



ENDOMICROBIOTA BACTERIANA DE AGAVE PULQUERO (*Agave salmiana*). I. AISLAMIENTO, FRECUENCIA E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

BACTERIAL ENDOMICROBIOTA OF AGAVE PULQUERO (*Agave salmiana*). I. ISOLATION, FREQUENCY AND MOLECULAR IDENTIFICATION

Gerardo A. Aguado-Santacruz^{1,2}, Dinah Linette Aguado-Rodríguez², Blanca Moreno-Gómez¹, Diego Arroyo-González², Daniel Centeno-Jamaica², César Aguirre-Mancilla³ y Edmundo García-Moya^{4*}

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Bajío, Celaya, Guanajuato, México. ²BIOqualitum, Celaya, Guanajuato, México. ³Tecnológico Nacional de México/I.T. Roque, Celaya, Guanajuato, México. ⁴Colegio de Postgraduados, Postgrado en Botánica, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (edmundo@colpos.mx)

RESUMEN

Las tendencias actuales de practicar la agricultura apuntan hacia el uso de microorganismos para incidir en la sanidad, producción y calidad de las cosechas; estudios previos en agave han logrado el aislamiento de diferentes microorganismos, pero la identificación de bacterias endófitas es un área que se ha abordado poco a pesar de su importancia económica. En el presente estudio se llevó a cabo un análisis de la endomicrobiota presente en cinco tipos de agave pulquero (*Agave salmiana*): Manso, Chalqueño, Ayoteco, Púa Larga y Carricillo. Pencas de estas plantas fueron colectadas en el poblado de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala y procesadas para el aislamiento de microorganismos endófitos en medios selectivos para bacterias diazotróficas, bacilos y *Pseudomonas* fluorescentes. Los microorganismos aislados fueron identificados molecularmente por la amplificación de fragmentos de la subunidad ribosomal 16S. Se identificaron 35 bacterias endófitas a partir de los cinco tipos de agave pulquero. El número de aislamientos obtenidos correspondió a 7, 11, 3, 5 y 9 a partir de Ayoteco, Carricillo, Chalqueño, Manso y Púa Larga, respectivamente. La endomicrobiota bacteriana de Carricillo fue la más diversificada (nueve especies), mientras que Chalqueño presentó la menor riqueza bacteriana (tres especies); Ayoteco, Manso y Púa Larga presentaron cinco especies bacterianas únicas. En forma global, los géneros de bacterias con mayor representación en los cinco tipos de agave fueron *Bacillus* con 12 entradas, y *Enterobacter* y *Leclercia* con siete entradas cada uno. *Bacillus subtilis* y *Leclercia* sp. fueron las especies mayormente representadas en los agaves al encontrarse en tres de los cinco tipos analizados.

Palabras clave: *Agave* sp., *Agave salmiana*, *Bacillus* sp., agave pulquero, bacteria endófita, PGPR.

SUMMARY

Current trends in practicing agriculture point towards the use of microorganisms to influence health, production and quality of crops; previous studies in agave have achieved the isolation of different microorganisms, but the identification of endophytic bacteria is an area that has been little addressed despite its economic importance. In the present study, an analysis of the endomicrobiota present in five types of pulquero agave (*Agave salmiana*): Manso, Chalqueño, Ayoteco, Púa Larga and Carricillo was carried out. Leaves of these plants were collected in Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala, Mexico and processed for the isolation of endophytic microorganisms in selective media for diazotrophic bacteria, bacilli and fluorescent *Pseudomonas*.

The isolated microorganisms were molecularly identified by the amplification of fragments of the 16S ribosomal subunit. Thirty-five endophytic bacteria were identified from the five types of pulquero agave. The number of isolations obtained corresponded to 7, 11, 3, 5 and 9 from Ayoteco, Carricillo, Chalqueño, Manso and Púa Larga, respectively. The bacterial endomicrobiota of Carricillo was the most diversified (nine species), while Chalqueño presented the lowest bacterial richness (three species); Ayoteco, Manso and Púa Larga presented five unique bacterial species. Overall, the genera with the highest representation in the five types of agave were *Bacillus* with 12 entries, and *Enterobacter* and *Leclercia* with seven entries each. *Bacillus subtilis* and *Leclercia* sp. were the species most represented in the agaves as they were found in three of the five types analyzed.

Index words: *Agave* sp., *Agave salmiana*, *Bacillus* sp., endophytic bacteria, PGPR, pulquero agave.

INTRODUCCIÓN

Los agaves son plantas monocotiledóneas, siempre verdes, generalmente suculentas y endémicas de América; se distribuyen desde los 34° latitud norte hasta los 60° latitud sur, área que coincide con el centro de diversificación del género en México. La distribución del género abarca desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela; esta área incluye todas las islas del Caribe, desde las Bahamas a Aruba, Curaçao y Trinidad y Tobago (García, 2007). Los agaves tienen una amplia distribución en México, encontrándose en más del 75 % de su territorio. Aproximadamente 150 de sus 200 especies se encuentran en este país y el 55 % crecen exclusivamente en México (CONABIO, 2006; García, 2007). Las plantas de agave han sido utilizadas desde tiempos prehispánicos para una gran variedad de aplicaciones alimenticias, textiles, de la construcción y fines domésticos. En la actualidad los agaves o magueyes son explotados primordialmente para la producción de fibras y bebidas alcohólicas tales como tequila y mezcal (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal, 2007), aunque más recientemente se ha buscado

diversificar el uso de los agaves en la industria alimenticia; por ejemplo, para la fabricación comercial de inulina y jarabe a partir del agave azul (López y Urias-Silvas, 2007).

Las prácticas agronómicas para la gestión del agave no han cambiado mucho en los últimos años, a pesar de los avances tecnológicos registrados en otros cultivos de importancia como el maíz, frijol, cebada y hortalizas, en particular aquellas relacionados con su manejo biotecnológico/microbiológico que tienen por objetivo aumentar la productividad y sanidad de las cosechas, minimizar la aplicación de agroquímicos y reducir su impacto en el ambiente. Actualmente existe una fuerte tendencia, no solo en México sino en todo el mundo, para modificar la manera en que se practica la agricultura (Dutta y Thakur, 2017). La implementación de este nuevo modelo agrícola ha sido motivada por el aumento constante en los precios de los agroquímicos, por la concientización de los efectos perjudiciales del uso de estos productos en el ambiente y en la salud humana, pero principalmente por los precios que las comercializadoras extranjeras están dispuestas a pagar por los productos agrícolas libres de pesticidas químicos (alrededor de un 30 % más que por los productos convencionales). En esta nueva forma de practicar la agricultura el uso de microorganismos es fundamental para alcanzar las metas proyectadas en cuanto a sanidad, producción y calidad de las cosechas (Aguado-Santacruz, 2012). Estudios previos en agave han logrado el aislamiento de diferentes microorganismos, pero la identificación de bacterias endófitas es un área que se ha abordado poco, a pesar de su importancia económica. Entre los trabajos realizados a la fecha se puede mencionar el de Martínez-Rodríguez *et al.* (2014), quienes a partir de la base de pencas de *Agave tequilana* lograron aislar una gran diversidad de bacterias; parte de las cuales pudieron ser confirmados como bacterias promotoras de crecimiento por sus capacidades bioquímicas para fijar nitrógeno, producir auxinas, solubilizar fosfatos o por sus actividades de biocontrol contra *Fusarium oxysporum*; sin embargo, los autores no presentaron evidencia de las capacidades de promoción de crecimiento de los microorganismos *in vivo*. Desgarennes *et al.* (2014) analizaron mediante un enfoque metagenómico las comunidades bacterianas diazotróficas presentes en la rizósfera, filósfera y la endósfera de raíz y hoja de las especies *Agave tequilana* y *A. salmiana*; los autores encontraron una diferencia clara entre las comunidades de bacterias presentes en el suelo, la filósfera y la endósfera de raíz y hoja. Estos autores lograron el aislamiento de 18 cepas bacterianas en un medio libre de nitrógeno, de las cuales ocho provinieron de la endósfera de raíz y rizósfera de *A. tequilana*, y 10 de la endósfera de raíz, la rizósfera y filósfera de *A. salmiana*. Los aislamientos de la endósfera de *A. tequilana* pertenecieron a la familia Enterobacteriaceae, mientras que en *A. salmiana*

se identificaron dos miembros de Enterobacteriaceae y una bacteria del género *Stenotrophomonas*. Por su parte, Coleman-Derr *et al.* (2016), también bajo un enfoque de metagenómica, analizaron las comunidades microbianas presentes en la rizósfera, filósfera y la endósfera de raíz y pencas de las mismas especies de agave, y de la especie *A. deserti*, encontrando que la composición de las comunidades procarióticas estuvo determinada principalmente por el propio hospedero, mientras que la estructura de las comunidades fúngicas estuvo influenciada primordialmente por la biogeografía de la especie hospedera. Aunque no encontraron diferencias en la riqueza microbiana de las tres especies de *Agave*, si detectaron menores niveles en la diversidad bacteriana en las plantas cultivadas de *A. tequilana* comparadas con la observada en los agaves nativos. El objetivo de la presente investigación fue conocer la endomicrobiota bacteriana del agave pulquero y su localización dentro de las pencas de agave y, con base en la identidad y las actividades de los microorganismos descritas previamente en la literatura, establecer algunos de los posibles mecanismos bacterianos que contribuyen al crecimiento y desarrollo de estas plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio y material genético

La presente investigación se llevó a cabo en el Rancho Magueyero San Isidro, ubicado a 5 km al suroeste de la localidad de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala. Esta empresa es la principal productora de pulque de la región y posee más de 60 ha de este cultivo. Los tipos de agave pulquero utilizados para el aislamiento de las bacterias incluyeron a Manso, Chalqueño, Ayoteco, Púa Larga y Carricillo. Se colectaron dos pencas provenientes de dos plantas distintas por cada tipo, procurando escoger una de las hojas de desarrollo intermedio y de mayor sanidad aparente.

Preparación de las muestras vegetales

Una vez realizado el trabajo de campo, se procedió al traslado de las muestras a los laboratorios de la empresa BIOqualitum S.A. de C.V. en la ciudad de Celaya, Guanajuato, para su procesamiento. Las muestras vegetales fueron procesadas dentro de los 5 d posteriores a su colecta, considerando tres secciones de las pencas (superior, media e inferior); la sección inferior fue aquella más próxima a la roseta de las plantas, mientras que la sección superior incluía la púa de la pena; se retiraron las espinas de agave para una mejor manipulación y, a continuación, los trozos de pencas de agave se lavaron con agua corriente y se fragmentaron en cubos de 5 × 5

cm. Estos trozos se desinfectaron con etanol 70 % por 1 min e hipoclorito de sodio 3 % por 2 min, y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

Aislamiento de microorganismos endófitos

A los fragmentos de agave se les retiró la epidermis, se dividieron en trozos más pequeños de 1 × 1 cm, se colocaron sobre servilletas de papel estériles para eliminar el exceso de humedad y finalmente se sembraron en medios selectivos para aislamiento de bacilos (medio BS; Cazorla *et al.*, 2007), bacterias diazotróficas (medios Rojo Congo y Elmarc; Ferrera *et al.*, 1993) y *Pseudomonas* spp. (medio Gould S1; Johnsen y Nielsen, 1999). Las placas de Petri, conteniendo los fragmentos de agave en los distintos medios selectivos fueron incubadas en una estufa a 30 °C hasta observar el desarrollo de crecimiento bacteriano. Una vez obtenidos los aislamientos en los medios de selección respectivos se llevó a cabo un estudio en el cual las cepas fueron caracterizadas morfológica y molecularmente.

Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos

Se llevó a cabo una descripción morfológica de las bacterias a nivel macro y microscópico. Utilizando la tinción de Gram, se describió la forma de las bacterias en el microscopio y su categoría en función de la composición de la pared celular. La categorización de las bacterias en Gram + o Gram – fue importante para definir el método a utilizar para la extracción del ADN. Para llevar a cabo el aislamiento de bacterias formadoras de esporas del género *Bacillus* se utilizó la técnica de tinción de endosporas con tinta china para detectar la presencia de estas estructuras.

Identificación molecular de las bacterias

La identificación molecular se basó en el análisis de la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal. El ARN ribosomal 16S es el componente de la subunidad menor de los ribosomas procariotas que se une a la secuencia de Shine-Dalgarno y posee una secuencia muy conservada que puede usarse para la identificación de bacterias a nivel de especie mediante una comparación con las bases de datos disponibles. Brevemente, los microorganismos se crecieron en 10 mL de su medio respectivo por 24 h y posteriormente se extrajo el ADN genómico mediante el método de sarcosina (Lopes *et al.*, 1995). Para verificar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 %; a continuación, utilizando el ADN extraído, se amplificó el gen 16S ribosomal mediante PCR utilizando los iniciadores 1540R y 46F (Ohnishi *et al.*, 2011). Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAEX II de (Quiagen) y posteriormente

se clonaron en el vector TOPO 2.1 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron dos colonias clonadas previamente verificadas por contener el fragmento esperado del gen 16S ribosomal que es de aproximadamente de 1500 pb, se extrajo ADN plasmídico de estas cepas clonadas para su análisis en el laboratorio de secuenciación del LANGEBIO en Irapuato, Guanajuato, México, para obtener las secuencias completas y finalmente comparar las secuencias obtenidas consultando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

RESULTADOS

Después de colocar los fragmentos de cada tipo de agave muestreados en los medios de selección, fue posible observar colonias bacterianas entre 5 y 8 d después de la incubación a 30 °C. Se aisló un total de 103 bacterias a partir de los cinco tipos de agave; de éstos, 30 correspondieron a *Bacillus* putativos aislados en medio BS, 12 a *Pseudomonas* y 61 a bacterias diazotróficas; la cantidad de bacterias diazotróficas aisladas en medio Rojo Congo (30) fue muy semejante a la cantidad de bacterias diazotróficas aisladas en medio Elmarc (31). Debido a que tanto el medio ELMARC como el Rojo Congo están diseñados para lograr el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se pudo reducir la cantidad total de microorganismos aislados a sólo 72, al considerar solamente las bacterias diazotróficas aisladas en medio Rojo Congo. El mayor número de aislamientos bacterianos se obtuvo a partir de los tipos Carricillo (31) y Ayoteco (26), y el menor en Manso (13). En forma global, la mayor cantidad de aislamientos bacterianos se obtuvieron a partir de las porciones superiores de las pencas (44), mientras que de las secciones media e inferior se obtuvieron 35 y 24 microorganismos, respectivamente. Las secuencias obtenidas del gen para ARNr 16S de cada aislamiento se analizaron y se llevó a cabo su comparación en la base de datos del NCBI para establecer la identidad de las bacterias endófitas y su redundancia por origen; es decir, por su procedencia de una misma pena, logrando reducir el número inicial de 72 aislamientos a 35 especies de bacterias, las cuales son enlistadas en el Cuadro 1 para cada tipo de agave. Considerando esta depuración de microorganismos se pudo observar que la frecuencia de especies de bacterias endófitas en cada tipo de agave se redujo a 7, 11, 3, 5 y 9 para Ayoteco, Carricillo, Chalqueño, Manso y Púa Larga, respectivamente (Cuadro 1); asimismo, esta reducción de microorganismos cambió la frecuencia de especies bacterianas de tal modo que las secciones media (15) y superior (14) mostraron un número semejante de especies entre ellas, pero mayor al detectado en la parte inferior de las pencas (seis) (Cuadro 1). El número total de especies bacterianas únicas detectadas en los cinco tipos

Cuadro 1. Localización de las bacterias endófitas dentro de las pencas de agave pulquero y su identidad taxonómica determinada mediante la amplificación de fragmentos de la subunidad ribosomal 16S.

Tipo de agave	Bacteria	Posición
Ayoteco	<i>Enterobacter</i> sp.	Inferior
	<i>Bacillus mojavensis</i>	Inferior
	<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Media
	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Superior
	<i>Bacillus subtilis</i>	Superior
Carricillo	<i>Bacillus mojavensis</i>	Superior
	<i>Brevibacillus brevis</i>	Inferior
	<i>Brevibacterium</i> sp.	Media
	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Media
	<i>Bacillus halotolerans</i>	Media
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Media
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Superior
	<i>Leclercia</i> sp.	Superior
	<i>Aeromonas caviae</i>	Superior
	<i>Leclercia</i> sp.	Superior
Chalqueño	<i>Acinetobacter</i> sp.	Inferior
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Inferior
	<i>Bacillus tequilensis</i>	Superior
Manso	<i>Enterobacter cloacae</i>	Inferior
	<i>Pseudomonas putida</i>	Superior
	<i>Leclercia</i> sp.	Superior
	<i>Enterobacter kobei</i>	Superior
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Superior
Púa Larga	<i>Enterobacter</i> sp.	Media
	<i>Enterobacter</i> sp.	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media
	<i>Leclercia</i> sp.	Media
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	Media
	<i>Leclercia</i> sp.	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Media
	<i>Bacillus subtilis</i>	Superior
	<i>Bacillus halotolerans</i>	Superior

de agave fue de 19, siendo el endomicrobioma de Carricillo el más diversificado (nueve especies), mientras que el de Chalqueño presentó una menor riqueza bacteriana (tres especies). Ayoteco, Manso y Púa Larga presentaron cinco especies bacterianas únicas (Cuadro 2). En forma global, los géneros mayormente representados en los cinco tipos de agave fueron *Bacillus* con 12 entradas y *Enterobacter* y *Leclercia* con siete entradas cada uno (Cuadro 2). *Bacillus subtilis* y *Leclercia* sp. fueron las especies más representadas en los agaves muestreados, encontrándose en tres de los cinco tipos analizados; *B. subtilis* fue parte del endomicrobioma de Ayoteco, Carricillo y Púa Larga, mientras que *Leclercia* sp. se presentó en Carricillo, Manso y Púa Larga (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

En la presente investigación se lograron identificar, mediante un enfoque molecular, bacterias endófitas cultivables *in vitro*, aisladas a partir de cinco tipos de agave pulquero. Hasta donde se conoce, éste es el primer estudio realizado en variedades de agave pulquero para conocer el microbiota endófito existente en este cultivo. Anteriormente, Martínez-Rodríguez *et al.* (2014) analizaron el microbiota endófito de *A. tequilana* a partir de bases de pencas; estos autores identificaron en este agave 11 especies bacterianas: *Acinetobacter* sp., *A. baumanii*, *A. bereziniae*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter hormaechei*, *Bacillus* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus casseliflavus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Gluconobacter oxydans*. Las coincidencias en cuanto a los géneros bacterianos encontrados en la presente investigación con la realizada por Martínez-Rodríguez *et al.* (2014) incluyeron a *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. En el presente estudio destacaron los tipos Carricillo y Púa Larga por poseer la mayor cantidad de bacterias endófitas; sin embargo, Carricillo, con nueve, fue el tipo que sobresalió por presentar la mayor diversidad de especies bacterianas (Cuadro 1). Siete de las 19 especies encontradas en los agaves se ubicaron en el grupo de las Enterobacterias (*Enterobacter* spp., *Erwinia tasmaniensis* y *Leclercia* spp.), cinco en el orden *Bacillales* (*Bacillus* spp. y *Brevibacillus brevis*), tres dentro de los *Pseudomonadales* (*Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* sp.), tres en el orden *Actinomycetales* (*Brevibacterium* spp., *Curtobacterium flaccumfaciens*) y una en el orden *Aeromonadales* (*Aeromonas caviae*). Estos resultados concuerdan con el estudio de Yaish *et al.* (2015), en el cual el género *Bacillus* y el grupo de las Enterobacterias conformaron las bacterias más representativas encontradas dentro del microbioma de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.). Las enterobacterias conforman un grupo de microorganismos en el cual confluye una gran variedad de mecanismos

de promoción de crecimiento, que incluyen la fijación biológica de nitrógeno, la producción de AIA, la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos (Lin *et al.*, 2012); estas bacterias se encuentran entre los endófitos predominantes en distintos cultivos, por ejemplo, en caña de azúcar (Taulé *et al.*, 2012). Por otro lado, en la rizósfera de algunos cultivos como arroz, trigo y ginseng, el género *Bacillus* tiende a ser el taxón predominante (Fan *et al.*, 2016). Derivado del presente estudio, es claro que el microbioma de agave pulquero incluye una gran diversidad de bacterias que le confieren una multiplicidad de mecanismos de acción potenciales con gran valor en la agricultura; en este contexto, es importante destacar el hecho que las 19 especies de bacterias endófitas encontradas (Cuadro 2) han sido consignadas con anterioridad como promotoras de crecimiento.

Algunas de las bacterias encontradas en los agaves pulqueros tienen el potencial para fijar nitrógeno atmosférico como *Acinetobacter* sp. (Kuan *et al.*, 2016), *Bacillus halotolerans* (Slama *et al.*, 2019), *Brevibacillus brevis* (Nehra *et al.*, 2016), *Enterobacter cloacae* (Ryu *et al.*, 2003), *Erwinia tasmanensis* (Clavijo *et al.*, 2012) y *Leclercia adecarboxylata* (Laili *et al.*, 2017); para producir compuestos antimicrobianos como *Acinetobacter* sp. (Rokhbakhsh-Zamin *et al.*, 2011), *Pseudomonas putida* (Hassan *et al.*, 2011), *Enterobacter ludwigii* (Shoebitz *et al.*, 2009), *Brevibacterium halotolerans* (Slama *et al.*, 2019), *Bacillus tequilensis* (Li *et al.*, 2018) y *Bacillus subtilis* (Caulier *et al.*, 2019); para producir compuestos promotores de crecimiento (hormonas, compuestos volátiles, entre otros) como *Bacillus subtilis* (Wagi y Ahmed, 2019), *Bacillus tequilensis* (Li *et al.*, 2010), *Bacillus halotolerans* (Slama *et al.*, 2019), *Brevibacillus brevis* (Nehra *et al.*, 2016), *Erwinia tasmanensis* (Clavijo *et al.*, 2012), *Leclercia adecarboxylata* (Kang *et al.*, 2019), *Pseudomonas hunanensis* (Dutta y Thakur, 2017) y *Pseudomonas putida* (Patten y Glick, 2002); y para reducir los niveles de etileno en las plantas, el cual interfiere con el crecimiento de las mismas bajo condiciones de estrés, como *Acinetobacter* sp. (Indiragandhi *et al.*, 2008), *Bacillus halotolerans* (Sgroy *et al.*, 2009), *Enterobacter kobei* (Pramanik *et al.*, 2018), *Leclercia adecarboxylata* (Kang *et al.*, 2019), *Pseudomonas hunanensis* (Maroniche *et al.*, 2016) y *Pseudomonas putida* (Jacobson *et al.*, 1994). Algunas de las capacidades de promoción de crecimiento, o de biocontrol de microorganismos fitopatógenos, de las bacterias referidas han sido documentadas desde hace tiempo, como en el caso de *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas putida*, y otras, cuyas competencias de promoción de crecimiento han sido descubiertas más recientemente, como el caso del género *Leclercia* y las especies *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Pseudomonas hunanensis* y *Enterobacter kobei*. El primer informe de *Leclercia* sp. como PGPR se publicó en 2014 (Naveed et

al., 2014), mientras que *Curtobacterium flaccumfaciens* es una bacteria de hábito endófito cuyo papel en la agricultura resulta paradójico, ya que es un patógeno bien conocido en diferentes especies de plantas como frijol, soya, remolacha, nochebuena y tulipán, pero recientemente se le descubrieron capacidades de promoción de crecimiento en cebada (Cardinale *et al.*, 2015). Por otro lado, destaca la presencia de la bacteria *Erwinia tasmaniensis* en el tipo de agave Ayoteco, la cual ha sido referida como una bacteria epífita con potencial para el control de *Erwinia amylovora* en cultivos de manzana y pera (Polsinelli *et al.*, 2019).

Aunque previamente Ramírez-Bahena *et al.* (2016) lograron aislar una bacteria endófita de papa a la que denominaron *Erwinia endophytica* por su hábito de colonización de las plantas, hasta donde se conoce, este es el primer reporte de *Erwinia tasmaniensis* como microorganismo endófito. *Bacillus tequilensis* es una especie muy relacionada con *B. subtilis* que fue descrita primera vez por Gatson *et al.* (2006), y que al igual que *Curtobacterium flaccumfaciens*, aparentemente puede ser transmitida por semilla (Beltrán-García *et al.*, 2014). Su hábito endófito y capacidad para controlar la enfermedad conocida como piricularia del arroz y del trigo, provocada por *Magnaporthe oryzae*, fueron descritos originalmente por Li *et al.* (2018), quienes lograron aislar esta bacteria a partir de la planta *Angelica dahurica*. Las actividades de promoción de crecimiento mencionadas son potenciales, por lo que será importante confirmar mediante las pruebas pertinentes la existencia real de las rutas bioquímicas involucradas en su biosíntesis, y posteriormente, llevar a cabo las pruebas de funcionalidad *in planta*, ya que la presencia de las capacidades bioquímicas *in vitro* no siempre correlaciona con un aumento en el crecimiento de las plantas (Cardinale *et al.*, 2015). Las evaluaciones de campo serán siempre indispensables para establecer de manera contundente la factibilidad de uso de las cepas microbianas, por lo que las capacidades bioquímicas *in vitro* de las cepas microbianas aisladas están en proceso de análisis, así como también su potencial agronómico en campo. Estudios como el presente constituyen el primer paso para la apropiación y establecimiento de tecnologías de manejo microbiológico acordes con las necesidades particulares de cada explotación agrícola local (Compan *et al.*, 2019). El análisis de los microbiomas existentes en las plantas es importante no solo para la generación de información sobre aspectos agronómicos aplicados, sino también en el estudio de la participación de los microorganismos en la coevolución de las plantas y que han llevado a diferentes investigadores al planteamiento de la existencia de microbiomas núcleo y satélites de microorganismos, los cuales han sido determinantes en la aptitud y sobrevivencia de las plantas a través de tiempos evolutivos (Compan *et al.*, 2019).

Cuadro 2. Frecuencia de bacterias endófitas en cinco tipos de agave pulquero.

Especie	Orden	Frecuencia					Total
		Ayo	Car	Cha	Man	PL	
<i>Aeromonas caviae</i>	Aeromonadales		1				1
<i>Acinetobacter</i> sp.	Actinomycetales			1			1
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillales	2	2			3	7
<i>B. mojavensis</i>	Bacillales	2					2
<i>B. tequilensis</i>	Bacillales			1			1
<i>B. halotolerans</i>	Bacillales		1			1	2
<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Actinomycetales	1					1
<i>Brevibacterium</i> sp.	Actinomycetales		1				1
<i>Brevibacillus brevis</i>	Bacillales		1				1
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinomycetales			1			1
<i>Enterobacter cloacae</i>	Enterobacteriales		1		1		2
<i>Enterobacter ludwigii</i>	Enterobacteriales		1				1
<i>Enterobacter kobei</i>	Enterobacteriales				1		1
<i>Enterobacter</i> sp.	Enterobacteriales	1				2	3
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Enterobacteriales	1					1
<i>Leclercia</i> sp.	Enterobacteriales		2	1	2		5
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Enterobacteriales		1	1			2
<i>Pseudomonas hunanensis</i>	Pseudomonadales					1	1
<i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonadales				1		1
Total		7	11	3	5	9	35

Ayo: Ayoteco, Car: Carricillo, Cha: Chalqueño, Man: Manso, PL: Púa Larga.

CONCLUSIONES

El análisis de la endomicrobiota de cinco tipos de agave pulquero demostró que el número de aislamiento obtenidos corresponde a 7, 11, 3, 5 y 9 a partir de Ayoteco, Carricillo, Chalqueño, Manso y Púa Larga, respectivamente. La endomicrobiota bacteriana de Carricillo fue la más diversificada (nueve especies), mientras que Chalqueño presentó una menor riqueza bacteriana (tres especies); Ayoteco, Manso y Púa Larga presentaron cinco especies bacterianas únicas. Los géneros con una mayor representación en los cinco tipos de agave fueron *Bacillus* spp. con 12 entradas y *Enterobacter* spp. y *Leclercia* spp. con siete entradas cada uno. *Bacillus subtilis* y *Leclercia* sp. fueron las especies mayormente representadas en los agaves al encontrarse en tres de los cinco tipos analizados. Con base en el conocimiento más reciente, este es el primer estudio realizado en variedades de agave pulquero para

conocer el microbiota endófito existente en este cultivo.

AGRADECIMIENTOS

El Dr. Aguado Santacruz y colaboradores agradecen al CONACyT por la beca otorgada para la realización de la estancia postdoctoral 2018-000008-01NACV-00062, la cual posibilitó la publicación del presente artículo. Al corporativo magueyero San Isidro S.A. de C. V., por habernos permitido acceder a su predio y donar pencas de magueyes que fueron utilizados para llevar al cabo esta investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Santacruz G. A. (2012) Uso de microorganismos como biofertilizantes. In: Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura. G. A. Aguado-Santacruz (ed.). INIFAP/SAGARPA. México, D. F. pp:35-78.
- Beltrán-García M. J., J. F. White, F. M. Prado, K. R. Prieto, L. F. Yamaguchi, M. S. Torres, ... and P. Di Mascio (2014) Nitrogen acquisition in Agave

- tequilana from degradation of endophytic bacteria. *Scientific Reports* 4:6938, <https://doi.org/10.1038/srep06938>
- Cardinale M., S. Ratering, C. Suarez, A. M. Zapata M., R. Geissler-Plaum and S. Schnell (2015) Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Microbiological Research* 181:22-32, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.08.002>
- Caulier S., C. Nannan, A. Gillis, F. Licciardi, C. Bragard and J. Mahillon (2019) Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology* 10:302, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Cazorla F. M., D. Romero, A. Pérez-García, B. J. J. Lugtenberg, A. de Vicente and G. Bloemberg (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103:1950-1959, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x>
- Clavijo C., V. Chipana, J. Centeno, D. Zúñiga y C. Guillén (2012) Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europaea* "Olivo" en Tacna Perú. *Ecología Aplicada* 11:89-102, <https://doi.org/10.21704/rea.v1i1-2.429>
- Coleman-Derr D., D. Desgarennes, C. Fonseca-García, S. Gross, S. Clingenpeel, T. Woyke, ... and S. G. Tringe (2016) Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* 209:798-811, <https://doi.org/10.1111/nph.13697>
- Colunga-GarcíaMarín P. y D. Zizumbo-Villarreal (2007) El tequila y otros mezcales del centro-occidente de México: domesticación, diversidad y conservación de germoplasma. In: En lo Ancestral Hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y Otros Agaves. P. Colunga-GarcíaMarín, A. Larqué S., L. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal (eds.). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México. pp:113-131, <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1266.1281>
- Compart S., A. Samad, H. Faist and A. Sessitsch (2019) A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research* 19:29-37, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2006) Mezcales y diversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Ciudad de México. http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadata/gis/mmezcales_gw.xml?_xsl=/db/metadata/xsl/fgdc_html.xsl&indent=no (Marzo 2021).
- Desgarennes D., E. Garrido, M. J. Torres-Gómez, J. J. Peña-Cabriales and L. P. Partida-Martínez (2014) Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiology Ecology* 90:844-857, <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12438>
- Dutta J. and D. Thakur (2017) Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS ONE* 12:e0182302, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302>
- Fan Z. Y., C. P. Miao, X. G. Qiao, Y. K. Zheng, H. H. Chen and Y. W. Chen, ...and H. L. Guan (2016) Diversity, distribution, and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research* 40:97-104, <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.05.003>
- Ferrera C. R., M. C. A. González C. y M. N. Rodríguez M. (1993) Manual de Agromicrobiología. Trillas. México D. F. 142 p.
- García M. A. J. (2007) Los agaves de México. *Ciencias* 87:14-23.
- Gatson J. W., M. Satomi, B. F. Benz, C. Chandrasekaran, M. Satomi, K. Venkateswaran and M. E. Hart (2006) *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1475-1484, <https://doi.org/10.1099/ijss.0.63946-0>
- Hassan M. N., S. Afghan and F. Y. Hafeez (2011) Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. *Pest Management Science* 67:1147-1154, <https://doi.org/10.1002/ps.2165>
- Indiragandhi P., R. Anandham, M. Madhaiyan and T. M. Sa (2008) Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* 56:327-333, <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4>
- Jacobson C. B., J. J. Pasternak and B. R. Glick (1994) Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology* 40:1019-1025, <https://doi.org/10.1139/m94-162>
- Johnsen K. and P. Nielsen (1999) Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterisation. *FEMS Microbiology Letters* 173:155-162, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13497.x>
- Kang S. M., R. Shahzad, S. Bilal, A. L. Khan, Y. G. Park, K. E. Lee, ... and I. J. Lee (2019) Indole-3-acetic-acid and ACC deaminase producing *Leclercia adecarboxylata* MO1 improves *Solanum lycopersicum* L. growth and salinity stress tolerance by endogenous secondary metabolites regulation. *BMC Microbiology* 19:80, <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6>
- Kuan K. B., R. Othman, K. A. Rahim and Z. H. Shamsuddin (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE* 11:e0152478, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>
- Laili N. S., O. Radziah and S. S. Zaharah (2017) Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Bangladesh Journal of Botany* 46:277-282.
- Li H., Y. Guan, Y. Dong, L. Zhao, S. Rong, W. Chen, ... and Z. Xu (2018) Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS ONE* 13:e0203505, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203505>
- Li Y. H., Q. F. Liu, Y. Liu, J. N. Zhu and Q. Zhang (2010) Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *Research in Microbiology* 162:124-131, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.021>
- Lin L., Z. Li, C. Hu, X. Zhang, S. Chang, L. Yang, ... and Q. An (2012) Plant growth-promoting nitrogen-fixing Enterobacter are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes and Environments* 27:391-398, <https://doi.org/10.1264/jsme2.me11275>
- Lopes M. A., K. Takasaki, D. E. Bostwick, T. Helentjaris and B. A. Larkins (1995) Identification of two *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics* 247:603-613, <https://doi.org/10.1007/BF00290352>
- López M. G. and J. E. Urías-Silvas (2007) Agave fructans as prebiotics. In: Recent Advances in Fructooligosaccharides Research. S. Norio, B. N. and O. Suichi (eds.). Research Signpost Publisher. Kerala, India. pp:1-12.
- Maroniche G. A., E. J. Rubio, A. Consiglio and A. Perticari (2016) Plant-associated fluorescent *Pseudomonas* from red lateritic soil: beneficial characteristics and their impact on lettuce growth. *The Journal of General and Applied Microbiology* 62:248-257, <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.04.006>
- Martínez-Rodríguez J. C., M. De la Mora-Amutio, L. A. Plascencia-Correa, E. Audelo-Regalado, F. R. Guardado, E. Hernández-Sánchez, ... and T. Ogura (2014) Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology* 45:1333-1339, <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400025>
- Naveed M., I. Ahmed, N. Khalid and A. S. Mumtaz (2014) Bioinformatics based structural characterization of glucose dehydrogenase (*gdh*) gene and growth promoting activity of *Leclercia* sp. QAU-66. *Brazilian Journal of Microbiology* 45:603-611, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200031>
- Nehra V., B. S. Saharan and M. Choudhary (2016) Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *SpringerPlus* 5:948, <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2080-2>

- doi.org/10.1186/s40064-016-2584-8
- Ohnishi A. S., Abe, S. Nashirozawa, S. Shimada, N. Fujimoto and M. Suzuki (2011) Development of a 16s rRNA gene primer and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism method for rapid detection of members of the genus *Megasphaera* and species-level identification. *Applied and Environmental Microbiology* 77:5533-5535, <https://doi.org/10.1128/AEM.00359-11>
- Patten C. L. and B. R. Glick (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3795-3801, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Polsinelli I., R. Caliandro, M. Salomone-Stagni, N. Demitri, M. Rejzek, R. A. Field and S. Benini (2019) Comparison of the levansucrase from the epiphyte *Erwinia tasmaniensis* vs its homologue from the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *International Journal of Biology Macromolecular* 127:496-501, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.074>
- Pramanik K., S. Mitra, A. Sarkar, T. Soren and T. K. Maiti (2018) Characterization of a Cd²⁺ -resistant plant growth promoting rhizobacterium (*Enterobacter* sp.) and its effects on rice seedling growth promotion under Cd²⁺ -stress *in vitro*. *Agriculture and Natural Resources* 52:215-221, <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.007>
- Ramírez-Bahena M. H., S. Salazar, M. J. Cuesta, C. Tejedor, J. M. Igual, M. Fernández-Pascual and Á. Peix (2016) *Erwinia* endophytica sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:975-981, <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000820>
- Rokhbakhsh-Zamin F., D. Sachdev, N. Kazemi-Pour, A. Engineer, K. R. Pardesi, S. Zinjarde, ... and B. A. Chopade (2011) Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:556-566, <https://doi.org/10.1099/jjm.0.63946-010.4014/jmb.1012.12006>
- Ryu C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wie, P. W. Paré, ... and J. W. Kloepper (2003) Bacterial volatiles promote growth of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4927-4932, <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>
- Sgroy V., F. Cassán, O. Masciarelli, M. F. Del Papa, A. Lagares and V. Luna (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:371-381, <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2116-3>
- Shoebitz M., C. M. Ribaudo, M. A. Pardo, M. L. Cantore, L. Ciampi and J. A. Curá (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41:1768-1774, <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031>
- Slama H. B., H. Cherif-Silini, A. C. Bouket, M. Qader, A. Silini, B. Yahiaoui, ... and L. Belbahri (2019) Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology* 9:3236, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Taulé C., C. Mareque, C. Barlocco, F. Hackembruch, V. M. Reis, M. Sicardi and F. Battistoni (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant and Soil* 356:35-49, <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>
- Wagi S. and A. Ahmed (2019) *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ* 7:e7258, <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>
- Yaish M. W., I. Antony and B. R. Glick (2015) Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* 107:1519-1532, <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0445-z>