ge	767	767	99%	0.0	99%	
FN296945.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone Roi L1-H11-T7	745	745	99%	0.0	98%	
FM206032.1	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone GW	745	745	99%	0.0	98%	
FM206031.1	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone GW	739	739	99%	0.0	98%	
GQ390164.1	Uncultured Gallionella sp. clone Eub62B611 16S ribosomal RNA gen	734	734	94%	0.0	100%	
GQ390163.1	Uncultured Gallionella sp. clone Eub62C611 16S ribosomal RNA gen	734	734	94%	0.0	100%	
FJ451755.1	Uncultured bacterium clone ORFRC-FW102-726d-42 16S ribosomal l	734	734	99%	0.0	98%	
EU360492.1	Uncultured bacterium clone FS-Z2-79 16S ribosomal RNA gene, par	734	734	99%	0.0	98%	
GQ390167.1	Uncultured Gallionella sp. clone eub62A12 16S ribosomal RNA gene	730	730	94%	0.0	99%	
FJ382246.1	Uncultured bacterium clone 4S 2q03 16S ribosomal RNA gene, part	730	730	99%	0.0	98%	
AM949269.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MekkoM2-118	730	730	94%	0.0	99%	
AM949135.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone MekkoM1-108	730	730	94%	0.0	99%	

Fig 6. Ejemplo de un resultado tipo Blastn de las secuencias del gen rARN.

Se obtuvieron 160 clonas recombinantes y estas se mandaron secuenciar y se obtuvieron 85 secuencias, cada clona contenía una secuencia, estas tuvieron un tamaño promedio de 280 pb.

La búsqueda de homología se hace para ver aquellos ácidos nucleicos que son similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo. Se introduce la secuencia en el BLAST y se obtiene una lista de todas las secuencias almacenadas que se parecen a la secuencia introducida, ordenada de mayor a menor grado de similitud.

El Blastn de todas las secuencias de genes mostró identidad superior al 98% con diferentes géneros bacterianos, todos estos pertenecientes a bacterias comunes del suelo.

Clase	Número de OTUs	Número de clonas	Especie identificada en el NCBI	Identidad %
Alfaproteobacterias	3	4	<i>Rhizobium sp</i>	100
		2	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	100
		2	<i>Sinorhizobium sp</i>	100
Betaproteobacteria	4	7	<i>Burkholderia sp</i>	98
		2	<i>Herbaspirillum sp</i>	99
		2	<i>Achromobacter sp</i> no cultivable	100
		2	<i>Gallionella sp</i> no cultivable	100
Gammaproteobacteria	12	10	<i>Pseudomonas sp</i>	98
		2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99
		1	<i>Pseudomonas putida</i>	99
		1	<i>Pseudomonas mandelii</i>	100
		7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98
		3	<i>Stenotrophomonas sp</i>	100
		1	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	99
		1	<i>Xanthomonas campestris</i>	99
		1	<i>Xanthomonas sp</i> no cultivable	99
		1	<i>Pantoea sp</i>	99
		1	<i>Pantoea sp</i> no cultivable	99
		2	<i>Enterobacter sp</i>	99
Deltaproteobacteria	3	2	<i>Geobacter sp</i>	99
		1	<i>Geobacter psychrophilus</i>	98
		1	<i>Geobacter sp</i> no cultivable	100
Actinobacteria	5	1	<i>Nocardia sp</i>	99
		1	<i>Mycobacterium sp</i> no cultivable	99
		2	<i>Cellulomonas sp</i>	98
		1	<i>Cellulomonas xylanilytica</i>	100
		4	<i>Microbacterium sp</i>	99
Bacillus	2	6	<i>Bacillus sp</i>	100
		3	<i>Bacillus subtilis</i>	99
Clostridia	1	2	<i>Clostridia sp</i> no cultivable	99
Sin cultivar	1	9	Bacteria no cultivable	100

Tabla 4. Distribución de secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de trigo

En la tabla 4 se muestran los resultados de la búsqueda de homologías en el Blastn donde las secuencias están agrupadas en clases bacterianas, el porcentaje de identidad en el NCBI y el género bacteriano al que mostraron homología. Se encontraron 30 OTUs (unidad taxonómica operacional) distintos dentro de diferentes clases bacterianas. Cada especie de un género bacteriano está clasificada como un OTU distinto. Un OTU es un taxón terminal, un grupo de organismos utilizados en estudio taxonómico que carezcan de denominación de rango taxonómico. De igual manera se encontraron homologías a bacterias no cultivables aisladas de distintos nichos ecológicos.

7.5 Diversidad cultivable versus no cultivable.

Fue de nuestro interés conocer el porcentaje tanto de bacterias cultivables como no cultivables en la rizósfera de plantas de trigo, la mayoría de las bacterias que se encontraron en la rizósfera de plantas de trigo son bacterias cultivables 79% (67 secuencias) y la cantidad de bacterias que no se encontró y que son conocidas sólo por sus genes ribosomales 16S ya que no se pueden cultivar son el 21% (18 secuencias) de las bacterias totales encontradas en este estudio, se tomaron en cuenta dentro de las bacterias no cultivables a aquellas que estaba clasificadas dentro de un genero pero que estaban reportadas en el NCBI como no cultivables asi como a las bacterias reportadas solo como bacterias no cultivables generalmente aisladas de nichos ambientales.

Estos resultados indican que la mayoría de las bacterias que fueron detectadas en este trabajo en la rizósfera de plantas de trigo han podido ser cultivadas por técnicas tradicionales de cultivo, probablemente debido a que la temperatura y las condiciones nutricionales que necesitan para su crecimiento son reproducibles en el laboratorio.

7.6 Clases y géneros bacterianos asociados a la rizósfera de plantas de trigo

Las clases bacterianas reportadas en este trabajo se muestran en la figura 7.

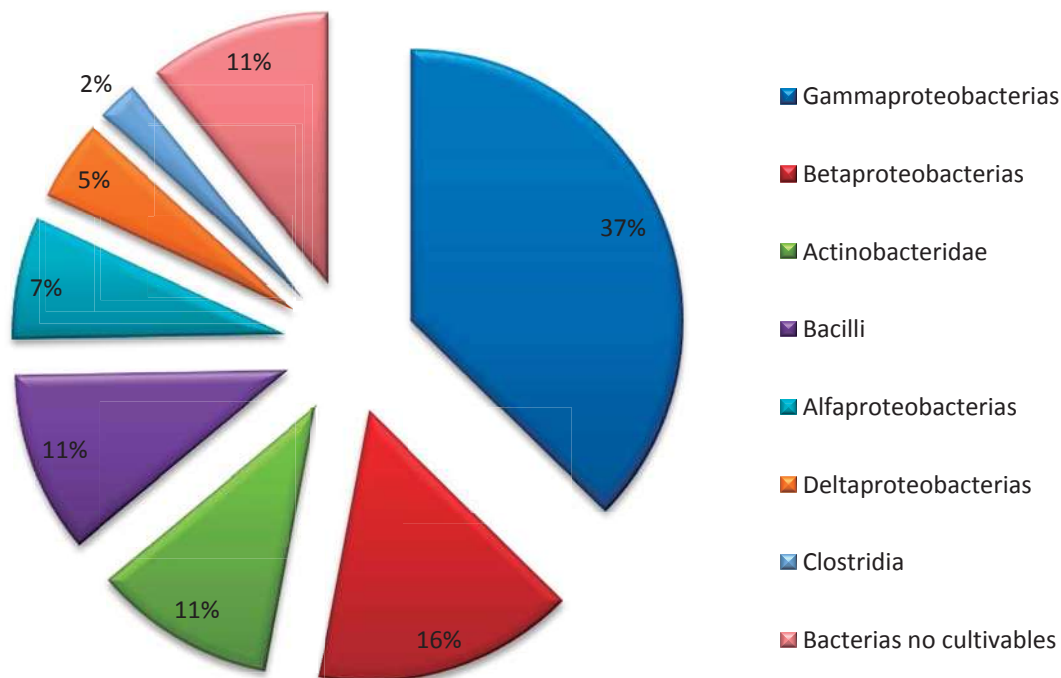


Fig 7. Representación grafica de la diversidad bacteriana rizosférica, la grafica fue determinada por los análisis de secuencias de 16S rADN amplificados de 84 clonas.

Los aislados pertenecientes a 8 clases bacterianas, incluyendo a aquellos con baja frecuencia como Clostridia 2% y Deltaproteobacterias 5%. La clase Gammaproteobacteria representó la frecuencia más alta 37% seguida de

Betaproteobacteria 16%, Actinobacteria 11%, Bacilli 11%, Alfaproteobacteria 7%, así como también se encontró homología a bacterias no cultivables 11%.

Probablemente se encontró una mayor cantidad de proteobacterias que de otros phyla ya que las proteobacterias son abundantes en suelos ricos en materia orgánica, el cual es el caso de nuestro suelo en estudio.

Para esquematizar de manera más específica cuáles eran los géneros más abundantes, se unieron las diferentes especies para sólo graficar los géneros bacterianos. Los resultados se presentan en la figura 8.

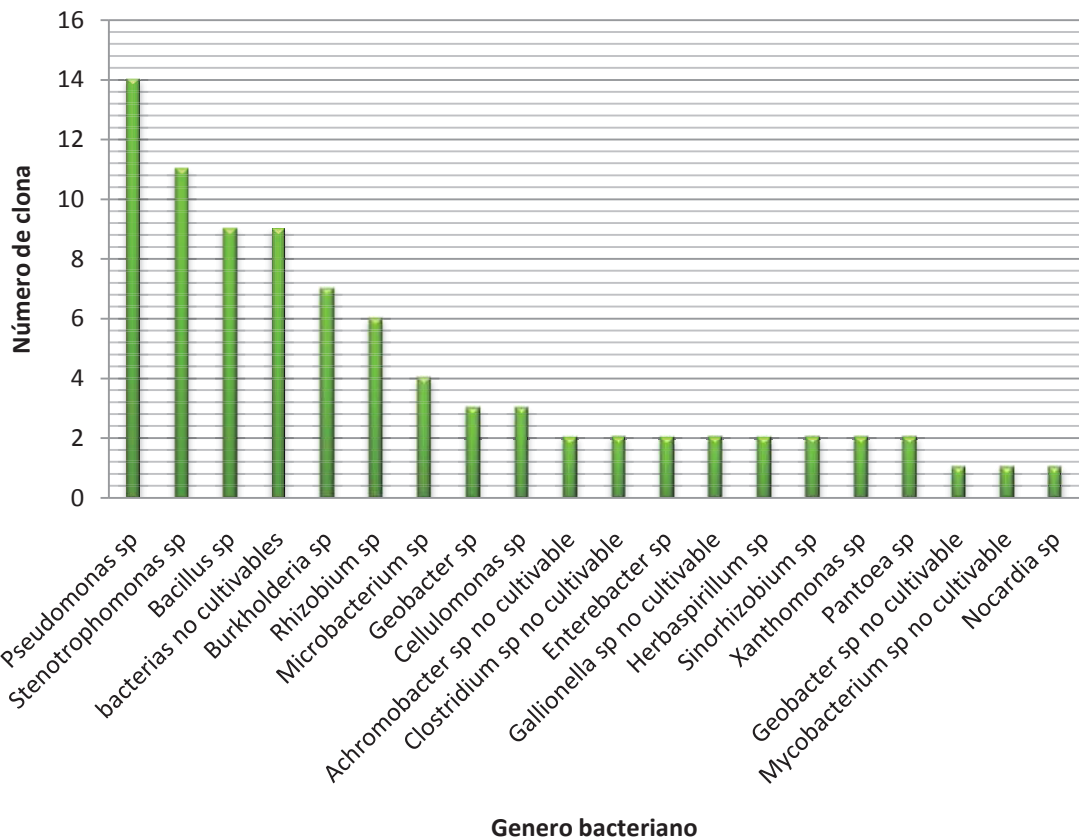


Fig 8 Frecuencia de la representación de las clonas dentro de diferentes géneros bacterianos. Estos ensayos fueron determinados por los análisis de secuencias de 16S rADN amplificados de 84 clonas

Dentro de las gammaproteobacterias el género más dominante fue *Pseudomonas* encontrándose 14 clonas; este género es conocido por su abundancia en suelos. El género *Stenotrophomonas* se encontró siendo el segundo género más abundante con 11 clonas. *Bacillus* 9 clonas, bacterias no cultivables 9 clonas, *Burkholderia* 7 clonas, *Rhizobium* 6 clonas, *Microbacterium* 4 clonas, *Geobacter* 3 clonas, *Achromobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gallionella*, *Herbaspirillum*, *Sinorhizobium*, *Xanthomonas* y *Pantoea* con 2 clonas, y en las que sólo se encontró una clona fueron: *Geobacter*, *Mycobacterium* y *Nocardia*. Todos estos géneros bacterianos han sido reportados en otros trabajos como habitantes del suelo.

7.7 Filogenia Molecular

Los métodos filogenéticos se pueden ser utilizados para diferentes propósitos tales como las comparaciones de más de dos secuencias, análisis de las familias de genes y la estimación de las relaciones evolutivas entre los organismos.

7.7.1 Alineamiento múltiple

La base de todo análisis filogenético es el alineamiento de las secuencias. Las 85 secuencias se alinearon con el programa ClustalW; sin embargo, debido a que las secuencias no podían ser alineadas juntas debido a su tamaño (aprox. 280 pb) se formaron grupos de éstas con la ayuda del programa BioEdit, donde se realizó un BLAST entre las secuencias. En el alineamiento con ClustalW los aminoácidos están representados por el código de una letra y los gaps aparecen indicados con un guion.

En el análisis filogenético se realizó para determinar qué géneros bacterianos estaban cercanamente relacionados basándose en las secuencias de los genes ribosomales 16S.

7.7.2 Construcción de los árboles filogenéticos

Para colocar la raíz de los arboles se utilizaron las secuencias de dos arqueas *Archaeoglobus profundus* (NC_013741) y *Nanoarchaeum equitans* (NC_005213). Se utilizaron como grupos externos genes ribosomales de organismos que no están incluidos en el taxón que se está estudiando. Se utiliza con propósitos de comparación.

Las secuencias obtenidas de la rizósfera de trigo en las figuras 9-13 están marcadas con las letras IVS seguidas de su clave numérica de identificación, iniciando con la numeración que corresponde al número de acceso en el NCBI se encuentran las bacterias cuya identidad se conoce por la secuenciación parcial del gen que codifica para el 16S rARN. En cada nodo del dendrograma se muestra el valor bootstrap. Todas las bacterias se agrupan en clados cuya identidad es similar a las secuencias depositadas en el NCBI.

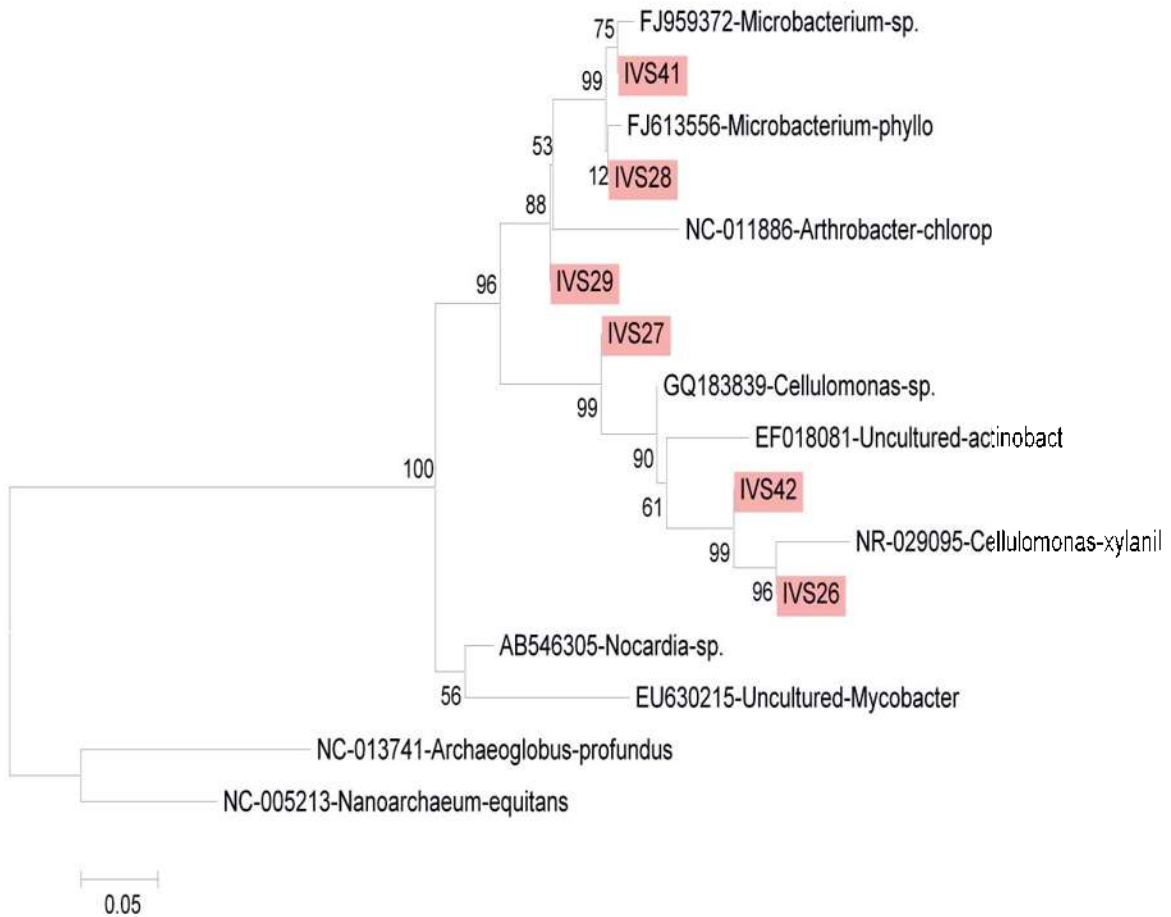


Fig. 9 Dendrograma de las secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de plantas de trigo. Los dendrogramas fueron contruidos usando el programa Mega 4.1 (algoritmo NJ), la numeración indica el número de acceso en el NCBI para las bacterias cuya identidad se conoce. La escala en barras indica 0.05 cambios por nucleótido.

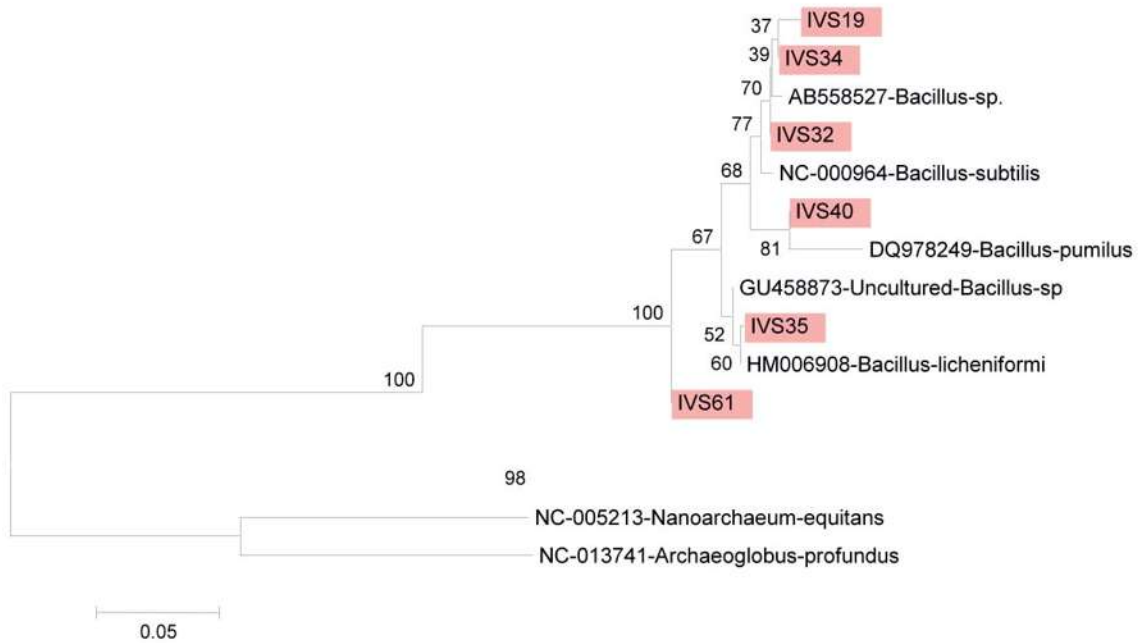


Fig. 10 Dendrograma de las secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de plantas de trigo. Los dendrogramas fueron construidos usando el programa Mega 4.1 (algoritmo NJ), la numeración indica el número de acceso en el NCBI para las bacterias cuya identidad se conoce. La escala en barras indica 0.05 cambios por nucleótido.

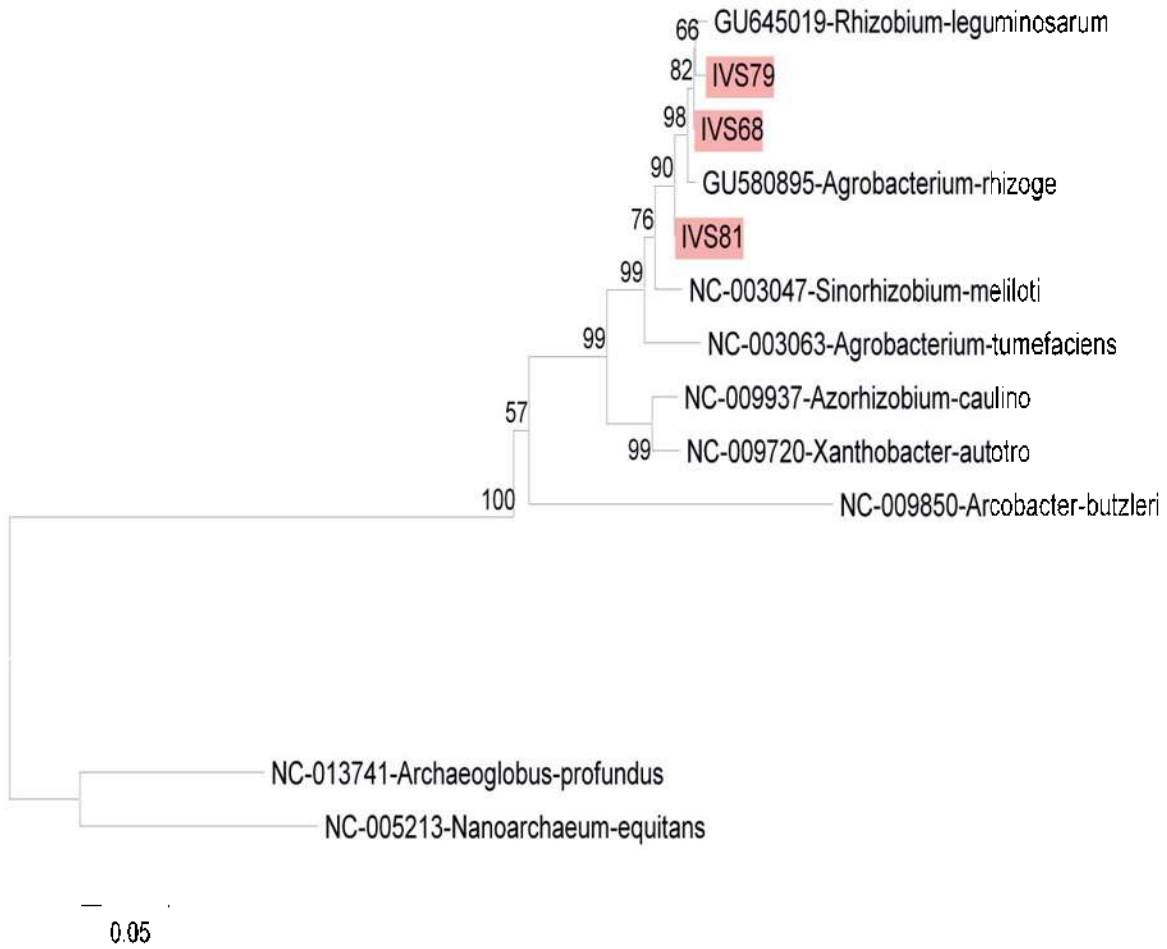


Fig. 11 Dendrograma de las secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de plantas de trigo. Los dendrogramas fueron construidos usando el programa Mega 4.1 (algoritmo NJ), la numeración indica el número de acceso en el NCBI para las bacterias cuya identidad se conoce. La escala en barras indica 0.05 cambios por nucleótido.

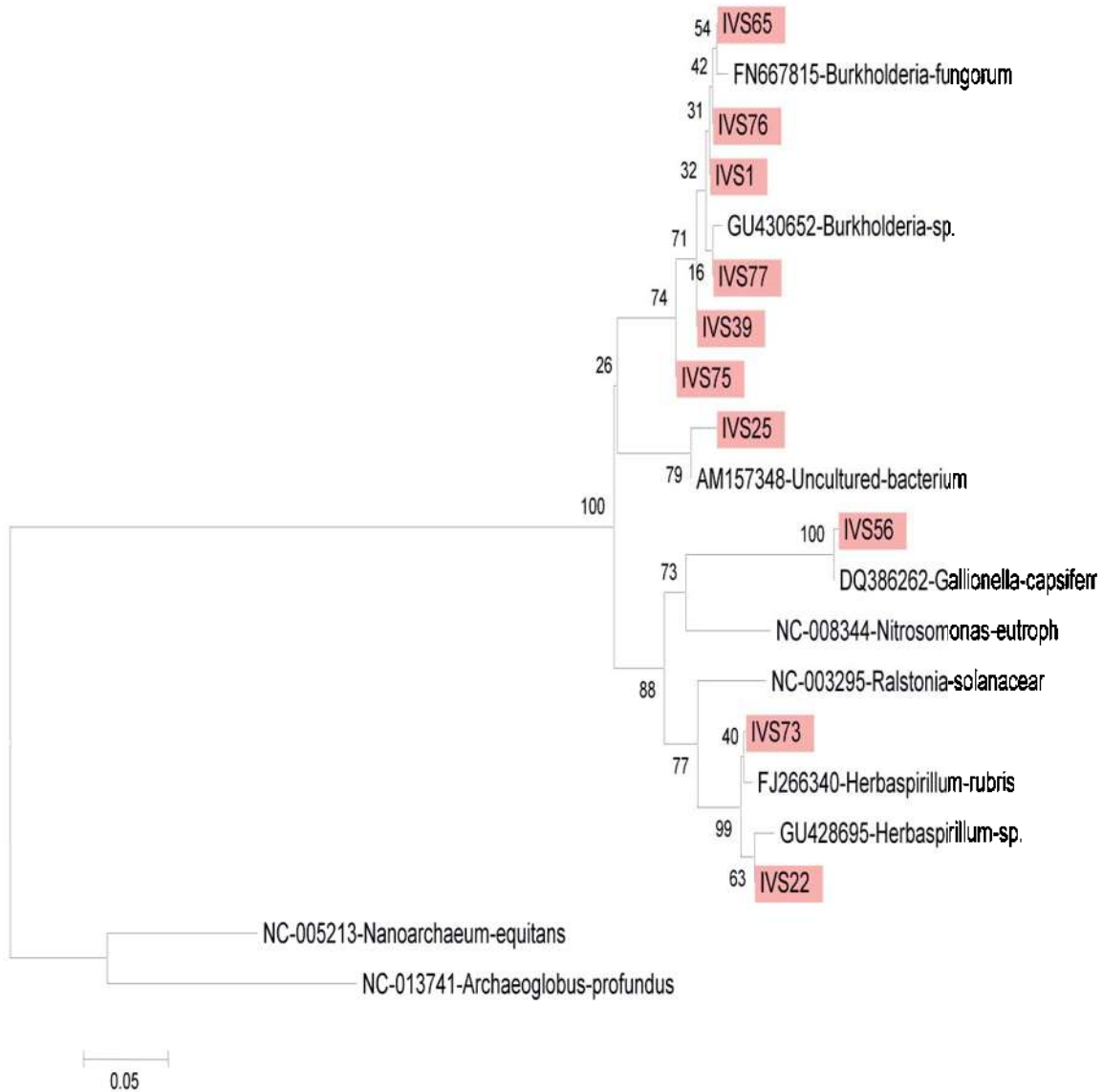


Fig. 12 Dendrograma de las secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de plantas de trigo. Los dendrogramas fueron construidos usando el programa Mega 4.1 (algoritmo NJ), la numeración indica el número de acceso en el NCBI para las bacterias cuya identidad se conoce. La escala en barras indica 0.05 cambios por nucleótido.

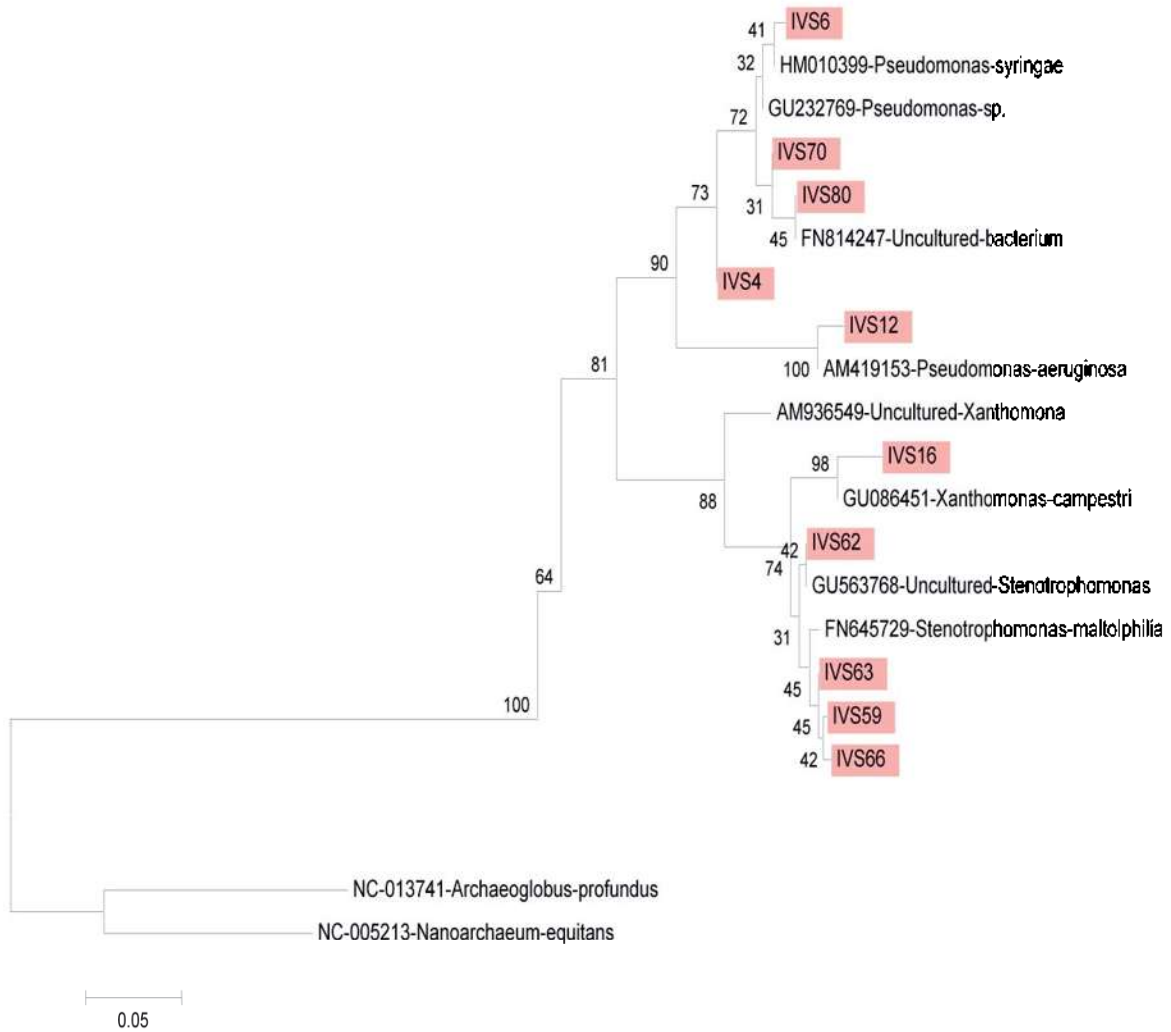


Fig. 13 Dendrograma de las secuencias ribosomales asociadas a rizósfera de plantas de trigo. Los dendrogramas fueron construidos usando el programa Mega 4.1 (algoritmo NJ), la numeración indica el número de acceso en el NCBI para las bacterias cuya identidad se conoce. La escala en barras indica 0.05 cambios por nucleótido.

Debido al tamaño de las secuencias obtenidas no fue posible construir un solo árbol filogenético que incluyera a todos los grupos, por lo que opto por realizar grupos de secuencias donde estas tuvieran similitud y pudieran alinearse. Se emplearon las secuencias de genes 16S de organismos que ya habían sido identificados en las bases de datos para identificar a las secuencias en estudio. Se utilizaron 4 algoritmos diferentes NJ, MP, ME y UPGMA, sin embargo las topologías de los árboles fueron similares. Los resultados muestran que las secuencias en la figura 9 se agruparon dentro de la clase Actinobacteridae. Las secuencias de la figura 10 se encuentran agrupadas dentro de la clase Bacilli, así como las secuencias de la figura 11 se encuentran cercanamente relacionadas a diferentes géneros de la clase alfa proteobacteria. Las secuencias de la figura 12 aparecen agrupadas dentro de la clase beta proteobacteria y finalmente las secuencias de la figura 13 se encuentran cercanamente relacionadas a diferentes géneros de la clase gamma proteobacteria. Los análisis filogenéticos confirman los resultados de similitud tipo Blastn, y que las secuencias que obtuvimos muestran una relación cercana con grupos bacterianos que son identificados como habitantes comunes de la rizósfera de plantas.

7.8 Índice de Shannon-Wiener

El índice de Shannon-Wiener sirve para medir la diversidad, se basa en la teoría de la información y por lo tanto en la probabilidad de encontrar un determinado individuo en un ecosistema. Se evaluó la diversidad alfa que es la riqueza de especies en una comunidad particular a la que consideramos homogénea. En el índice de Shannon-Wiener los valores cercanos a cero indican una baja diversidad y valores cercanos a 5 una alta diversidad, a mayor valor del índice indica una mayor diversidad. La diversidad alfa en la comunidad bacteriana de estudio obtuvo un coeficiente de diversidad de 3.85 bits por individuo. Debido a que el valor obtenido se encuentra cercanamente a 5 esto indica que la rizósfera de trigo alberga una gran diversidad bacteriana.

En este trabajo se analizó la diversidad bacteriana asociada a la rizósfera de plantas de trigo cultivadas en el Estado de Michoacán. Nuestros resultados reportan que el 79% de las secuencias de los genes ribosomales encontradas tienen una alta identidad con bacterias cultivables. Así mismo, el resto corresponde a bacterias no cultivables. Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Chelius et al. (2001) donde se reporta que la gran mayoría de las bacterias de la rizósfera de plantas corresponde a bacterias cultivables. La diversidad de bacterias cultivables y no cultivables depende del sitio de muestreo o ecosistema que se estudie, ya que por ejemplo en estudios sobre diversidad bacteriana en ambientes extremos se ha observado que la gran mayoría de los microorganismos no son cultivables (Brunnel et al. 2008). Cabe destacar que los resultados obtenidos para asignar la clasificación cultivable o no, corresponde a búsquedas tipo Blastn, donde en base a reportes por otros autores reportan los grupos o géneros bacterianos como no cultivables.

Las búsquedas de tipo Blastn, así como los análisis filogenéticos indican que la mayor abundancia de bacterias asociadas a la rizósfera de trigo corresponde a la clase gammaproteobacterias, seguido por la clase betaproteobacteria y actinobacteria, así como la clase bacilli, alfa y deltaproteobacteria. Una proporción importante también mostró similitud con bacterias no cultivables (Fig. 7).

Dentro de las gammaproteobacterias la clase más abundantes fueron aquellas pertenecientes al género de *Pseudomonas*. El género *Pseudomonas* es diverso y pueden encontrarse especies que son patógenos de humanos. En la rizósfera también pueden jugar diversos papeles ecológicos, ya sea como fitopatógeno, como *Pseudomonas syringae* (Ogunseitan 2004) o también puede ser PGPR (Kim et al. 1998). Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal pueden ser diversos, por ejemplo pueden producir y excretar auxinas.

Algunas especies que habitan en el suelo producen antibióticos, como *chlororaphis* que produce el antibiótico Fenacina-1-carboxamida la cual ataca a *Fusarium oxysporum* hongo causante de enfermedades en la planta (Thomashow et al. 2002), *aureofaciens* productor del antibiótico fenacina-1-carboxilato el cual ataca a *Gaeumannomyces graminis*, hongo que causa enfermedades en el trigo (Thomashow et al. 2002). *fluorescens* es productor de la pioluteorina el cual ataca al hongo *Fusarium oxysporum* (Thomashow et al. 2002). En otros trabajos, Valencia et al. (2005) y Santoyo et al. (2010) mostraron que *fluorescens* cepa ZUM80 puede restringir el crecimiento de hongos patógenos de plantas, tales como *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Phytophthora cinnamomi*.

Nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Germida y Siciliano (2001), donde analizan la diversidad en la rizósfera de plantas de cultivares de trigo. Sin embargo, es importante mencionar que ellos analizaron la diversidad mediante el método de ácidos grasos metil esterificados y no por métodos que involucran secuencias de ADN. Ellos reportan que encontraron principalmente bacterias pertenecientes a las clases gammaproteobacteria y bacilli, entre otros, dentro de los cuales aparecen los géneros de *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Curtobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Aureobacter*, *Rathaylbacter*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* y *Enterobacter*.

En otro trabajo realizado por Fisher et al. (2006), analizaron también la rizósfera de trigo mediante la amplificación de los genes 16S rRNA, seguido de un análisis de restricción ribosomal amplificado (ARDRA). Ellos reportan que la rizobacteria más abundante pertenece al género de *Pseudomonas*. Cabe destacar que la cepa de *Pseudomonas* presentó actividad PGPR. Desafortunadamente no analizaron la demás diversidad de bacterias ya que el trabajo se concentró en el análisis como PGPR de *Pseudomonas*.

Otra de las especies más abundantes encontradas en nuestro trabajo corresponde al género *Stenotrophomonas*. Dentro de este género se encuentran especies que son habitantes comunes de una gran variedad de ambientes naturales y artificiales tales como agua, sedimentos, rizósferas de plantas, superficies metálicas, alcantarillado y reactores anaeróbicos (Aznar et al. 1992; Britz et al. 1994; Borowicz et al. 1995; Boonchan et al. 1998), aunque también pueden ser patógenos oportunistas de humanos (Drancourt et al. 1997; Denton and Kerr, 1998). La especie *Stenotrophomonas maltophilia* es un miembro de la población de rizobacterias de plantas crucíferas, que producen sobre todo altos niveles de compuestos que contienen azufre, por ejemplo los aminoácidos como la metionina (Debette and Blondeau 1980). En un trabajo realizado por el grupo de Linda Tomashow reportan que bacterias del género *Stenotrophomonas* son productoras del antibiótico xantobacina. Es interesante remarcar que dicho antibiótico tiene una eficiente actividad inhibitoria hacia el hongo *Rhizoctonia solani*, un patógeno de plantas (Thomashow et al. 2002).

Dentro de la clase gammaproteobacteria, encontramos al género *Pantoea*. Especies como *Pantoea sp.* se han reportado como habitantes de la rizósfera, además de poder colonizar la raíz de las plantas, por lo que se considera endófito. Dentro de este microecosistema puede llevar a cabo la fijación de nitrógeno y promover el crecimiento vegetal (Loiret 2004). Así mismo, bacterias pertenecientes a este género han sido encontradas como endófitas de plantas de arroz, papa y uva, entre otras (Recuenco. and van Vuurde, 2000). Al tener un estilo de vida endófito, es común que se encuentren en la rizósfera, ya que se considera que de este lugar, pueden penetrar la raíz de las plantas.

Otro género interesante que encontramos asociado a la raíz de plantas de trigo fue el de *Xanthomonas*. *Xanthomonas* es un género donde encontramos el patógeno de plantas *X. campestris* (Madigan et al. 2009). Cabe destacar que durante la colecta no observamos que las plantas presentaran síntomas de amarillamiento en las hojas o algún otro tipo de enfermedad que pudiera ser causado por *Xanthomonas*. Sin embargo, no se descarta que pueda causar

alguna enfermedad y que algunos factores ambientales sean los detonadores para que se presente alguna enfermedad. Es por eso importante el muestreo con técnicas moleculares que permitan la identificación temprana de un potencial patógeno en un cultivo, ya que se podría prevenir un desastre mayor en la cosecha.

Otras secuencias de nuestra biblioteca de genes ribosomales mostraron similitud con bacterias del género *Enterobacter*. Las bacterias que pertenecen al género *Enterobacter* pueden ser descomponedoras de la materia orgánica, así como también endófitos de plantas (McInroy and Kloepper 1995). También se han encontrado trabajos donde el género *Enterobacter* se ha aislado de la rizósfera de plantas de maní (Madhaiyan 2009).

De la clase de las betaproteobacterias, el género más dominante en nuestro análisis fue el de *Burkholderia*. *Burkholderia* es un género cercano al de *Pseudomonas*, incluso en años atrás se clasificaban las especies de *Burkholderia* como pertenecientes a *Pseudomonas*. Así, este género es interesante, ya que puede vivir de manera saprofita, así como endófito de plantas (McInroy and Kloepper 1995). El género es muy diverso y podemos encontrar especies que pueden degradar la materia orgánica, sintetizar compuestos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, así como su uso en la biotecnología es muy prometedor, ya que pueden degradar compuestos complejos que dañan el ambiente.

Otro género interesante encontrado en nuestro estudio es el de *Herbaspirillum*, el cual puede ser fijador de nitrógeno, que se encuentra formando simbiosis con plantas de alubias. Este género bacteriano asociado a pastizales ha sido aislado exclusivamente de plantas, especialmente de aquellas que crecen en regiones tropicales (Reinhold 1998).

Dentro de las alfaproteobacterias aparecen los géneros de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, entre otros (Bais et al. 2006). Estos géneros bacterianos son importantes desde el punto de vista agronómico, ya que pueden formar una simbiosis con plantas leguminosas. *Rhizobium leguminosarum* o *etli* son especies que pueden vivir libremente en la rizósfera o formar nódulos con plantas de frijol. En algunos estudios se ha propuesto que esta asociación entre plantas leguminosas puede llevar a cabo la fijación de nitrógeno de aproximadamente 200 a 300 kg N/Ha año (Ogunseitan 2004).

Pertenece a la clase de las deltaproteobacterias se encuentra el género de *Geobacter*. Las especies de *Geobacter* son anaerobios obligados, los organismos de este género son miembros prominentes de las comunidades microbianas en una diversidad de ambientes en la cual llevan a cabo la reducción de metales desasimilatoria, ya sea que ocurra naturalmente o estimulada artificialmente (Coppi et al. 2001). Estos organismos tienen la capacidad de oxidar completamente los compuestos orgánicos a dióxido de carbono o con sustratos húmicos o Fe (III) como el único aceptor de electrones (Lovley 2000). Otros metales también pueden servir como aceptores de electrones en especies de *Geobacter* e incluyen Mn (IV), U (IV), Co (III) y Tc(VII) (Coppi et al. 2001).

Otro género encontrado en nuestra biblioteca es *Clostridium*, que es una bacteria anaerobia obligada de vida libre perteneciente a la clase Clostridia. Este género bacteriano puede llevar a cabo la fijación de nitrógeno de 1-2 kg N/Ha año (Ogunseitan 2004). Un grupo de *Clostridium* fermenta celulosa produciendo ácidos y alcoholes y es responsable de la mayoría de la descomposición anaeróbica de celulosa en el suelo.

Es interesante mencionar que se encontró poca abundancia en nuestra biblioteca de secuencias con similitud a la clase bacilli. Ya que otros estudios, como el trabajo de Germida et al. (1998), donde se analizó la diversidad de bacterias de rizósfera de plantas de trigo de un suelo con pH de 7.5 con altos porcentajes de materia orgánica (4.5%), fósforo (28) y potasio (526). El género

bacteriano que predominó fue *Bacillus*, con muy poca presencia de *Pseudomonas* y de otros tipos de proteobacterias. Esto podría ser debido a otros factores que afectan a las comunidades bacterianas del suelo, como son el tipo de clima, la edad de la planta o los tratamientos con pesticidas.

En otro estudio de Sudhir et al. (2009) se analizaron las bacterias que habitaban la rizósfera de plantas de trigo en un suelo alcalino con un rango de pH de 8.0 a 9.5 mediante un análisis PCR-RFLP de la amplificación de los genes ribosomales 16S. Encontraron que en ese ambiente de condiciones salinas predominaban principalmente las bacterias del género *Bacillus*. Esto debido a una selección de las bacterias por el pH del suelo ya que las bacterias pertenecientes al género de *Bacillus* han evolucionado en la protección contra cambios ambientales, entre ellos la carencia de nutrientes, cambios en la temperatura y la humedad, el estrés oxidativo y la elevación súbita de la salinidad del medio. La producción de plantas en suelos salinos se reduce considerablemente debido a una nutrición inadecuada de la planta junto con el estrés osmótico y la sequía (Benlloch et al. 2005, Muns 2002).

En la clase bacilli se encuentra el género *Bacillus*, donde se han reportado géneros promotores del crecimiento vegetal (Ogunseitan 2004). *subtilis* produce el antibiótico surfactina, que ataca al hongo patógeno *Rhizoctonia solani* (Thomashow et al. 2002). Así también, *thuringiensis* es una bacteria que habita los suelos y que es selectivamente patógeno contra insectos. Muchos insectos que son sensibles a la toxina-Bt son plagas para granos. Las esporas producidas por *thuringiensis* contienen una proteína cristalina (Cry) la cual se descompone bajo las condiciones alcalinas del intestino de los insectos para liberar la toxina que paraliza el sistema digestivo de los insectos los cuales ingieren las esporas cuando están sobre las hojas de las que se alimentan (Ogunseitan 2004).

Finalmente, para conocer el grado de diversidad de nuestra biblioteca de clonas de genes ribosomales se realizó un análisis mediante el índice de diversidad de Shannon. En dicho análisis se calculó el coeficiente de diversidad de Shannon-Wiener es de 3.85 bits por individuo. Lo anterior nos muestra que

existe una gran diversidad bacteriana asociada a las raíces de plantas de trigo analizadas en este estudio. Comparando nuestros resultados con los de Duarte (2007) donde se analizó la rizósfera de limón y maíz obteniendo valores de 2.7 y 2.3 bits por individuo respectivamente.

Finalmente, podemos sugerir que nuestros resultados concluyen que la diversidad bacteriana asociada a plantas de trigo es diversa, además de que se encontró una importante asociación con bacterias rizosféricas en este microambiente. Por lo tanto, podrían estar jugando un papel ecológico importante, como son la degradación de la materia orgánica, la síntesis de antibióticos, la fijación del nitrógeno, la producción de hormonas, etc. Así mismo, nuestro trabajo concluye que la rizósfera de plantas de trigo es un reservorio importante para el aislamiento de bacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal y biocontrol de patógenos.

9.- RESUMEN DE RESULTADOS

- Se obtuvo una biblioteca de 160 clonas.
- Se obtuvieron y analizaron 85 secuencias de la biblioteca de clonas.
- Se identificaron 30 OTUs (unidad taxonómica operacional).
- La clase gammaproteobacteria fue la más abundante, predominando los géneros de *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.
- El análisis filogenético muestra que la mayoría de las secuencias ribosomales pertenecen a bacterias rizosféricas.
- El índice de diversidad de Shannon indica que la rizósfera de plantas de trigo contiene una gran diversidad bacteriana.

La rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) alberga una gran diversidad bacteriana.

11.- PERSPECTIVAS

- Realizar aislados de bacterias de la rizósfera de plantas de trigo del mismo sitio de muestreo.
- Buscar aquellos aislados con alguna actividad promotora del crecimiento vegetal.
- Buscar aislados con actividad de biocontrol de patógenos de plantas, ya sean hongos o bacterias.
- Caracterizar los aislados y determinar a qué especie pertenecen.

12.- PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES

ARTÍCULO I.

Rocío Hernández-León, **Itzi Velázquez-Sepúlveda**, Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Gustavo Santoyo. (2010). Metagenómica de suelos: grandes retos y nuevas oportunidades Biotecnológicas. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. 79: 4-11.

ARTÍCULO II.

Hector A. Marquez-Santacruz, Rocio Hernández-León, Ma del Carmen Orozco-Mosqueda, **Itzi Velázquez-Sepúlveda** and Gustavo Santoyo. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot.) and its detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*. *En prensa*.

ARTICULO III

Rocío Hernández-León, **Itzi Velázquez-Sepúlveda**, Gloria Solís-Guzmán, Miguel Martínez-Trujillo, Gustavo Santoyo. 2010. Actividades hemolíticas en una biblioteca metagenómica de rizósfera de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Biológicas*. *En prensa*.

- Anderson, T.H. and Gray, TRG. (1990). Soil microbial carbon uptake characteristics in relation to soil management. *FEMS Microbiol Ecol.* 74:11-20.
- Aznar, R., Alcaide, E. and Garay, E. (1992). Numerical taxonomy of pseudomonads isolated from water, sediments and eels. *Syst Appl Microbiol* 14: 235-246.
- Bais, HP. Weir, TL., Perry, LG., Gilroy, S., and Vivanco, JM. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:234–266.
- Baker, G.C., Beebee, T.J.C., Ragan, M.A., (1999). *Prototheca richardsi*, a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. *Microbiology* 145:1777–1784.
- Baker, G.C., Gaffar, S., Cowan, D.A. and Suharto, A.R., (2001). Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. *FEMS Microbiol.Lett.* 200: 103–109.
- Baker, G.C., Smith, J.J. and Cowan, D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol* 55:541–555.
- Baldauf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends Gen* 19:345-351.
- Benlloch, M. Fournier, J. Ramos, J. Benlloch, M. (2005). Strategies underlying salt tolerance in halophytes are present in *Cynara carbunculus*. *Plant Sci* 168:653–659.
- Berg, G. and Smalla, K. (2008). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol.* 68:1-13.
- Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (1998). Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol Bioeng* 59:482-494.

- Borowicz, J. J., Brishammer, S. and Gerhardson, B. (1995). A *Xanthomonas maltophilia* isolate tolerating up to 1 percentage sodium azide in Tris-HCl buffer. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 236-237.
- Bradley, R., Burt, A.J. and Read D.J. (1981). Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*. *Nature* 292:335-337.
- Britz, T. J., Spangenberg, G. and Venter, C. A. (1994). Acidogenic microbial species diversity in anaerobic digesters treating different substrates. *Water Sci Technol* 30:55-61.
- Brunnel, O. N., Pascault, M., Egal, C., Bancon-Montigny, M. S., Gonñi-Urriza, F., Elbaz-Poulichet, J.C., Personne, R., (2008). Archaeal diversity in a Fe–As rich acid mine drainage at Carnoules. *Springer* 12:563-571.
- Chelius, M.K. and Triplett, E.W. (2000). Diazotrophic endophytes associated with maize. In: Triplett EW (ed) Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process. *Horizon Scientific Press*. 779–792.
- Chelius, M.K. and Triplett, E.W (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbiol Ecol.* 41:252–263.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J.J. (2003). Mechanisms of biological control of phytopathogenic fungi by *Pseudomonas* spp. In *Plant-Microbe Interactions*, ed. G Stacey, NT Keen, 6:173–224.
- Cohan, F.M. (2001). Bacterial species and speciation. *Syst Biol* 50:513–524
- Coppi, M.V, Leang, C., Sandler, J.S. and Lovley, D.R. (2001) Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. 67:3180-3187.
- Debette, J. and Blondeau, R. (1980). Présence de *Pseudomonas maltophilia* dans la rhizosphère de quelques plantes cultivées. *Can J Microbiol.* 26: 460–463.
- Denton, M. and Kerr K.G. (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:57-80.

- Doolittle, W.F. (1999). Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. 284: 2124-2129.
- Doran, J.W., Sarrantonio, M. and Liebig, M.A. (1996). Soil health and sustainability. *Adv. Agron.* 56:2–54.
- Drancourt, M., Bollet, C. and Raoult, D. (1997). *Stenotrophomonas Africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 47:160-163.
- Duarte, C. (2007) Caracterización de la población bacteriana ferrirreductora de la rizósfera de limón (*Citrus aurantifolia* Christm Swingle) y maíz (*Zea mays*) crecidos en suelo alcalino. Tesis de Maestría. IIQB UMSNH.
- Fischer, S.E., Fischer, S.I., Magris, S., and Mori G.B. (2007) Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J. Microbiol Biotechnol.* 23:895-903.
- Garbeva, P., van Veen, J.A. and van Elsas, J.D. (2004). Assessment of the diversity, and antagonism toward *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47:51–64.
- Garbeva, P., van Veen, J.A. and van Elsas J.D. (2004). Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev. Phytopathol.* 42:243-270.
- Germida, J.J., Siciliano S.D., Frietas J.R. and Seib A.M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecol.* 26:43-50.
- Germida, J.J. and Siciliano, S.D. (2001). Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biol Fertil Soils* 33:410–415.
- Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol Lett.* 251:1–7.

- Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J. and Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329–39.
- Groflkopf, R., Janssen, P.H. and Liesack, W., (1998). Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rARN gene sequence retrieval. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 960– 969.
- Harvey, P.H. (1996). *New Uses for New Phylogenies*. Oxford University Press.
- Henne, A., Daniel, R. R. A. Schmitz, and G. Gottschalk. (1999). Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3901–3907.
- Horner, M.C., Carney, K.M., and Bohannan, B.J.M. (2004). An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc R Soc Lond* 271:113–122.
- Hugenholtz, P., Goebel, P. and Pace, N.R. (1998). Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765–4774.
- INEGI (2010) Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática
- Janssen, P.H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rARN and 16S rARN genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1719-1728.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N. and Lugtenberg, B.J.J. (2006). Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:1121–1126.
- Kim, J., Choi, O., Kang, J.H., Ryu, C.M., Jeong, M.J., Kim, J.W. and Park, C.S. (1998). Tracing of some root colonizing *Pseudomonas* in the rhizosphere using *lux* gene introduced bacteria. *Korean J Plant Pathol* 14:13–18.

- Kirner, S., Hammer, P.E., Hill, D.S., Altmann, A. and Fischer, I. (1998). Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 180:1939–1943.
- Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M. and Lifshitz, R. (1991). Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, p. 315-326.
- Kloepper, J.W. (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting FB Jr (ed) Soil microbial ecology-applications in agricultural and environmental management. 255-274.
- Kopke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H. and Sass, H. (2005). Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Appl Environ Microb.* 71:7819-7830.
- Kravchenko, L.V., Azarova, T.S., Makarova, N.M., Tikhonovich, I.A. (2004). The effect of tryptophan present in plant root exudates on the phytostimulating activity of rhizobacteria. *Microbiology* 73:156–158.
- Læg Reid, M., Bøckman, O.C. and Kaarstad O (1999). World cereal production-challenges and opportunities. In: Agriculture, fertilizers and environment. CABI publishing in association with Norsk Hydro ASA, UK, pp 219–234.
- Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, X., Laguerre, G., Boeufgras, J.M. and Alabouvette, C. (1995). Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 61:1004-1012.
- Lipton, D.S., Blanchar, R.W. and Blevins, D.G. (1987). Citrate, malate, and succinate concentration in P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.* 85:315–317.
- Loiret, F.G., Ortega, E., Kleiner D., Ródes, R. and Dong Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J. Microbiol.* 97:504-511.

- Lovley, D.R. (2000). Fe(III)- and Mn(IV)-reducing prokaryotes. *In* M. Springer-Verlag,
- Lynch, J.M., and Whipps, J.M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* 129:1–10.
- Madhaiyan, M., Selvaraj P., Jung-Sook, L., Venkatakrishnan, Sivaraj S., Keun-Chul, L. and Palani, S. (2009) *Enterobacter arachidis* sp. nov., a plant-growth promoting diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of groundnut. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:15-59.
- Madigan, T. M., Martinko, J.M., Dunlap, V.P. and Clark P.D. (2009). Biología de los microorganismos. 758
- Mantelin, S., Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot.* 55:27–34.
- Marschner, P., Yang, CH., Lieberei, R. and Crowley, D.E. (2001). Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 33: 1437–1445.
- McInnery, J.O., Wilkinson, M., Patching, J.W., Embley, T.M., Powell, R., (1995). Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rARN sequences from deep-sea deposit feeder. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1646–1648.
- McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342.
- Milner, J., Silo-Suh, L., Lee, J.C., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J. (1996). Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3061–65.
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 28:239–250.
- Nehl, D.B., Allen S.J. and Brown J.F. (1997). Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* 5:1-20.

- Nowak, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J. and Loper, J.E. (1999). Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.* 181:2166–74
- Ogunseitan, O. (2005). Microbial diversity. Form and function in prokaryotes. *Blackwell Science Ltd.*
- Omay, A.B., Rice, C.W., Maddux, L.D. and Gordon, W.B. (1997). Changes in soil microbial and chemical properties under long-term crop rotation and fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:1672-1678.
- Pace, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere *Science* 276:734-740.
- Paul, E.A. and Clark F.E. (1989) Soil microbiology and biochemistry Academic Press. San Diego ISBN: 0-12-546805-9.
- Pliego, C., DeWeert, S., Lamers, G., De Vicente, A. and Bloemberg, G. (2008). Two similar enhanced root-colonizing *Pseudomonas* strains differ largely in their colonization strategies of avocado roots and *Rosellinia neatrix* hyphae. *Environ. Microbiol.* 10:3295–3304.
- Prosser, J.I. (2002). Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant and soil* 244: 9-17.
- Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, D. (2003) Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:35-43.
- Ranjard, L. and Richaume, A. (2001) Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 151:707-716.
- Recuenco, E.M and van Vuurde J.W.L. (2000). Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canad J Microbiol.* 46:1036-1041.
- Reinhol, B. and Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol* 6:139–144.
- Robe, P., Nalin. R., Capellano, C., Vogel, T.M. and Simonet, P. (2003) Extraction of DNA from soil. *Eur J Soil Biol* 39: 183-190.

- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, MS. and Wie, HX. (2003). Bacterial volatiles promote growth of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4927–4932.
- Sait, M., Davis, K.E.R. and Janssen P.H. (2006). Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1852-1857.
- Sambrook, T. and Rusell, D. (2001). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. NY. Vol I, II y III.
- Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., Orozco-Mosqueda, Ma. del C., Peña-Cabriales, J.J. y Farías-Rodríguez, R. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana* 28: 53-60.
- Shuman, S. (1991). Recombination mediated by *Vaccinia* virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88. 10104-10108.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using *Vaccinia* DNA Topoisomerasa. *J. Biol. Chem.* 269:32678-32684.
- SIAP-SARPA. Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y pesquera de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. México 2010.
- Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., Van Den Broek, Van Mil S. and WeARNrs, P. (2001). Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in the Wheat Fields as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 5:2284-2291.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*, W.H.Freeman.

- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivisam, M. (2004). Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30: 205–240.
- Spaink, H.P., Kondorosi, A. and Hooykaas, P.J.J. (1998). *The Rhizobiaeceae*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad
- Spiegelman, D., Whissell, G. and Greer, W. (2005). A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can J. Microbiol* 51:355-386.
- Sudhir, K., Upadhyay, Devendra, P., Singh, Ratul, S. (2009). Genetic Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Rhizospheric Soil of Wheat Under Saline Condition. *Curr Microbiol* 59:489–496.
- Thomashow, L.S., R.F. Bonsall, and D.M. Weller. (2002). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes *in situ*. *Manual of Environmental Microbiology* (Second Edition), pp. 638-659.
- Torsvik, V., Goskoyr, J. and Daae, F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria, *Appl. Environ. Microbiol* 56:782-787.
- Torsvik, V., Ovreas, L. and Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296:1064–1066.
- Valencia, E., Villegas, J., Sánchez, J.M., Peña, J.J. y Farías, R. (2005) Inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* Zum80 incapaces de producir sideróforos. *Revista Terra Latinoamericana* 23:65-72.
- van Elsas, J.D. and Trevors, J.T. (1997). *Modern Soil Microbiology*. New York: Marcel Dekker.
- Van Rhijn, P. and Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124–42.
- van Waasbergen, L.G., Balkwill, D.L., Crocker, F.H., Bjornstad, B.N. and Miller, R.V., (2000). Genetic diversity among Arthrobacter species collected across a heterogeneous series of terrestrial deep-subsurface sediments as

determined on the basis of 16S rARN and recA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3454– 3463.

- Vartoukian S.R., Palmer R.M and Wade W.G. (2010) Strategies for culture of “unculturable” bacteria. *FEMS Microbiol let.* 39:1-7
- Vassilev, N., Vassileva, M. and Nicolaeva, I. (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:137–144.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D. Y., Paulsen, I., Nelson, K. E. and Nelson, W. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.
- Weisburg, W., Barns S.M., Pelletier D.A and Lane D.J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* 173:697-703.
- Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, B. B. Gardener, and L. S. Thomashow. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309-348.
- Whelan, S., Lio, P. and Goldman, N. (2001). Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends gen.* 17:262-272.
- Whitehead T.R. and Cotta M.A. (1999) Phylogenetic diversity of methanogenic *Archaea* in swin waste storage pits. *FEMS Microbiol letters.* 179: 223-226.
- Whitman, W., Coleman, D. & Wiebe, W. (1998) Prokaryotes: The unseen majority *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6578–6583.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.
- Yang, J., Kloepper, J.W. and Ryu, C.M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1–4.