



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA**

**EL MICROBIOMA DE LOS AGAVES:  
LA COMPOSICIÓN Y EL POTENCIAL FUNCIONAL  
DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

Tesis presentada por:

**M.C. DAMARIS DEL CARMEN DESGARENNES VALIDO**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias con especialidad en  
Biotecnología de Plantas

Directora de Tesis:

**DRA. LAILA PAMELA PARTIDA MARTÍNEZ**

Irapuato, Guanajuato

Abril, 2016

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN - Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética, Laboratorio de Interacciones Microbianas bajo la dirección de la Dra. Laila Pamela Partida Martínez gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los Proyectos CB-2010-01-151007, INFR-2012-01-187799 y la beca 201926, además del convenio con el US Department of Energy Joint Genome Institute a través del JGI Community Science Program bajo el número de contrato DE-AC02-05CH11231, un donativo de Casa Herradura-Brown Forman y el apoyo en especie de Tequila Real de Pénjamo.

Este trabajo fue realizado del 01 de Septiembre de 2011 al 30 de noviembre de 2015.

Miembros del Comité de Asesores:

Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson

Dr. Luis José Delaye Arredondo

Dr. Cei Leander Gastón Abreu Goodger

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Fecha de examen de grado: 08 de Abril de 2016

Para mis padres y mi hermano,  
por todo su amor, por estar  
siempre para mí.

*Cuando no podemos cambiar la situación, estamos desafiados a cambiarnos a nosotros mismos.*

*V.E. Frankl*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (Beca No. 201926).

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato, por la infraestructura proporcionada para la realización de mi proyecto doctoral.

A la Dra. Laila P. Partida Martínez por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y desarrollar este proyecto bajo su dirección, por su valiosa asesoría y guía durante la realización de mi doctorado. Más allá de la formación académica, le agradezco enormemente haberme formado profesional y personalmente. Gracias por su disposición, interés, motivación y confianza.

A los miembros de mi comité: Dra. June K. Simpson Williamson, Dr. Luis J. Delayo Arredondo, Dr. Cei Abreu Goodger y Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, por su objetividad y las valiosas aportaciones hechas a lo largo del proyecto doctoral y en la revisión de la tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Interacciones Microbianas (LIM) por su apoyo, en especial a la I.Q. Nélide Vázquez, auxiliar del LIM, por toda la ayuda proporcionada para la realización de este proyecto y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Etzel Garrido por su ayuda y su enseñanza para la realización de los análisis estadísticos y sus aportaciones al proyecto.

Al Dr. José Luis Hernández por su instrucción en la implementación de la electroforesis con gradiente desnaturizante.

A la M.C. Citlali Fonseca García por iniciarme en la biología molecular, por su apoyo y principalmente por la amistad que hemos compartido durante estos años.

A la M.C. Alma Rosa Hernández Razo y al Tec. Gerardo Daniel Valladolid por su apoyo en el área de invernaderos.

A la Ing. Rosa Adame, auxiliar del Laboratorio de Ecología de Plantas, y a la M.C. Katia Gil, auxiliar del Laboratorio de Marcadores Moleculares y Genética Molecular, por la ayuda que me brindaron para poder llevar a cabo mis experimentos.

A Dora E. Anguiano por su disponibilidad y amabilidad al ayudarme con todos los trámites que fueron necesarios durante mi estancia en CINVESTAV, pero principalmente por el apoyo y cariño que siempre nos tiene a los estudiantes.

A mis amigos Paco, Crysta y Chío por su apoyo incondicional, por las risas, por la complicidad. Gracias por hacer del día a día toda una experiencia.

# Contenido

Abstract.....	5
Resumen.....	7
1 Introducción.....	9
2 Antecedentes .....	12
2.1 Origen y distribución del género <i>Agave</i> .....	13
2.2 El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en los agaves.....	13
2.3 La importancia del género <i>Agave</i> .....	15
2.4 La microbiota de las plantas .....	16
2.5 El ensamble de las comunidades microbianas.....	17
2.6 Los agaves y sus microorganismos .....	18
3 Hipótesis .....	20
4 Objetivos .....	20
5 Estrategia Experimental .....	21
5.1 Sistema de estudio .....	21
5.2 Sitios de muestreo .....	21
5.3 Procesamiento de las muestras y extracción de ADN.....	26
5.4 Análisis molecular de las comunidades microbianas.....	27
5.4.1 PCR-DGGE de las comunidades bacterianas .....	28
5.4.2 Secuenciación etiquetada de las comunidades microbianas .....	34
5.5 Análisis metagenómico de las comunidades epífitas asociadas con <i>A. tequilana</i> y <i>A. salmiana</i> .....	37
5.5.1 Construcción de bibliotecas.....	38
5.5.2 Anotación de metagenomas .....	40
5.5.3 Análisis preliminar de metagenomas disponibles .....	41
5.6 Detección del potencial diazotrófico en comunidades procariontes asociadas con <i>A. tequilana</i> y <i>A. salmiana</i> .....	41
5.7 Caracterización de tolerancia a sequía y promoción del crecimiento vegetal en bacterias aisladas de <i>Agave</i> .....	42
5.7.1 Tolerancia a sequía.....	43
5.7.2 Características de promoción del crecimiento vegetal.....	45
5.8 Inoculación de cepas promotoras del crecimiento vegetal en plantas de <i>A. tequilana</i> .....	48
5.8.1 Establecimiento de los tratamientos .....	48
5.8.2 Colecta y proceso de las muestras.....	49
5.8.3 Análisis de huella metabólica .....	49

6. Resultados y Discusión .....	54
6.1 Capítulo 1: Composición y diversidad de las comunidades microbianas asociadas con <i>Agave</i> .....	54
6.1.1 Composición de las comunidades microbianas asociadas con agaves silvestres y cultivados .....	55
6.1.2 La diversidad microbiana es diferente entre los compartimentos de la planta y entre agaves silvestres y cultivados .....	67
6.1.3 Discusión.....	70
6.2 Capítulo 2: Factores que afectan la estructura de las comunidades asociadas con <i>Agave</i> .....	75
6.2.1 El tipo de muestra y la biogeografía de la especie influyen en la composición de las comunidades microbianas en agaves silvestres y cultivados .....	76
6.2.2 Microorganismos clave asociados con agaves silvestres y cultivados.....	86
6.2.3 El microbioma endófito central de agaves en la sequía .....	95
6.2.4 Discusión.....	100
6.3 Capítulo 3: Potencial funcional en las comunidades microbianas asociadas con <i>Agave</i> .....	108
6.3.1 Potencial diazotrófico entre las comunidades microbianas asociadas con <i>A. tequilana</i> y <i>A. salmiana</i> .....	109
6.3.2 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados con <i>A. tequilana</i> y <i>A. salmiana</i> .....	113
6.3.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal aislados de <i>Agave</i> y su efecto sobre <i>A. tequilana</i> .....	117
6.3.4 Discusión.....	121
7 Conclusiones.....	125
8 Perspectivas.....	127
9 Referencias .....	129
Apéndice A.....	150
Apéndice B.....	152
Apéndice C.....	153
Apéndice D.....	154
Apéndice E.....	157
Apéndice F .....	164

## Abstract

Arid and semi-arid regions represent one third of the terrestrial surface. These regions characterized by long drought periods and low nutrient content soils, are the center of origin of *Agave* in the American Continent. *Agave* species are used to produce tequila, mezcal and fibers. Moreover, agaves are nowadays being considered potential biofuel stocks. Due to their relevance, we investigated which microorganisms are associated with these plants, which factors influence microorganisms' assemblages and the functional potential in *Agave* microbiota. We investigated the bacterial and fungal communities associated with six different compartments of the cultivated species *A. tequilana*, and the wild species *Agave salmiana* and *A. deserti* during dry and rainy seasons in 2012. We used DGGE-fingerprinting of the v6-v8 16S rDNA gene as a first approach for the identification of the bacterial communities. Later, we performed v4 16S and ITS2 rDNA iTag sequencing to obtain a deeper understanding of both, bacterial and fungal community assembly. In parallel, we isolated and characterized native microorganisms to determine their plant growth promotion potential (PGPP) and drought tolerance. We found that bacterial communities were dominated by Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes, while in fungal communities Ascomycota and Basidiomycota were the most abundant groups. Our results showed that bacterial communities are shaped by the plant compartment. In contrast, fungal communities are mainly influenced by the biogeography of the host species. Interestingly, we observed a reduction in microbial diversity in the cultivated *A. tequilana* compared with native agaves, especially in the bacterial communities of the rhizosphere and phyllosphere. Using the Pareto concept, we identified a number of shared major microbial players

across the three *Agave* species, and detected a group of endophytic bacterial taxa, which increase in abundance during the dry season. Remarkably, isolated and characterized PGP bacteria such as *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* and *Bacillus* belong to these groups. Altogether, our results provide a framework to deepen our understanding of the plant-microbe interactions in semiarid regions.

## Resumen

Las regiones áridas y semiáridas representan un tercio de la superficie terrestre. Estas regiones, caracterizadas por presentar largos períodos de sequía y suelos con bajo contenido de nutrientes, son el centro de origen del género *Agave*. Los agaves son usados principalmente para la producción de tequila, mezcal y fibras. Actualmente, estas plantas están siendo consideradas como una fuente potencial de biocombustibles. Debido a esto, analizamos la microbiota asociada con estas plantas, los factores que influyen en la composición de dicha microbiota y potencial funcional dentro de los microorganismos asociados con los agaves. Se analizaron las comunidades bacterianas y fúngicas asociadas con seis compartimentos diferentes de tres plantas sanas de la especie cultivada *A. tequilana* y de las especies silvestres *A. salmiana* y *A. deserti* durante dos estaciones en el año 2012. Como primer acercamiento para el análisis de las comunidades bacterianas utilizamos un análisis de huella genética con DGGE de la región v6-v8 del gen 16S rDNA. Posteriormente, se realizó la secuenciación etiquetada de la región v4 del gen 16S y el ITS2 rDNA para lograr un análisis más profundo tanto de las comunidades bacterianas como de las fúngicas. Paralelamente, se aislaron y caracterizaron algunos microorganismos silvestres para determinar su potencial de promoción del crecimiento vegetal (PPCV). Encontramos que las comunidades bacterianas estuvieron dominadas por Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes, mientras que en las comunidades fúngicas los grupos más abundantes fueron Ascomycota y Basidiomycota. Nuestros resultados mostraron que las comunidades bacterianas son determinadas por el compartimento de la planta, en contraste las comunidades fúngicas

están mayormente influenciadas por la biogeografía de la especie hospedera. De forma interesante, observamos que las comunidades asociadas con *A. tequilana*, la especie cultivada, fueron menos diversas en comparación con los agaves silvestres. Haciendo uso del concepto de Pareto, identificamos un número de microorganismos clave compartido entre las tres especies de *Agave* y detectamos un grupo de bacterias endófitas que incrementan su abundancia en la época de secas. Notablemente, se aislaron y caracterizaron bacterias PCV como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus*, pertenecientes a estos grupos. En conjunto, nuestros resultados proporcionan un marco para profundizar el entendimiento de las interacciones planta-microorganismo en las regiones semiáridas.

# 1 Introducción

Aproximadamente un tercio de la superficie terrestre se clasifica en zonas áridas o semiáridas (Withford, 2002; Ezcurra *et al.*, 2006; Cline, 2008). Estas regiones se caracterizan por largos períodos de sequía, bajos niveles de humedad y suelos con bajo contenido de nutrientes (Noy-Meir, 1973; Withford, 2002; Ezcurra *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2008). A pesar de estas limitaciones, las zonas áridas y semiáridas son centro de origen de plantas como las cactáceas y los agaves.

Los agaves son nativos de regiones áridas y semiáridas de América. Están distribuidos desde el sur de Estados Unidos hasta la parte norte de Sudamérica, siendo México su centro de origen y diversidad (García-Mendoza, 2002; Good-Avila *et al.*, 2006; García-Mendoza, 2007; García-Moya *et al.*, 2011). En conjunto con los cactus y otras xerófitas, los agaves representan recursos bióticos importantes en las zonas áridas y semiáridas (Nobel, 2010; García-Moya *et al.*, 2011). El género *Agave* está constituido por más de 200 especies y durante siglos han sido utilizados para la producción de tequila, mezcal y fibras (Gentry, 1982; Nobel, 2010).

Actualmente los agaves están siendo considerados como una posible fuente de biocombustible, ya que son plantas con reservas de carbohidratos y lignocelulosa, capaces de producir considerables cantidades de biomasa en condiciones ambientales no óptimas para otros cultivos (García-Moya *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014). Del mismo modo que otras suculentas de regiones áridas y semiáridas, los agaves han desarrollado modificaciones fisiológicas y morfológicas para lidiar con la sequía extrema y las altas temperaturas, adaptaciones que les permiten minimizar la pérdida de agua (Nobel, 2003, 2010; García-Moya *et al.*, 2011). Una de estas

adaptaciones es el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), que permite la fijación de dióxido de carbono durante la noche, evitando la pérdida de agua durante el día (Nobel, 2003).

Las plantas son capaces de formar diferentes asociaciones con los microorganismos. De hecho se ha propuesto que las plantas deben ser consideradas como un *holobionte*, es decir la suma de la planta y de su microbiota, más que como entidades únicas (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Vandenkoorhuysen *et al.*, 2015). La microbiota de la planta tiene un impacto significativo en la salud de la misma y su adaptación al estrés (Partida-Martínez & Heil, 2011; Mendes *et al.*, 2013; Panke-Buisse *et al.*, 2015).

En estudios recientes se ha demostrado que algunos microorganismos promotores de crecimiento vegetal asociados con plantas de zonas semiáridas son capaces de incrementar el crecimiento de la planta y la tolerancia al estrés (Marasco *et al.*, 2012; Rolli *et al.*, 2015). Estudios previos realizados en diferentes especies de *Agave* han demostrado que la colonización de estas plantas por hongos micorrízicos puede mejorar su capacidad de obtención de agua y nutrientes (Cui & Nobel, 1992; Camargo-Ricalde *et al.*, 2003; Pimienta-Barrios *et al.*, 2009). Análogamente en las asociaciones de estas plantas con hongos endófitos o bacterias diazótrofes, se registra un incremento en la actividad fotosintética, el contenido de azúcares y el crecimiento (Obledo *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2011). Estos estudios sugieren que el microbioma de *Agave* tiene un papel importante en la adecuación y productividad de las plantas del género.

Las comunidades microbianas asociadas con las plantas han sido objeto de estudio en diferentes trabajos. Estos reportes han demostrado que factores como el

compartimento de la planta, la especie hospedera y la localización geográfica son capaces de moldear la composición de dichas comunidades. No obstante la magnitud con la que dichos factores afectan a las comunidades microbianas asociadas con las plantas, varía entre los diferentes estudios (DeAngelis *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2012; Lançoni *et al.*, 2013; Peiffer *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2015; Zorraonaindia *et al.*, 2015). La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se enfocan principalmente en las comunidades procariontes. Los relativamente pocos reportes recientes sobre comunidades fúngicas asociadas con plantas, aunque proveen indicios de los factores que influyen la composición de las mismas, están restringidos a ciertos compartimentos de la planta como la rizósfera (Hilton *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2013).

En este trabajo se propone caracterizar las comunidades microbianas (hongos y bacterias) asociadas con diferentes compartimentos de las plantas de *Agave*, determinar la contribución de los factores bióticos y abióticos en la composición de las comunidades, así como la detección de microorganismos que sean relevantes en términos de abundancia y la determinación de su potencial funcional, los cuales son aspectos que nos ayudarán a entender las interacciones planta-microorganismo en las regiones áridas.

## 2 Antecedentes

Las zonas áridas y semiáridas representan cerca de un tercio de la superficie terrestre del planeta (Withford, 2002; Ezcurra *et al.*, 2006) y son particularmente sensibles al cambio climático debido a la alteración en los patrones de precipitación y los ciclos de nutrientes como el nitrógeno (Cline, 2008; Collins *et al.*, 2008). Las características ambientales preponderantes en las zonas áridas son largos períodos de sequía que tienen como consecuencia una precipitación errática y limitada, suelos con pH ácido (limitando la asimilación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo) y de texturas arenosas (originando la percolación del agua) que no retienen humedad suficiente (Noy-Meir, 1973; Withford, 2002; Collins *et al.*, 2008). Debido a esto, las regiones áridas y semiáridas se perciben como ambientes extremos, estériles e inhóspitos que sólo son capaces de dar cabida a la flora y fauna más rudimentaria (Withford, 2002; Ezcurra *et al.*, 2006). Sin embargo, contrariamente a esta percepción, las zonas áridas y semiáridas son una fuente importante de diversidad biológica (Ezcurra *et al.*, 2006), siendo incluso centro de origen de distintas xerófitas, además de plantas como los cactus y agaves (Nobel, 2003; Nobel, 2010). En conjunto con los cactus, los agaves representan recursos bióticos ecológica y económicamente importantes en las zonas áridas y semiáridas, a lo largo de las cuales se encuentran ampliamente distribuidos (Nobel, 2010; García-Moya *et al.*, 2011).

## **2.1 Origen y distribución del género *Agave***

El género *Agave* surgió aproximadamente hace 8-10 millones de años, teniendo un pico de especiación que coincide con el incremento de las condiciones áridas en las zonas centrales de México (Good-Avila *et al.*, 2006; García-Moya *et al.*, 2011). De hecho, los agaves son especies clave en las zonas áridas y semiáridas, teniendo a México como centro de origen, no obstante se encuentran ampliamente distribuidos (Good-Avila *et al.*, 2006; García-Moya *et al.*, 2011).

Las poblaciones naturales de este género se han dispersado desde el sur de Estados Unidos, a través de América Central y el Caribe, hasta el norte de Sudamérica (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2002, 2007; Good-Avila *et al.*, 2006; García-Moya *et al.*, 2011). *Agave* es un género que cuenta con más de 200 especies, cuya mayor riqueza es encontrada en México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala (García-Mendoza, 2002, 2007). De hecho, en México se encuentran 150 de las especies existentes, además de 36 categorías específicas, y casi el 70% de ellas son endémicas (García-Mendoza, 2002, 2007). Estas especies se encuentran distribuidas principalmente en la zona central de nuestro país, el desierto de Chihuahua y la región de Bajío (Gentry, 1982), siendo el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (región centro-sur de México) donde se registra la mayor riqueza de especies (García-Mendoza, 2002).

## **2.2 El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) en los agaves**

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) es una de las tres rutas metabólicas que se pueden encontrar en los tejidos fotosintéticos para la asimilación del dióxido de carbono atmosférico (Winter & Smith, 1996; Lüttge, 2004) y es considerado como una modificación ecofisiológica de la adquisición del carbono utilizado para la fotosíntesis

(Lüttge, 2004). En contraste con las plantas C3 y C4, las plantas CAM obtienen el dióxido de carbono de la atmósfera predominantemente durante la noche a través de la apertura de los estomas, este dióxido de carbono es fijado por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa y almacenado en forma de ácidos orgánicos en las vacuolas. Posteriormente, durante el día y con los estomas cerrados, los ácidos orgánicos son removidos de las vacuolas, decarboxilados y asimilados en el ciclo de Calvin (Winter & Smith, 1996; Lüttge, 2004). El metabolismo CAM ha sido detectado en más de 40 familias, no necesariamente relacionadas, de las 500 familias de plantas vasculares existentes (Nobel, 2010).

Al ser plantas adaptadas a condiciones de zonas áridas y semiáridas, los agaves presentan modificaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten adaptarse a la sequía extrema y las altas temperaturas, una de estas modificaciones es el uso del metabolismo CAM (Nobel, 2003, 2010; García-Moya *et al.*, 2011). De hecho, las más de 200 especies de hojas suculentas que conforman el género *Agave* presentan dicho metabolismo (Nobel, 2010). Las plantas con metabolismo CAM presentan una mayor eficiencia del uso del agua, es decir la cantidad de dióxido de carbono fijado con respecto a la pérdida de agua por evapotranspiración (Winter & Smith, 1996). En los agaves la eficiencia en el uso del agua es mayor (10-40 g de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O) en comparación con las plantas C3 (1-3 g de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O) y C4 (2-5 g de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>H<sub>2</sub>O) (Nobel, 2010).

### 2.3 La importancia del género *Agave*

Los agaves han sido usados por los humanos desde tiempos prehistóricos. Existe evidencia arqueológica de artefactos hechos de fibra de agaves y herramientas fabricadas con la espina apical, que fueron utilizados al menos hace 9000 años (Gentry, 1982; Nobel, 2003). No obstante, el cultivo de estas plantas no se extendió hasta finales del siglo XV y principios del siglo XVI, como consecuencia de la llegada de los españoles quienes provocaron la movilización de los pueblos indígenas y por consiguiente de sus cultivos (Gentry, 1982; Nobel, 2003).

Los usos de los agaves en México son variados (Nava-Cruz *et al.*, 2014), pero son comúnmente usados para la producción de bebidas fermentadas como el pulque o destiladas como el bacanora producido a partir de *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. pacífica*, el mezcal producido principalmente a partir de *A. salmiana*, *A. angustifolia* y *A. potatorum* y el tequila obtenido de *A. tequilana* (Nobel, 2003; Nava-Cruz *et al.*, 2014). En el caso de tequila, su industria representa un mercado (nacional e internacional) de dos mil millones de dólares, con una producción anual de más de 250 millones de litros de tequila, de los cuales más del 50% es exportado a Estados Unidos, Europa y otros países (CRT, 2014). En nuestro país se cultivan cada año más de 140,000 hectáreas con *A. tequilana* en las zonas con Denominación de Origen Tequila, que incluye todos los municipios del estado de Jalisco y 44 más en los estados de Guanajuato, Nayarit, Tamaulipas y Michoacán (Bautista-Justo *et al.*, 2001; CRT, 2014). Adicionalmente al uso de los agaves para la producción de bebidas alcohólicas, estas plantas se utilizan también para la producción de fibras, obtenidas principalmente de plantaciones de *A. fourcroydes* (henequén) en Yucatán y secundariamente de *A. lechuguilla* (Nobel, 2003).

A nivel internacional, los agaves recientemente han comenzado a considerarse como materia prima para la producción de biocombustibles (Davis *et al.*, 2011; Holtum *et al.*, 2011; Valenzuela, 2011), ya que las plantas CAM tienen niveles de producción anual comparables con las plantas C3 y C4, pero con requerimientos menores que estas últimas (García-Moya *et al.*, 2011). Los agaves son recursos ancestrales, que al estar adaptados a condiciones ambientales extremas, representan una alternativa de uso intensivo que permitirá hacer frente a los retos que acompañan al cambio climático (García-Moya *et al.*, 2011).

## **2.4 La microbiota de las plantas**

Las plantas albergan una gran cantidad de microorganismos tanto en sus compartimentos internos como externos (Partida-Martínez & Heil, 2011). Las asociaciones entre las plantas y microorganismos son antiguas, como las simbiosis con las micorrizas (más de 400 millones de años), las cuales se cree tuvieron un papel crucial en el proceso de terrestrialización de las plantas (Humphreys *et al.*, 2010; Vandenkoorhuyse *et al.*, 2015).

En los últimos años, el estudio de las asociaciones planta-microorganismos ha progresado significativamente y diversos estudios han demostrado la importancia que tienen los microorganismos (principalmente bacterias y hongos) en aspectos como la nutrición, la resistencia a estrés biótico, la defensa contra patógenos, la tasa de crecimiento, la distribución y la sobrevivencia de las plantas (Partida-Martínez & Heil, 2011; Bulgarelli *et al.*, 2013; Gaeiro *et al.*, 2013; Berg *et al.*, 2014; Haney *et al.*, 2015; Vandenkoorhuyse *et al.*, 2015). De modo que, la adecuación de las plantas es consecuencia no sólo de la planta en sí, sino también de su microbiota. Las plantas no

se consideran más como entidades únicas sino más bien están tratando de entenderse desde un punto de vista más integral en conjunto con su microbiota (Hacquard & Schadt, 2015). En este contexto, se ha propuesto considerar a las plantas como un *holobionte*, es decir la suma del hospedero y sus microorganismos (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Rosenberg *et al.*, 2010), de modo que pueda ser un nivel distinto de organización sobre el cual se ejerce la selección (Bordenstein & Theis, 2015).

## **2.5 El ensamble de las comunidades microbianas**

El ensamble de las comunidades microbianas asociadas con las plantas es producto de diversos factores y mecanismos (Lebeis, 2015). Se considera que el suelo funciona como el reservorio principal de microorganismos a partir del cual se constituye la microbiota asociada con las plantas (Lebeis, 2015; Vandenkoorhuyse *et al.*, 2015). En estudios realizados en comunidades de microorganismos asociadas con *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado la existencia de una conexión entre los microorganismos presentes en el suelo y aquellos asociados con las raíces de la planta (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Schlaeppli *et al.*, 2014). La colonización de las raíces de la planta por parte de los microorganismos del suelo es un proceso determinista que puede involucrar diferentes mecanismos en la mediación de los cambios de las comunidades edáficas hacia las comunidades asociadas con la planta (Bulgarelli *et al.*, 2013). A diferencia de la microbiota asociada con las raíces, en las cuales el inóculo inicial está definido por los factores edáficos, la microbiota asociada con las hojas está sujeta a procesos estocásticos debido a que las fuentes de inóculo inicial son más variadas y complejas (Maignien *et al.*, 2014).

Gracias a la implementación de la secuenciación masiva en el estudio de la microbiota asociada con las plantas (Turner *et al.*, 2013), ha sido posible determinar algunos factores involucrados en el ensamble de la misma. Estos estudios, realizados en diferentes plantas hospederas, muestran que el ensamble de la microbiota se ve afectado por la especie hospedera, la localización geográfica, el compartimento de la planta y la estacionalidad (DeAngelis *et al.*, 2008; Lundberg *et al.*, 2012; Lançon *et al.*, 2013; Peiffer *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014; Edwards *et al.*, 2015; Zarraonaindia *et al.*, 2015). Aunque los esfuerzos realizados para analizar las comunidades microbianas asociadas con las plantas han sido importantes, han estado enfocados principalmente en las comunidades bacterianas. Aunado a esto, los reportes recientes que se enfocan en las comunidades fúngicas están restringidos al análisis de ciertos compartimentos como la rizósfera (Hilton *et al.*, 2013; Shakya *et al.*, 2013), de modo que no es posible determinar qué tan extrapolables son estos hallazgos hacia las comunidades asociadas con otras partes de la planta.

## **2.6 Los agaves y sus microorganismos**

A pesar de la importancia ecológica y económica de los agaves, es poco lo que se sabe acerca de los microorganismos que interactúan con estas plantas. Los estudios realizados en este contexto, han estado enfocados principalmente en el aislamiento e inoculación de microorganismos (bacterias y hongos) en distintas especies como *A. deserti* (Cui & Nobel, 1992), *A. angustifolia* (Bautista-Cruz *et al.*, 2015), *A. tequilana* (Pimienta-Barrios *et al.*, 2009; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2014), *A. americana* (Martínez-López *et al.*, 2009), *A. potatorum* (Caballar-Hernández *et al.*, 2013) y *A. victoria-reginae* (Obledo *et al.*, 2003).

Algunos de estos reportes en las diferentes especies de *Agave*, han mostrado efectos benéficos como producto de la colonización de algunos microorganismos. Es el caso de los hongos micorrízicos, en cuya presencia se registra una mejoría en la obtención de agua y nutrientes por parte de las plantas (Cui & Nobel, 1992; Camargo-Ricalde *et al.*, 2003; Pimienta-Barrios *et al.*, 2009). Efectos similares, además del incremento de la actividad fotosintética, el contenido de azúcares y un mayor crecimiento de las plantas, se observaron cuando las plantas de *Agave* establecieron asociaciones con hongos endófitos (Obledo *et al.*, 2003;), bacterias diazótrofes (Ruiz *et al.*, 2011) y solubilizadoras de fosfatos (Bautista-Cruz *et al.*, 2015).

En conjunto, estos reportes sugieren que las interacciones que los agaves establecen con sus microorganismos juegan un papel importante en la salud y productividad de estas plantas. Considerando lo anterior, y que los agaves son plantas con metabolismo CAM adaptadas a condiciones extremas de temperatura y humedad, el análisis de la microbiota asociada con dichas plantas podría brindar una nueva perspectiva acerca de las interacciones planta-microorganismo y su función en la adecuación de las plantas en las zonas áridas.

### 3 Hipótesis

- 1) La composición y diversidad de las comunidades microbianas asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti* son afectadas de forma diferencial por factores bióticos (especie de *Agave* y sus compartimentos) y abióticos (estacionalidad y localización geográfica).
- 2) Ciertos microorganismos asociados con los agaves están involucrados con su adecuación.

### 4 Objetivos

- Caracterizar las comunidades microbianas asociadas con *Agave tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti*.
- Cuantificar el efecto de los factores bióticos y abióticos en la composición y diversidad de las comunidades microbianas asociadas.
- Investigar las potenciales funciones de algunos de los microorganismos asociados con los agaves en la adecuación de estas plantas.

## 5 Estrategia Experimental

### 5.1 Sistema de estudio

En este proyecto se evaluaron las comunidades procariontes y fúngicas asociadas con tres especies del género *Agave*: *Agave tequilana* Weber var. azul, *Agave salmiana* Otto y *Agave deserti* Engelm. Estas tres especies se encuentran distribuidas en ciertas regiones de México y de los Estados Unidos de América, sin embargo no son simpátricas (Fig. 5.1).

*Agave tequilana* pertenece al grupo *Rigidae* (Gentry, 1982) y se encuentra únicamente en poblaciones cultivadas, mientras que *A. salmiana* pertenece al grupo *Salmianae* y existe en poblaciones silvestres que se localizan desde Guerrero hasta Sonora (Gentry, 1982, CONABIO, 2006).

Por otro lado, *A. deserti* pertenece al grupo *Deseticolae* y es nativo de California aunque también está localizado en ciertas zonas de Arizona y Baja California (Gentry, 1982; Navarro-Quezada *et al.*, 2003).

### 5.2 Sitios de muestreo

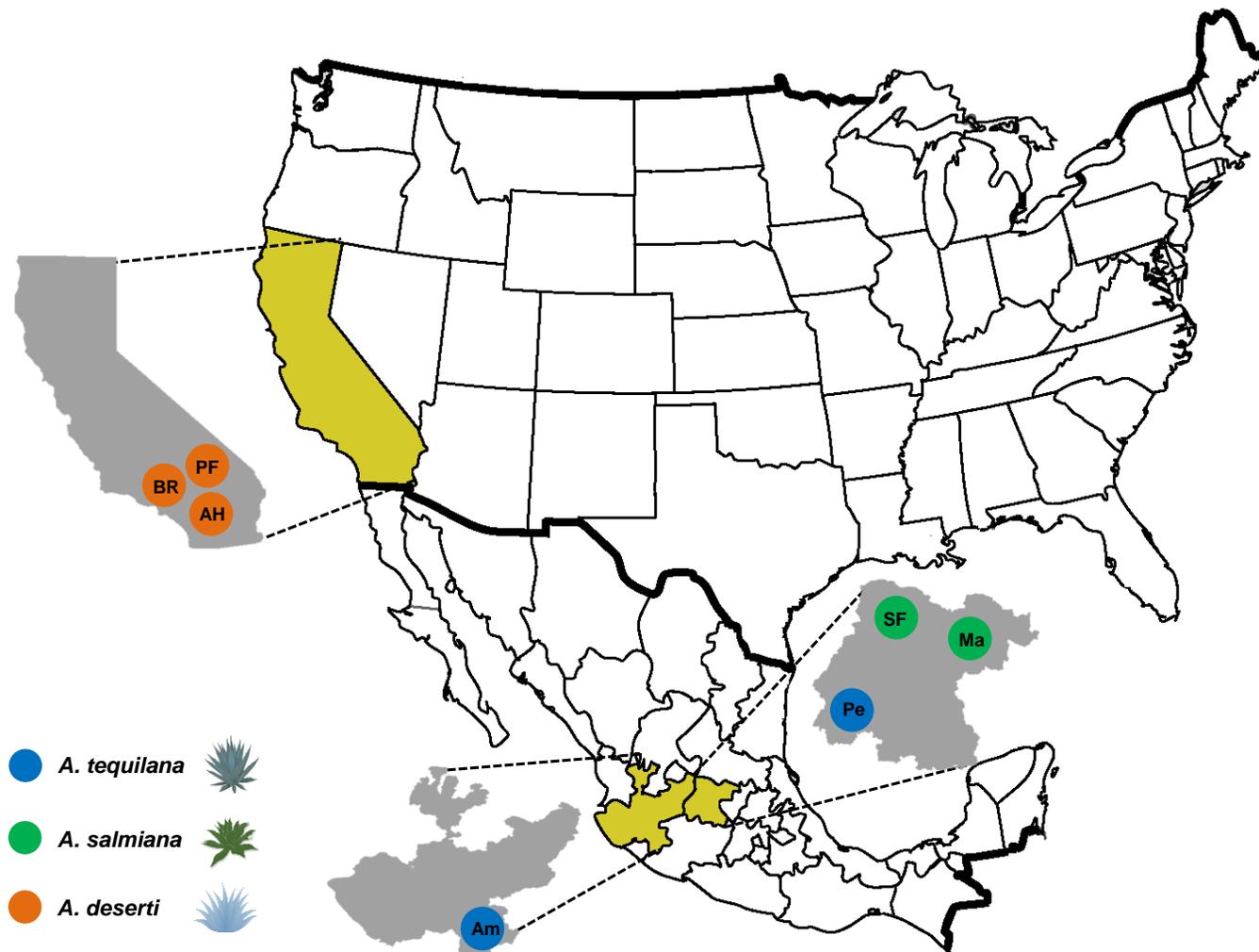
En el caso de *A. tequilana* y *A. salmiana* nuestros sitios de muestreo estuvieron establecidos en la región del Bajío, en los estados de Jalisco y Guanajuato (Fig. 5.1). *Agave tequilana* fue colectado en predios manejados por dos compañías tequileras en municipios bajo la Denominación de Origen Tequila: Pénjamo, Guanajuato (Pe) y Amatitán, Jalisco (Am). Las plantas de *A. salmiana* fueron muestreadas a partir de

poblaciones silvestres ubicadas en las localidades de El Magueyal (Ma) y San Felipe (SF) en el estado de Guanajuato (Apéndice A).

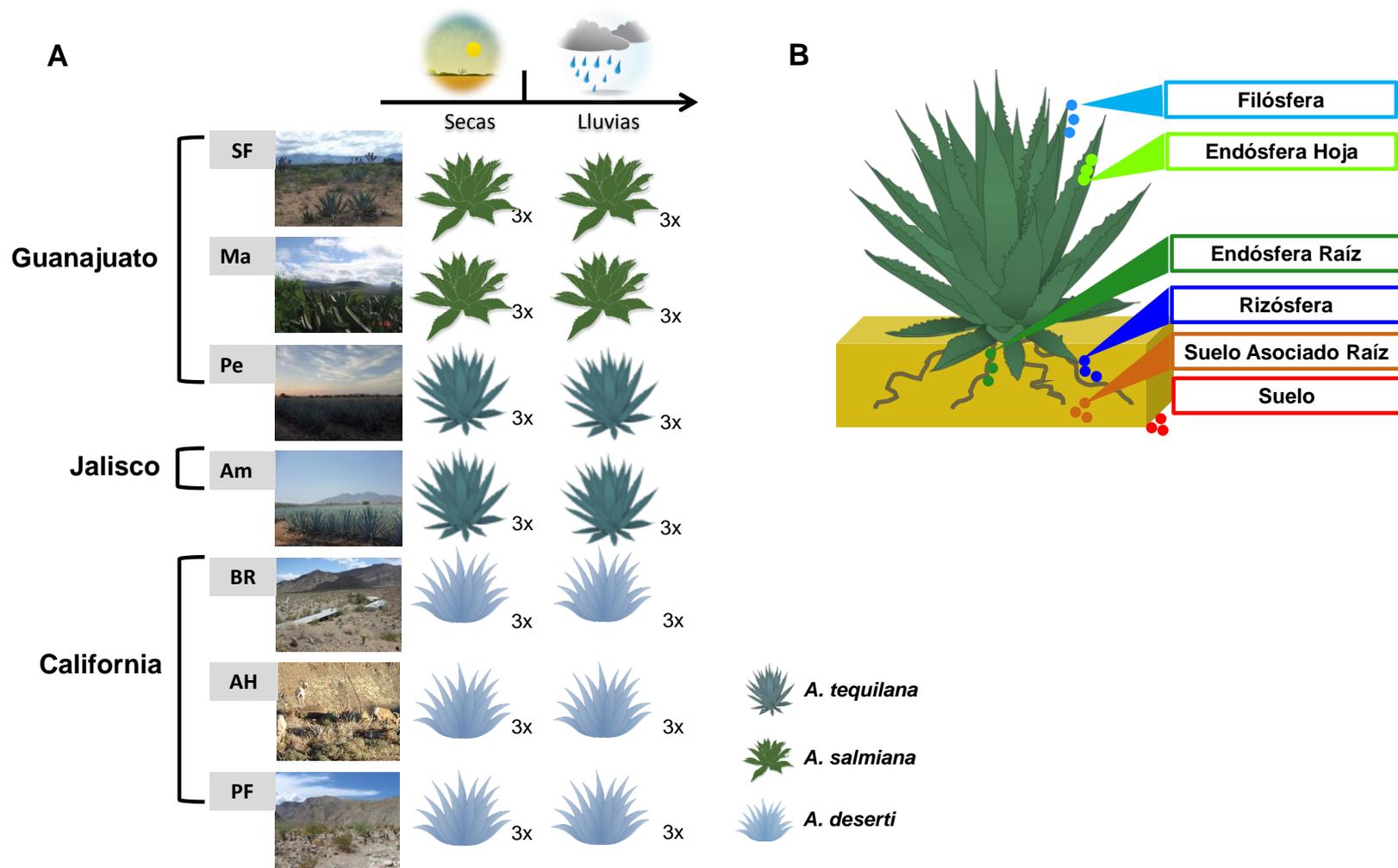
Las muestras de *A. tequilana* y *A. salmiana* fueron colectadas durante los años 2012 y 2013, durante la temporada de secas: a finales del mes de mayo y la temporada de lluvias (a finales del mes de octubre). Sin embargo para fines del proyecto doctoral se analizaron únicamente aquellas muestras obtenidas durante 2012.

Gracias a la colaboración que existe entre el Laboratorio de Interacciones Microbianas, CINVESTAV y el Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía, EUA, pudimos incluir en este estudio las muestras de *A. deserti*, las cuales fueron colectadas por los colaboradores del JGI. *Agave deserti* fue muestreado durante los meses de septiembre y abril en 2012, a partir de poblaciones silvestres localizadas en la reserva Philip L. Boyd Deep Canyon Desert en California. Las colectas se realizaron en tres localidades denominadas Agave Hill (AH), Boyd Ridge (BR) y Pinyon Flats (PF). Las características de precipitación, temperatura y suelo para cada uno de los sitios de muestreo de las tres especies se describen en la Tabla 5.1.

Para cada una de las especies y los sitios se tomaron muestras de tres plantas visualmente sanas. Se colectaron cuatro muestras por planta para realizar el análisis de las seis comunidades microbianas de nuestro interés (Fig. 5.2): dos hojas para la endósfera de hoja (le) y la filósfera (p), tejido de raíz para la endósfera de raíz (re) y rizósfera (rz), suelo asociado a raíz (rzs), es decir los agregados de suelo que se encuentran en la cercanía del sistema radical y finalmente suelo colectado a un metro de distancia de las plantas muestreadas (s). En total obtuvimos 252 muestras, 72 de *A. tequilana*, 72 de *A. salmiana* y 108 de *A. deserti*. Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento.



**Figura 5.1** Localización de los sitios de estudio en Jalisco, Guanajuato y California donde fueron colectadas las tres especies de *Agave* analizadas. Sitios de colecta para *A. tequilana*: Am= Amatitán, Pe= Pénjamo; *A. salmiana*: Ma= El Magueyal, SF= San Felipe; *A. deserti*: BR= Boyd Ridge, PF= Pynion Flats, AH= Agave Hills.



**Figura 5.2** Diseño experimental establecido para la colecta de las muestras durante 2012 en los diferentes sitios de estudio. Sitios de colecta para *A. tequilana*: Am= Amatitán, Pe= Pénjamo; *A. salmiana*: Ma= El Magueyal, SF= San Felipe; *A. deserti*: BR= Boyd Ridge, PF= Pynion Flats, AH= Agave Hills (A). Planta de agave donde se muestran las seis comunidades microbianas en asociación con las agaváceas que fueron colectadas para el análisis (B)

**Tabla 5.1** Localización geográfica, características de suelo, precipitación y temperatura de los sitios de muestreo.

		Sitios de estudio						
		México				EUA		
		Jalisco	Guanajuato			California		
		<i>A. tequilana</i>		<i>A. salmiana</i>		<i>A. deserti</i>		
		Amatitán (Am)	Pénjamo (Pe)	El Magueyal (Ma)	San Felipe (SF)	Boyd Ridge (BR)	Agave Hill (AH)	Pinyon Flats (PF)
Latitud		21.053	20.686	21.195	21.766	33.714	33.665	33.601
Longitud		103.902	101.875	100.439	100.163	116.524	116.425	116.595
Altitud (msnm)		1260	1714	2175	2089	452	814	1225
Temperatura media anual (°C) <sup>a</sup>		26.4	19	17.9	17	23.7	20.6	18.0
Precipitación (mm) <sup>a</sup>		558	790	485	204.5	136.0	183.0	238.3
Precipitación en secas (mm) <sup>a</sup>		4.2	147	130	68	51.7	69.4	95.5
Precipitación en lluvias (mm) <sup>a</sup>		553.8	643	355	136.5	83.9	113.6	142.8
Características del suelo	Textura	Franco arcilloso	Arcilla	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
	pH <sup>b</sup>	6.8	6.68	5.79	6.25	8.02	7.48	7.95
	Materia Orgánica (%)	1.1	0.96	3.97	0.71	ND	ND	ND
	Nitrógeno (µg g <sup>-1</sup> )	19.7	9.14	8.76	12.65	ND	ND	ND
	Fósforo (µg g <sup>-1</sup> )	3.64	27.1	18.11	4.53	42.17	87	74
	Potasio (µg g <sup>-1</sup> )	193	482	64.35	251.7	155.5	131	91.33

<sup>a</sup>En el caso de los sitios de estudio en México, los datos se obtuvieron de la Comisión Nacional del Agua. Los datos correspondientes a los sitios de estudio en California se obtuvieron del DRI Weather Station Data Collection (<http://www.wrcc.dri.edu/weather/ucde.html>).

ND= No determinado.

<sup>b</sup>Diferencias estadísticamente significativas entre especies de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis ( $H_{2, 15} = 10.763$ ,  $P = 0.0046$ ).

### **5.3 Procesamiento de las muestras y extracción de ADN**

Con el objetivo de recuperar los microorganismos de la filósfera y rizósfera, en una campana de flujo laminar se lavaron las muestras de hojas y raíces con buffer de lavado para epífitos (6.75g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.75g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 1mL Triton X-100 por litro) y una solución de NaCl 0.9%, respectivamente.

A partir de estos lavados se recuperó el pellet microbiano por centrifugación y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso para la extracción de ADN. Después de la obtención del pellet microbiano, los tejidos de hojas y raíces fueron desinfectados por inmersión en etanol 70% durante dos min, NaClO 5% durante 10 min y finalmente enjuagados dos veces con agua destilada estéril. Para validar el proceso de desinfección, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del segundo lavado con agua estéril y se inocularon sobre placas Petri con agar nutritivo.

Posteriormente, con una navaja estéril se hicieron cortes transversales de las hojas y raíces para obtener secciones de 5 mm de grosor. Aproximadamente se obtuvieron 300 g de tejido de hojas y raíces, estos se almacenaron en bolsas plásticas estériles a  $-80^\circ\text{C}$  hasta la extracción de ADN.

La extracción de ADN fue realizada utilizando tres protocolos distintos dependiendo del tipo de muestra. El ADN total de hoja y raíz se extrajo a partir de 500 mg de tejido usando el protocolo de extracción de CTAB de acuerdo con Edwards (2001). En el caso de las muestras de filósfera y rizósfera, el ADN fue extraído con el Ultra Clean® Water ADN Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el ADN de las muestras de suelo y suelo asociado a raíz se extrajo usando el Power Soil® ADN Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), según las instrucciones del fabricante.

El ADN obtenido de todas la muestras fue cuantificado en un espectrofotómetro ND 1000 (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), y su integridad se corroboró por electroforesis en gel de agarosa 1%.

#### **5.4 Análisis molecular de las comunidades microbianas**

Debido a que nuestro estudio es uno de los primeros trabajos dirigidos al análisis de las comunidades microbianas asociadas con agaváceas, como primera aproximación para conocer la composición específicamente de las comunidades bacterianas, utilizamos la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés).

El DGGE es una técnica rápida de separación de fragmentos de ADN del mismo tamaño (previamente amplificados vía PCR), pero constituidos por una secuencia de nucleótidos diferente (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer, 1999). Una de las ventajas del DGGE es que en cuestión de horas podemos visualizar la composición de comunidades microbianas complejas asociadas con diferentes muestras ambientales y a partir de ahí hacer estimaciones de diversidad (Bondoso *et al.*, 2014), y a un costo menor en comparación con otras técnicas como la secuenciación (Duarte *et al.*, 2012).

No obstante, considerando la baja resolución y las limitaciones inherentes al DGGE, decidimos usar la secuenciación etiquetada Illumina (iTags) en plataforma MiSeq como segunda aproximación y así hacer un análisis con mayor resolución y profundidad tanto de las comunidades procariontes como fúngicas asociadas con las agaváceas. De tal modo que tener datos provenientes de estos dos enfoques nos permitió realizar una comparación entre los patrones observados con el DGGE y los iTags, al menos para las comunidades bacterianas.

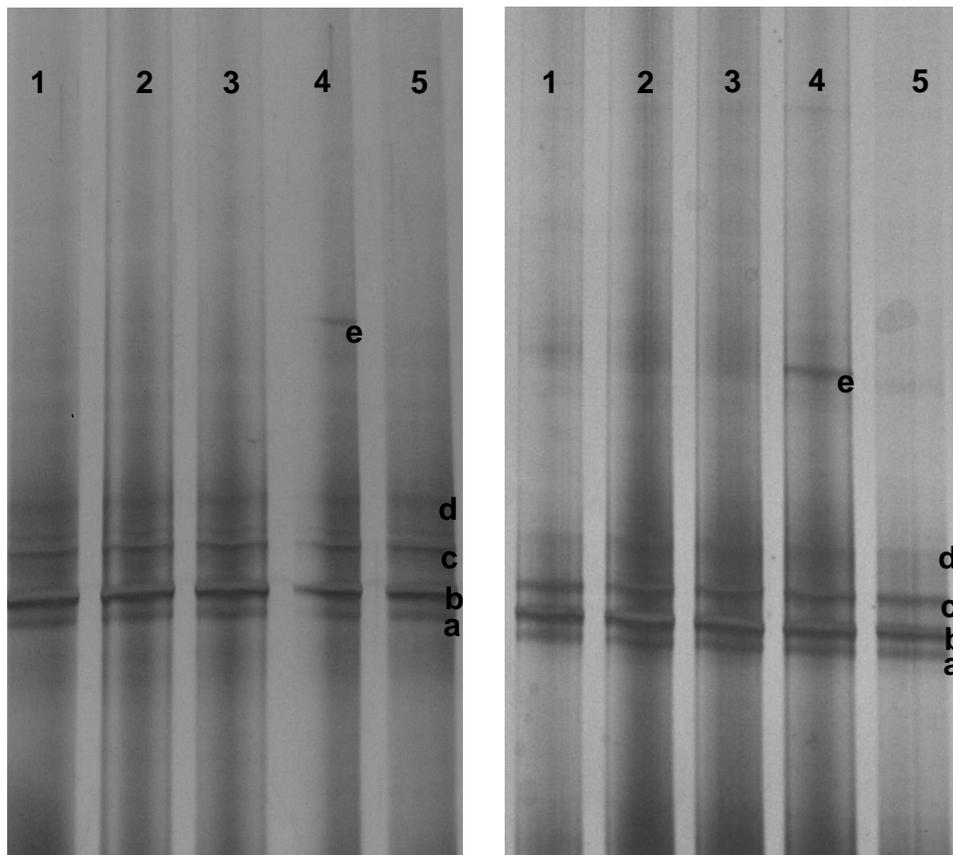
#### 5.4.1 PCR-DGGE de las comunidades bacterianas

El ADN obtenido de las diferentes muestras fue utilizado como templado para realizar una PCR anidada. En esta PCR anidada se amplificó primero el gen 16S rRNA completo utilizando los oligonucleótidos F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y R1494 (5'-CTACGGRTACCTTGTTACGAC-3'), posteriormente se amplificó la región hipervariable V6-V8 con los oligonucleótidos F968-GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-AACGCGAAGAACCTTAC-3') y R1494 (5'-CTACGGRTACCTTGTTACGAC-3'). Estas reacciones se llevaron a cabo usando las condiciones previamente reportadas por Lottmann *et al.* (2010), modificando el número de ciclos a 25 y a 20 en la primera y segunda reacciones, respectivamente. Los productos obtenidos de la PCR (433 pb) fueron verificados con electroforesis en gel de agarosa 1%.

El análisis de DGGE se realizó con el Dcode System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA), utilizando el protocolo establecido por Costa *et al.* (2006). Previo al análisis de todas las muestras, la reproducibilidad del análisis de DGGE del 16S rRNA fue validada usando cinco muestras diferentes de endósfera de hoja de los agaves. En dos diferentes geles de DGGE se cargaron 200 ng de cada una de las muestras por carril y se observaron patrones que fueron consistentes entre dichos geles (Fig. 5.3).

Para la evaluación de las 144 muestras obtenidas de *A. tequilana* y *A. salmiana* usando el DGGE, se cargaron 200 ng del segundo producto de PCR (433pb) por carril en los diferentes geles. Con la finalidad de evaluar de forma cuantitativa los perfiles observados en los geles de DGGE, se desarrolló un marcador a partir de la amplificación de la región hipervariable V6-V8 del gen 16S rRNA de cinco cepas

bacterianas axénicas, usando las mismas condiciones de PCR que en el caso de las muestras de agaves. El producto de amplificación (433 pb) obtenido de las cinco cepas y usado como marcador, fue cargado en los carriles inicial y final de cada gel en diferentes concentraciones (25, 50, 75, 100, 150 ng). Los geles de DGGE fueron teñidos con SYBR Gold (INVITROGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para realizar el análisis de los perfiles observados en los geles, las imágenes se capturaron con ayuda de un transiluminador ChemiDoc MP System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA).



**Figura 5.3** Perfiles de DGGE provenientes de dos diferentes corridas realizadas con ADN extraído de las mismas muestras (amplificaciones distintas) y que presentan patrones de migración consistentes. 1-2: muestras de endósfera de *A. salmiana*, 3-5: muestras de endósfera de *A. tequilana*. a-e: bandas similares detectadas a lo largo de ambos geles. Las condiciones de corrida de ambos perfiles consistieron en un gradiente desnaturante de 26-58% de urea, a 220 V durante seis horas.

### *Secuenciación de las bandas detectadas con DGGE*

Las bandas detectadas con el análisis de DGGE fueron escindidas de los geles previamente teñidos y posteriormente eluidas de acuerdo con el protocolo descrito por Lottmann *et al.* (2010). De la suspensión obtenida de la elución de las bandas, se tomaron 2  $\mu$ L para ser usados como templado en una PCR para re-amplificar la región hipervariable V6-V8 del gen 16S rRNA (Lottmann *et al.*, 2010).

Los productos obtenidos de la PCR fueron ligados en el vector pJET 1.2 (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y posteriormente transformados en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las transformantes se inocularon en placas Petri con medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37°C durante una noche. En cada caso se seleccionaron aleatoriamente 10 colonias que fueron inoculadas en caldo LB con ampicilina (100 mg/L) e incubadas a 37°C durante la noche.

A partir de las colonias seleccionadas se realizó la extracción de ADN plasmídico, el ADN obtenido se usó como templado en una PCR para verificar que el inserto contenido en las clonas fuera del tamaño correcto. Dicha PCR se realizó con los oligonucleótidos pJET 1.2 forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') y pJET 1.2 reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, el ADN plasmídico de aquellas clonas que contenían el inserto correcto fueron enviadas a secuenciar por el método Sanger.

### *Proceso y análisis estadístico de los perfiles de DGGE*

Las secuencias obtenidas de las bandas detectadas en los geles de DGGE, fueron depuradas y comparadas con las bases de datos SILVA (Quast *et al.*, 2013), Ribosomal

Database Project (RDP) versión 10.32 (Maidak *et al.*, 2001) y la base 16S rRNA del NCBI usando BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

A partir de las bandas obtenidas de los perfiles de DGGE, se determinaron 88 unidades taxonómicas operacionales (OTUs, por sus siglas en inglés). De estos OTUs, 23 fueron identificados como cloroplastos y por lo tanto se eliminaron de los datos utilizados para los análisis posteriores. Las secuencias de los 65 OTUs bacterianos restantes fueron analizadas con el software UCHIME (Edgar *et al.*, 2011), para detectar la presencia de quimeras y posteriormente fueron depositadas en el NCBI bajo los números de acceso KJ659221-KJ659285.

Los perfiles de DGGE previamente digitalizados, se analizaron usando el software Image Lab® 4.0 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA). Con ayuda del programa se asignó cada una de las bandas detectadas dentro de los perfiles observados en los geles, aquellas bandas que presentaron el mismo patrón de migración (distancia electroforética) a lo largo de las diferentes muestras, se consideraron como un mismo OTU. La intensidad de cada banda fue cuantificada en relación al marcador colocado en los geles (Fig. 5.4), esta cuantificación fue usada para calcular la abundancia relativa de cada OTU con respecto al total de OTUs en cada una de las muestras. Finalmente, tanto la presencia/ausencia y la abundancia relativa de cada OTU se registraron en una base de datos que posteriormente fue transformada logarítmicamente antes de realizar los análisis estadísticos.

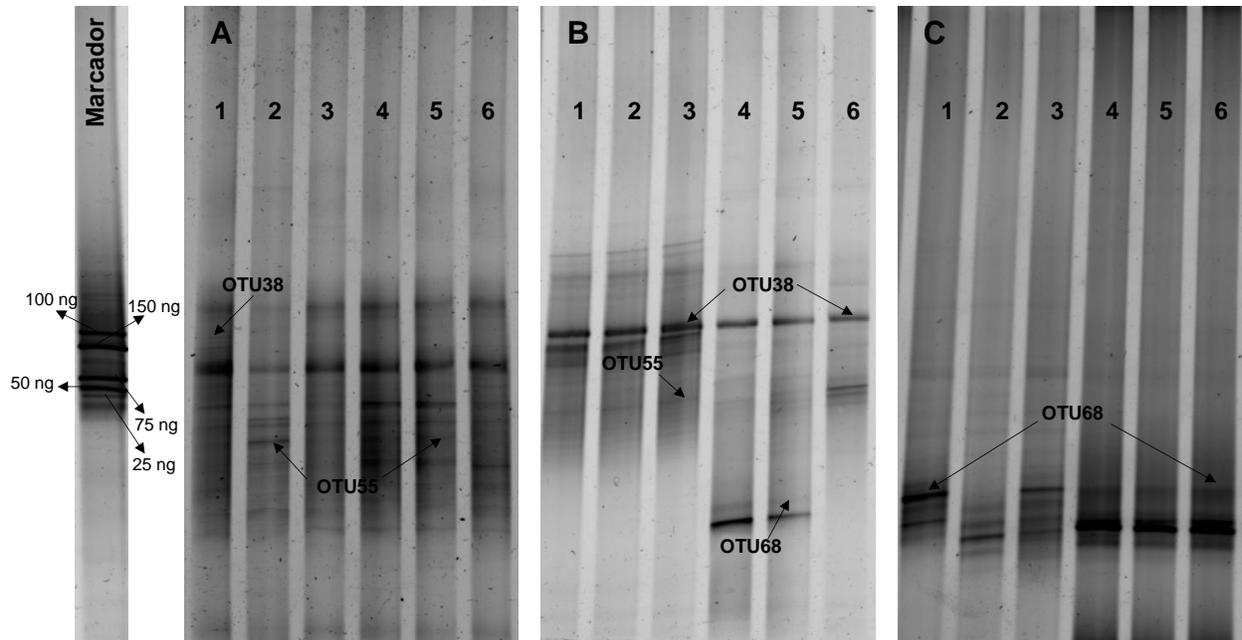
La diversidad de las diferentes comunidades bacterianas asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*, se estimó con el índice de diversidad de Shannon (Hill, 1973), el cual se define como:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

Donde  $p_i$  es la abundancia relativa del  $i$ -ésimo OTU y  $S$  es el número total de OTUs. El índice de Shannon se calculó usando el paquete BiodiversityR (Kindt & Code, 2005) en el software R.

A partir de los datos de abundancia observada para cada uno de los OTUs detectados, se generó una matriz de distancias estimando la disimilitud entre las muestras. Para esto se calculó la distancia Bray-Curtis, donde la suma de las diferencias entre objetos (muestras) en las variables (OTUs) es estandarizada sumando los valores de las variables a lo largo de los objetos y de las variables (Quinn & Keough, 2002). Los valores de la distancia Bray-Curtis fluctúan entre cero (mismas variables y valores en ambos objetos –completamente similar) y uno (sin variables en común –completamente diferentes), y es usada comúnmente con datos de abundancia de especies ya que ignora aquellas variables con ceros en ambos objetos.

El efecto de los factores considerados en nuestro diseño experimental (el tipo de comunidad, las especies de *Agave*, estacionalidad, sitio de muestreo y sus interacciones) sobre la matriz de distancias, se evaluó usando un análisis de varianza basado en permutaciones (PERMANOVA, Anderson, 2001).



**Figura 5.4** Perfiles de DGGE de las seis comunidades bacterianas analizadas en este estudio. Izquierda: marcador mostrando cinco bandas y sus masas correspondientes. (A) Muestras de las comunidades bacterianas de suelo (1-3) y suelo asociado a raíz (4-6) asociadas con tres ejemplares de *A. tequilana*. (B) Muestras de las comunidades bacterianas de filósfera (1-3) y rizósfera (4-6) asociadas con tres ejemplares de *A. tequilana*. (C) Muestras de las comunidades bacterianas de endósfera y rizósfera asociadas con tres ejemplares de *A. salmiana*.

Los factores que resultaron estadísticamente significativos de acuerdo a los resultados del PERMANOVA, se representaron gráficamente por medio de un análisis de ordenamiento de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS). La finalidad de un NMDS es mostrar las disimilitudes entre las muestras (objetos) de forma gráfica, de tal modo que la distancia entre los objetos representa su disimilitud considerando la abundancia de los OTUs (variables) que se comparten entre dichos objetos. El ajuste de bondad del NMDS es el valor de *stress* (*S*), el cual indica cuanto coinciden la distancia entre objetos y la disimilitud. Entre más cercano a cero sea el valor de *S*, se considera que el análisis de ordenamiento es mejor (Manly, 1986; Quinn & Keough, 2002). Todos los análisis se realizaron usando los paquetes MASS (Venables & Ripley, 2002) y Vegan (Oksanen *et al.*, 2013) en el software R (R Core Team, 2013).

#### 5.4.2 Secuenciación etiquetada de las comunidades microbianas

De manera paralela al análisis con DGGE, tanto las comunidades procariontes como las fúngicas fueron analizadas usando secuenciación etiquetada (iTags). Dicho procedimiento, así como el procesamiento de las secuencias obtenidas (depuración, asignación de OTUs), fue realizada por el JGI en California, EUA.

Para el análisis de las comunidades procariontes se utilizó como marcador molecular la región V4 del gen 16S rRNA, los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de esta región fueron: 515F (5' –GTGCCAGCMGCCGCGGTAA- 3') y 816R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3'). Las comunidades fúngicas fueron analizadas utilizando la región ITS2 como marcador molecular, empleando los oligonucleótidos: ITS9F (5' -GAACGCAGCRAAIIGYGA- 3') e ITS4R (5' –TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3').

Con la finalidad de reducir la contaminación en el análisis de las comunidades procariontes por la presencia de mitocondrias y cloroplastos, se implementó el uso de péptidos de ácidos nucleicos (PNAs, por sus siglas en inglés). Los PNAs son oligómeros sintéticos que se unen específicamente a una zona particular en las secuencias contaminantes, de tal modo que bloquean su amplificación (Lundberg *et al.*, 2013). En general, el uso de los PNAs en la amplificación de la región V4 del gen 16S rRNA, redujo de forma importante la contaminación por mitocondrias y cloroplastos, de este modo fue posible incrementar el número de secuencias bacterianas utilizables de la endósfera de hoja y raíz, así como de la filósfera.

La amplificación etiquetada de los marcadores moleculares se llevó a cabo en placas de 96 pozos, cada una de las muestras se hizo por triplicado usando 10 ng de templado por reacción y se colocaron cuatro controles negativos por placa. Las

condiciones usadas para la amplificación por PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C por 3min, 30 ciclos de 94°C por 45s, 78°C por 10s, 50°C por 60s y 72°C por 90s, y una extensión final a 72°C durante 10min. Después de la amplificación, los triplicados de cada reacción fueron mezclados y cuantificados con el kit Qubit High Sensitivity Assay (Life Technologies) en un lector de fluorescencia Turner Biosystems (Promega, Madison, EUA). Los productos de PCR obtenidos de cada placa fueron mezclados de forma equimolar y purificados con perlas magnéticas AMPureXP (Beckman-Coulter, Indianápolis, EUA).

Finalmente la secuenciación de los productos de PCR fue realizada en plataforma Illumina en un equipo MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). Todas las secuencias de calidad obtenidas de este proyecto están disponibles en los archivos de lectura de secuencias (SRA, por sus siglas en inglés) del NCBI con las siguientes claves de acceso: SRA211411, SRA211420, SRA211416, SRA211422 y SRA211408.

#### *Procesamiento y análisis estadístico de los datos de secuenciación etiquetada*

Las secuencias obtenidas se manejaron de acuerdo con un procedimiento previamente desarrollado y validado por el JGI. En dicho procedimiento se filtraron 39, 624,119 secuencias bacterianas (V4-16S rRNA) y 33, 323,114 secuencias fúngicas (ITS2) para eliminar aquellas secuencias identificadas como contaminantes. Posteriormente se eliminaron los oligonucleótidos en el extremo 5', así como las bases de mala calidad de todas las secuencias. Las secuencias obtenidas de la filtración fueron 35, 770,987 bacterianas y 27, 596,665 fúngicas que, con ayuda de los procedimientos de agrupamiento de OTUs de UPARSE (Edgar, 2013), se agruparon en 40, 759 OTUs bacterianos y 25, 871 OTUs fúngicos al 97% y 95% de identidad, respectivamente.

La taxonomía de cada OTU fue asignada usando el Clasificador Bayesiano RDP Naïve (Wang *et al.*, 2007) con bases de referencia propias. Las secuencias correspondientes a la región V4 del gen 16S rRNA fueron taxonómicamente asignadas usando la base de referencia que fue compilada a partir de la versión de mayo de 2013 de la base de datos 16S GreenGenes (DeSantis *et al.*, 2006), la base de datos 16S rRNA SILVA (Quast *et al.*, 2013) y además un conjunto de secuencias de la región V4 obtenidas a partir secuencias de 16S rRNA curadas de forma manual. En el caso de los datos de ITS, la base de referencia se construyó a partir de la base de datos UNITE (Koljalg, 2013).

Después de que cada OTU fue asignado taxonómicamente, se descartaron aquellos OTUs que: 1) fueron asignados a nivel de reino con un puntaje de clasificación en RDP menor a 0.5, 2) no fueron asignados a nivel reino, *Bacteria* o *Archaea*, para la base de datos 16S y 3) no fueron asignados a nivel de reino, *Fungi*, para la base de datos ITS2. Con ayuda de las réplicas incluidas en cada una de las placas de 96 pozos, se calculó un umbral para determinar la reproducibilidad técnica para los OTUs asignados según lo descrito por Lundberg *et al.* (2013). De acuerdo con dicho umbral, se conservaron aquellos OTUs que tuvieron al menos siete lecturas en por lo menos cinco muestras en los datos de la región V4 del 16S rRNA y dos lecturas en al menos cinco muestras en los datos del ITS2. La base de OTUs originada después de la aplicación de estos criterios fue utilizada para los análisis posteriores.

Es importante mencionar que para homogeneizar las diferencias en el número de lecturas entre las muestras en el análisis de diversidad, éste se realizó a partir de una base de datos rarificada (sub-muestreo aleatorio) a 1000 lecturas por muestra. La

diversidad tanto de las comunidades procariontes y fúngicas, se estimó con el índice de Shannon y se calculó cómo se hizo previamente para los datos obtenidos del DGGE.

Los análisis estadísticos restantes se realizaron con la tabla de OTUs sin rarificar en el programa R, haciendo uso de diferentes paquetes. La composición de las comunidades procariontes y fúngicas fue descrita usando la abundancia relativa de cada uno de los OTUs en los diferentes tipos de muestra, de tal modo que se pudieron detectar los grupos microbianos relevantes en cada caso. Del mismo modo que con los datos del DGGE, se calculó una matriz de distancias (Bray-Curtis) y se evaluó el efecto de los factores considerados en nuestro diseño experimental, mediante PERMANOVAs, hechos con el paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2013). Los factores estadísticamente relevantes se analizaron con un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), el cual fue hecho con los paquetes MASS (Venables & Ripley, 2002) y Vegan. Finalmente, se realizó también un análisis basado en el principio de Pareto (Werner *et al.*, 2014) para determinar aquellos microorganismos que pudieran tener un papel importante en la comunidad. Dicho análisis se hizo usando la abundancia relativa promedio y la prevalencia de cada OTU en cada comunidad, en las muestras de las tres especies de *Agave*.

## **5.5 Análisis metagenómico de las comunidades epífitas asociadas con *A.***

### ***tequilana* y *A. salmiana***

Como producto de la colaboración que existe entre el Laboratorio de Interacciones Microbianas y el JGI, adicionalmente al análisis de las comunidades microbianas realizado a través de DGGE y de la secuenciación etiquetada, fue posible realizar el análisis metagenómico de las comunidades epífitas asociadas con los dos agaves

colectados en México. Las muestras utilizadas corresponden a las comunidades de rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*, es decir una muestra por cada sitio de colecta (Apartado 5.2) para ambas especies (dos rizósferas y dos filósferas por especie)

### **5.5.1 Construcción de bibliotecas**

El ADN de las muestras tanto de rizósfera como de la filósfera fue extraído con el Ultra Clean® Water DNA Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN obtenido se realizó en un espectrofotómetro ND 1000 (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), y su integridad se corroboró por electroforesis en gel de agarosa 1%.

El ADN obtenido fue utilizado para la construcción de las bibliotecas metagenómicas. De manera general en este proceso el ADN se manipula de tal forma que es fragmentado, sometido a la reparación de extremos, ligación de adaptadores y amplificación. Sin embargo, debido a que se obtuvieron diferentes concentraciones de ADN de las muestras analizadas, la preparación de estas bibliotecas se realizó con dos protocolos diferentes.

A partir de las muestras con mayor concentración de ADN (rizósfera de ambos agaves y filósfera de *A. tequilana* sitio Pénjamo), se tomaron 100 ng de ADN para fragmentarse por medio de ondas ultrasónicas acústicas en segmentos de 300 pb, este procedimiento se realizó en un ultrasonificador LE220 (Covaris, Woburn, MA, EUA). Posteriormente los fragmentos obtenidos fueron seleccionados por tamaño utilizando perlas magnéticas SPRI (Beckman Coulter, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos recuperados fueron sometidos a la reparación de

extremos, adición de cola de adenina y a la ligación de adaptadores compatibles con Illumina; estos procesos se realizaron usando el KAPA-Illumina Library Preparation Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En el caso de las muestras con baja concentración de ADN (filósfera de *A. tequilana* sitio Amatitán y de ambos sitios de *A. salmiana*), las bibliotecas se construyeron a partir de 1ng de ADN que simultáneamente fue fragmentado y ligado a adaptadores usando el Nextera XT kit (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN fueron enriquecidos con 12 ciclos de amplificación vía PCR, finalmente el producto fue purificado usando perlas magnéticas SPRI (Beckman Coulter, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las bibliotecas construidas con ambos métodos fueron cuantificadas a través de PCR en tiempo real, usando el KAPA Biosystem's NGS Library qPCR kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador tiempo real Roche LightCycler 480. Después de la cuantificación, las bibliotecas fueron preparadas para la secuenciación utilizando el TruSeq Paired-End Cluster kit y el equipo cBot de Illumina para la formación de los agrupamientos (*clusters*). La secuenciación se realizó en el secuenciador Illumina HiSeq 2500, usando el HiSeq TruSeq SBS Sequencing kit de acuerdo al protocolo descrito para una corrida 2x150.

### 5.5.2 Anotación de metagenomas

Para realizar la anotación estructural y funcional de los metagenomas se siguió un proceso establecido en el JGI, desarrollado y descrito por Huntemann *et al.* (2015): DOE-JGI Metagenome Annotation Pipeline (MAP v.4). Brevemente, el MAP implementa como primer paso un control de calidad en el cual se eliminan las secuencias como oligos y adaptadores, además las secuencias son renombradas para evitar duplicidad en los nombres y cumplir con los requerimientos de las herramientas que se usan posteriormente. Las secuencias son recortadas para eliminar las regiones de baja calidad, aquellas secuencias que después de ser recortadas contengan más de 150 pb son removidas. Posteriormente estas secuencias pasan por un filtro de baja complejidad, donde aquellas secuencias con regiones de baja complejidad son identificadas y removidas. Como último paso del control de calidad se realiza un proceso denominado dereplicación para eliminar secuencias replicadas que son artefactos de la secuenciación. Los replicados son aquellas secuencias que presentan un 95% de identidad y cuyos primeros cinco pares de bases son idénticos, sólo la copia de mayor tamaño es retenida. Como resultado se obtienen datos con la suficiente calidad para poder realizar la anotación estructural. El proceso seguido con el MAP hace una predicción de características que incluye la identificación de genes codificantes de proteínas, ARNs no codificantes y ARNs de regulación, así como también la identificación de los elementos CRISPR. La anotación estructural es seguida por la anotación funcional que consiste en la asociación de los genes codificantes de proteínas con COGs, Pfams, términos KO, números EC y el linaje filogenético para los scaffolds/contigs.

### **5.5.3 Análisis preliminar de metagenomas disponibles**

Los metagenomas que han sido liberados por el JGI son los correspondientes a las dos rizósferas de *A. tequilana* (Amatitán y Pénjamo), dos rizósferas de *A. salmiana* (El Magueyal y San Felipe) y una filósfera de *A. tequilana* (Pénjamo). Estos metagenomas se encuentran disponibles en la plataforma Integrated Microbial Genomes (IMG) del JGI: <https://img.jgi.doe.gov>.

Con los datos liberados en la plataforma IMG y las herramientas disponibles en el sitio, se determinó inicialmente la abundancia relativa de los *phyla* bacterianos utilizando el número de genes detectado. De este modo pudimos comparar la abundancia de los diferentes grupos bacterianos en las comunidades de rizósfera y filósfera detectados con DGGE, iTags y los metagenomas.

### **5.6 Detección del potencial diazotrófico en comunidades procariontes asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana***

Sabiendo que el nitrógeno es uno de los macronutrientes más limitantes para el crecimiento de la mayoría de las plantas y en particular para los agaves (Nobel, 2003), decidimos realizar un aislamiento dirigido hacia bacterias silvestres que presentaran potencial diazotrófico (Torres-Gómez, 2013).

A partir de las muestras de la endósfera, rizósfera y filósfera de *A. tequilana* y *A. salmiana* colectadas en campo, se realizaron inoculaciones en placas Petri con medios Rennie y Winogradsky (medios libres de nitrógeno para diazótrofos; Winogradsky, 1935; Rennie, 1981). Las colonias bacterianas que crecieron en estas placas Petri fueron diluidas de forma seriada e inoculadas en nuevas placas hasta lograr cultivos axénicos. Los cultivos axénicos fueron utilizados para evaluar la morfología macro- y

microscópica de cada cepa, así como las condiciones de crecimiento y el pH de las mismas. Considerando los datos mencionados, fuimos capaces de identificar 18 cepas distintas.

Posteriormente para confirmar la posible actividad de la enzima nitrogenasa, se realizó el ensayo de reducción de acetileno (ARA, por sus siglas en inglés) de acuerdo con Hardy *et al.* (1968). Las cepas bacterianas que fueron positivas para ARA, también fueron evaluadas en el uso de fructanos, azúcares complejos presentes en las especies de *Agave* (Mancilla-Margalli & López, 2006; Ravenscroft *et al.*, 2009; Mellado-Mojica & López, 2012), como la única fuente de carbono.

Las 18 cepas bacterianas fueron posteriormente identificadas molecularmente mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA completo, siguiendo los procedimientos previamente descritos (Apartado 5.4.1). Las secuencias obtenidas se encuentran disponibles en el NCBI bajo los números de acceso: KM232684-KM232701. Finalmente, las secuencias del gen 16S rRNA de los aislados bacterianos fueron comparadas con las secuencias de los OTUs detectados mediante el DGGE y la secuenciación etiquetada, usando el software CD-HIT (Li & Godzik, 2006; Huang *et al.*, 2010).

### **5.7 Caracterización de tolerancia a sequía y promoción del crecimiento vegetal en bacterias aisladas de *Agave***

Después de realizar el ensayo de reducción de acetileno, las 11 cepas bacterianas que resultaron positivas para dicho ensayo y que habían sido aisladas de la rizósfera, endósfera de raíz y filósfera de *A. tequilana* y *A. salmiana*, fueron caracterizadas

bioquímicamente para determinar su tolerancia a la sequía y el posible potencial para la promoción del crecimiento vegetal (PCV).

A partir de cultivos axénicos, se realizó un inóculo de cada una de las cepas, éste fue crecido en medio líquido de soya tripticaseína (TSB) durante 24 horas, el inóculo se revisó al microscopio para corroborar su estado axénico y se ajustó a  $OD_{600nm} = 1$ . Los inóculos se utilizaron posteriormente en las diferentes pruebas para determinar la tolerancia a sequía y PCV.

### **5.7.1 Tolerancia a sequía**

#### *Capacidad de crecimiento en baja disponibilidad de agua*

La sobrevivencia de las cepas en condiciones de estrés hídrico fue evaluada con la prueba de crecimiento bajo reducción de agua, de acuerdo con lo descrito por Kavamura *et al.* (2013) y Hallsworth *et al.* (1998). El medio de cultivo utilizado en esta prueba emplea el sorbitol (405 g/L) para disminuir el coeficiente de disponibilidad de agua ( $A_w$ ) a 0.919, y así originar el estrés hídrico. Debido a que la respuesta de cada una de las cepas bacterianas bajo estrés hídrico puede ser diferente, realizamos un gradiente en la concentración de sorbitol para tener distintos niveles de estrés. El gradiente de sorbitol se realizó tomando como 100% la concentración establecida por Kavamura *et al.* (2013) y Hallsworth *et al.* (1998), de tal modo que se establecieron tres concentraciones de sorbitol: 100% (405 g/L = 0.919  $A_w$ ), 50% (202.5 g/L = 0.938  $A_w$ ) y 25% (101.25 g/L = 0.947  $A_w$ ).

A partir de los inóculos se hicieron diluciones seriadas y se tomaron 10  $\mu$ l de las diluciones  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  y  $10^8$  de cada una de las cepas, las cuales fueron inoculadas en placas Petri con medio agar soya tripticaseína (TSA) 10% con el gradiente de sorbitol. Como control de crecimiento para cada cepa, las diluciones antes mencionadas fueron

inoculadas en placas Petri con medio TSA. Las placas fueron incubadas a 40°C por 5 días, durante este lapso el crecimiento se monitoreó cada 24 horas.

#### *Producción de exopolisacáridos*

Nuestras cepas fueron sometidas también a la prueba de producción de exopolisacáridos (EPS), ya que estos polímeros, secretados por algunos microorganismos, pueden estar asociados en la protección contra la desecación y el estrés osmótico (Sánchez *et al.*, 2006). Para determinar si existía producción de EPS, se implementó la prueba desarrollada por Paulo *et al.* (2012) y Guimares *et al.* (1999). En esta prueba se colocaron 20 µl de cultivo axénico de cada una de las cepas en discos de papel filtro (0.5 cm ø) sobre placas Petri con un medio específico que contenía: extracto de levadura 2%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.02%, MnSO<sub>4</sub> 0.0015%, FeSO<sub>4</sub> 0.0015%, CaCl<sub>2</sub> 0.003%, NaCl 0.0015%, agar 1.5% y glucosa 10%.

La producción de EPS se caracteriza por la presencia de un halo con apariencia limosa, de tal modo que se registró la presencia y la apariencia limosa de dicho halo cada 24 horas, durante cinco días. Para confirmar la producción de EPS se realizó una tinción con azul alcian, el cual es un colorante básico polivalente y soluble en agua que se une a carbohidratos, originando una coloración azul debido a las moléculas de cobre presentes en su composición. Las preparaciones fueron observadas al microscopio (Leica DM 750) para corroborar la presencia de la coloración.

### 5.7.2 Características de promoción del crecimiento vegetal

#### *Producción de amoníaco*

Se evaluó la producción de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) en las 11 cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana*, ya que a través de la producción de  $\text{NH}_3$  las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) acumulan y suplementan nitrógeno a la planta hospedera (Marques *et al.*, 2010), además de ayudar en la defensa contra patógenos (Bashan *et al.*, 1980). Para evaluar la producción de  $\text{NH}_3$  se utilizó la prueba descrita por Dey *et al.* (2004), que consiste en inocular 100  $\mu\text{L}$  de cultivo axénico en 10 mL de medio líquido de peptona, los cultivos fueron incubados a 28°C, 150 rpm durante 48 horas. La producción de  $\text{NH}_3$  se determinó con una prueba colorimétrica usando el reactivo de Nessler, constituido por  $\text{K}_2(\text{HgI}_4)$  (Tetrayodomercuriato II) 0.09 M y KOH (Hidróxido de Potasio) 2.5 M.

#### *Producción de cianuro de hidrógeno*

El cianuro de hidrógeno (HCN) es uno de los compuestos volátiles producidos por las BPCV, principalmente en el suelo, y se caracteriza por tener actividad antifúngica e incluso nematicida (Gamalero & Glick, 2011). La producción de HCN se evaluó de acuerdo con la prueba reportada por Castric (1975). En esta prueba se cultivaron las 11 cepas a evaluar en placas de Petri con medio TSA al 10% adicionado con glicina (4.4 g/L), las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas. Posteriormente se colocó en cada placa de Petri un disco de papel filtro, del mismo diámetro que la placa, previamente humedecido con una solución de ácido pícrico al 0.5% y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%. Las placas fueron incubadas por 48 horas más y la producción de HCN se determinó por el cambio de coloración del papel filtro de naranja a rojo.

### *Hidrólisis de celulosa*

Una de los mecanismos que tienen la BPCV para combatir los posibles ataques de patógenos, es la producción de enzimas líticas. Estas enzimas pueden inducir la lisis de la pared celular de hongos patógenos a través de la degradación de quitina o celulosa (Gamalero & Glick, 2011). La determinación de la hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) en nuestras cepas, se realizó con la prueba desarrollada por Teather & Wood (1982). Para hacer esta prueba se inocularon las cepas en discos de papel filtro (0.5 cm  $\varnothing$ ) sobre cajas de Petri con medio Mandels, el cual contiene por cada litro: 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.4 g de  $\text{CaCl}_2$ , 5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3g de Urea, 0.3g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.6 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.4 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg de  $\text{CoCl}_2$ , 1 g Tween 80, 25 g de peptona, 1 g de CMC y 12g de agar; las cajas fueron incubadas a 28°C hasta observar crecimiento radial. La hidrólisis se determinó con dos parámetros, el crecimiento radial y la presencia de un halo de hidrólisis. La presencia de dicho halo se evaluó usando rojo Congo, el cual es un colorante que interactúa con los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos de la CMC de tal modo que funciona como un revelador del halo de hidrólisis. Después de observar crecimiento de las cepas en las placas, éstas fueron inundadas con una solución de rojo Congo (1mg/mL) durante 15 minutos para detectar el halo de hidrólisis.

### *Solubilización de fosfatos*

El fósforo es uno de los macronutrientes utilizados por las plantas, pero de disponibilidad restringida debido a la facilidad con la que es atrapado durante la formación de distintos compuestos fosfatados (Rodríguez & Fraga, 1999). Dentro de los

mecanismos que tienen las BPCV se encuentra la solubilización de fosfatos, mediante el cual dichas bacterias hacen al fósforo disponible para las plantas. Debido a esto, decidimos evaluar nuestras cepas para determinar su capacidad de solubilizar fosfatos. La detección de fosfato disponible se realizó con el método colorimétrico desarrollado por Nautiyal (1999). Las cepas fueron inoculadas en medio líquido NBRIP (glucosa al 1%,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  al 0.5%,  $\text{MgCl}_2$  al 0.5%, KCl al 0.02%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 0.025% y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 0.01%), e incubadas a 28°C y 180 rpm durante 15 días. Posteriormente se tomó una alícuota de cada uno de los cultivos que se hizo reaccionar con una solución 1:1 (v/v) de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (Molibdato de Amonio) 5% y  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  (Vanadato de Amonio) 0.25%. La reacción colorimétrica fue analizada en un espectrofotómetro a una longitud de 420 nm para registrar la densidad óptica. Finalmente, con ayuda de curva de calibración con concentraciones conocidas de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  se calculó el contenido de fósforo disponible (Apéndice B).

#### *Producción de ácido indolacético*

Las auxinas, como el ácido indolacético (IAA), son fitohormonas de origen vegetal o bacteriano, que intervienen en la regulación de procesos como el crecimiento, fototropismo y fenología de las plantas, además de estar involucradas en la tolerancia a condiciones de estrés (Gamalero & Glick, 2011). Por lo tanto, sometimos a nuestras cepas a la prueba colorimétrica descrita por Gordon & Weber (1951), para determinar si eran capaces de producir IAA. Las cepas fueron inoculadas en medio líquido TSB 10% con 5 mM de L-triptófano, e incubadas en oscuridad a 28°C, a 150 rpm, durante 48 horas. Posteriormente una alícuota del medio donde creció cada cepa fue utilizada para realizar la reacción colorimétrica adicionando el reactivo de Salkowski (50 ml de  $\text{HClO}_4$

35% y 1 ml FeCl<sub>3</sub> 0.5 M) e incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos para poder observar el cambio de coloración de rosa a rojo, lo que indica la presencia de IAA. Una alícuota de la reacción colorimétrica de cada cepa fue analizada en un espectrofotómetro a una longitud de 530 nm para registrar la densidad óptica. Para calcular la cantidad de IAA presente se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de IAA comercial (Apéndice C).

## **5.8 Inoculación de cepas promotoras del crecimiento vegetal en plantas de *A.***

### ***tequilana***

Con el objetivo de determinar el efecto de las 11 cepas bacterianas que fueron positivas en el ensayo de reducción de acetileno y caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal, sobre plantas de *A. tequilana*, dichas cepas se inocularon de forma individual y en consorcio a nivel de campo. Se realizó la inoculación de las 11 bacterias aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana*, en plantas de *A. tequilana* con dos años de crecimiento, ubicadas en un predio de cultivo de la empresa Tequilera Real de Pénjamo, Pénjamo, Guanajuato.

#### **5.8.1 Establecimiento de los tratamientos**

Los tratamientos establecidos fueron 24: 11 inoculaciones con cepas individuales, 11 inoculaciones en consorcio, un control con fertilización nitrogenada convencional y un control absoluto (Tabla 5.2). Las cepas (individualmente o en consorcio) se aplicaron directamente en suelo en la zona radical, con excepción de la cepa MJ22 aislada de filósfera, la cual fue aplicada en la zona foliar con ayuda de una bomba de aspersion. De cada inóculo bacteriano se aplicaron 125 mL/planta a OD<sub>600nm</sub>=0.75. En el caso del

tratamiento bajo fertilización nitrogenada convencional se aplicaron 150 g/planta de Urea comercial granulada (Nitrógeno 45%).

El predio utilizado fue de 5000 m<sup>2</sup> con un total de 1200 plantas, dicho predio fue dividido en pequeñas parcelas experimentales con 25 plantas cada una. Los tratamientos fueron aplicados en dos parcelas cada uno, las cuales estaban ubicadas aleatoriamente a lo largo del predio, teniendo un total de 50 plantas para cada tratamiento. La aplicación de los diferentes tratamientos se realizó aproximadamente cuatro meses después (Agosto 2014) del desdoblamiento foliar (Abril 2014), el cual es un indicador de crecimiento en las plantas de agave y se da de forma anual.

### **5.8.2 Colecta y proceso de las muestras**

El muestreo de las plantas se llevó a cabo ocho meses posteriores a la inoculación (abril 2015), cuando se presentó nuevamente el desdoblamiento foliar. Se colectaron tres hojas por planta en cada tratamiento (10 plantas/tratamiento), el tejido se deshidrató en estufa a 60°C durante 72 horas, posteriormente fue triturado en un molino mezclador (MM 200 Retsch) hasta obtener un polvo fino y fue almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

### **5.8.3 Análisis de huella metabólica**

Los metabolitos en sus diferentes concentraciones, son un reflejo del estado fisiológico de un organismo en un ambiente específico bajo condiciones definidas (Maier *et al.*, 2010). Considerando lo anterior y que las técnicas metabolómicas, específicamente el análisis de huella metabólica, pueden proporcionar un panorama de la variabilidad entre muestras biológicas expuestas a diferentes condiciones bióticas o abióticas (Maier *et*

*al.*, 2010), decidimos evaluar los perfiles metabólicos de las plantas de *A. tequilana* sometidas a la inoculación de 11 cepas bacterianas y la fertilización convencional (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Tratamientos establecidos con la inoculación de cepas y consorcios bacterianos en plantas de *A. tequilana* en campo.

Tratamientos	Cepas bacterianas inoculadas	Origen de las cepas	
		Especie	Comunidad
1	MJ04	<i>A. tequilana</i>	Endósfera de raíz
2	MJ05	<i>A. tequilana</i>	Endósfera de raíz
3	MJ08	<i>A. tequilana</i>	Rizósfera
4	MJ09	<i>A. tequilana</i>	Rizósfera
5	MJ11	<i>A. salmiana</i>	Rizósfera
6	MJ12	<i>A. salmiana</i>	Rizósfera
7	MJ14	<i>A. salmiana</i>	Rizósfera
8	MJ17	<i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz
9	MJ18	<i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz
10	MJ19	<i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz
11	MJ22	<i>A. salmiana</i>	Filósfera
12	MJ08+MJ09	<i>A. tequilana</i>	Rizósfera
13	MJ04+MJ05	<i>A. tequilana</i>	Endósfera de raíz
14	MJ04+MJ05+MJ08+MJ09	<i>A. tequilana</i>	Endósfera de raíz+Rizósfera
15	MJ11+MJ12+MJ14	<i>A. salmiana</i>	Rizósfera
16	MJ17+MJ18+MJ19	<i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz
17	MJ11+MJ12+MJ14+MJ17+MJ18+MJ19+MJ22	<i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz+Rizósfera
18	MJ04+MJ05+MJ17+MJ18+MJ19	<i>A. tequilana</i> + <i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz
19	MJ08+MJ09+MJ11+MJ12+MJ14	<i>A. tequilana</i> + <i>A. salmiana</i>	Rizósfera
20	MJ04+MJ05+MJ17+MJ18+MJ19+MJ22	<i>A. tequilana</i> + <i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz+Filósfera
21	MJ08+MJ09+MJ11+MJ12+MJ14+MJ22	<i>A. tequilana</i> + <i>A. salmiana</i>	Rizósfera+Filósfera
22	MJ04+MJ05+MJ08+MJ09+MJ11+MJ12+MJ14+MJ17+MJ18+MJ19+MJ22	<i>A. tequilana</i> + <i>A. salmiana</i>	Endósfera de raíz+Rizósfera+Filósfera
23	UREA (Nitrógeno 45%)	-	-
24	Control	-	-

A partir del tejido de las plantas colectadas de los 24 tratamientos establecidos (Tabla 5.2), se tomaron 150 mg de tejido vegetal seco y molido para realizar extractos crudos por triplicado de cada tratamiento. El tejido se colocó en un tubo de cristal y se adicionaron 500  $\mu$ L de etanol grado HPLC 90%, los tubos fueron sonicados durante 20 minutos. El contenido de los tubos de cristal fue transferido a tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad y fueron centrifugados a 5000 rpm durante tres minutos para decantar el tejido y recuperar el sobrenadante (extracto crudo). Se realizó una dilución 1:100 del extracto crudo con etanol grado HPLC 90%, la dilución fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.2  $\mu$ m. Los extractos y las diluciones fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La espectrometría de masas de las diluciones de los extractos crudos se realizó con una trampa de iones SQ Detector 2, equipada con una interface de ionización por electroaspersión (ESI) (Waters Corporation, MA, EUA). Los parámetros de la ESI fueron los siguientes: voltaje de capilar 3 V, cono 30 V y temperatura de desolvatación  $250^{\circ}\text{C}$ . La trampa de iones del espectrómetro de masas se operó en modo negativo y positivo adquiriendo  $m/z$  de 100 a 1400. Se tomaron 100  $\mu$ L de cada uno de las muestras para ser inyectados de forma automática en el equipo a un flujo de 10  $\mu$ L/min.

Los datos obtenidos de la espectrometría de masas fueron analizados en colaboración con el Dr. Robert Winkler titular del Laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental (CINVESTAV, Unidad Irapuato). Para realizar el análisis de los datos, éstos fueron convertidos y alineados con ayuda de los programas MS Convert y TOPPAS (Junker *et al.*, 2012). Finalmente el análisis estadístico se realizó con los espectros obtenidos de la ionización positiva, debido a que la detección de metabolitos

con la ionización negativa es casi nula. Para detectar las diferencias entre los tratamientos evaluados se realizó un análisis de agrupamiento a través de un *heatmap*.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Capítulo 1: Composición y diversidad de las comunidades microbianas asociadas con *Agave*

---

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados como parte de:

Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriales JJ & Partida-Martínez LP (2014). **Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species.** *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857.

Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-García C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez LP & Tringe SG (2016). **Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species.** *New Phytologist* 209: 798-811.

### 6.1.1 Composición de las comunidades microbianas asociadas con agaves silvestres y cultivados

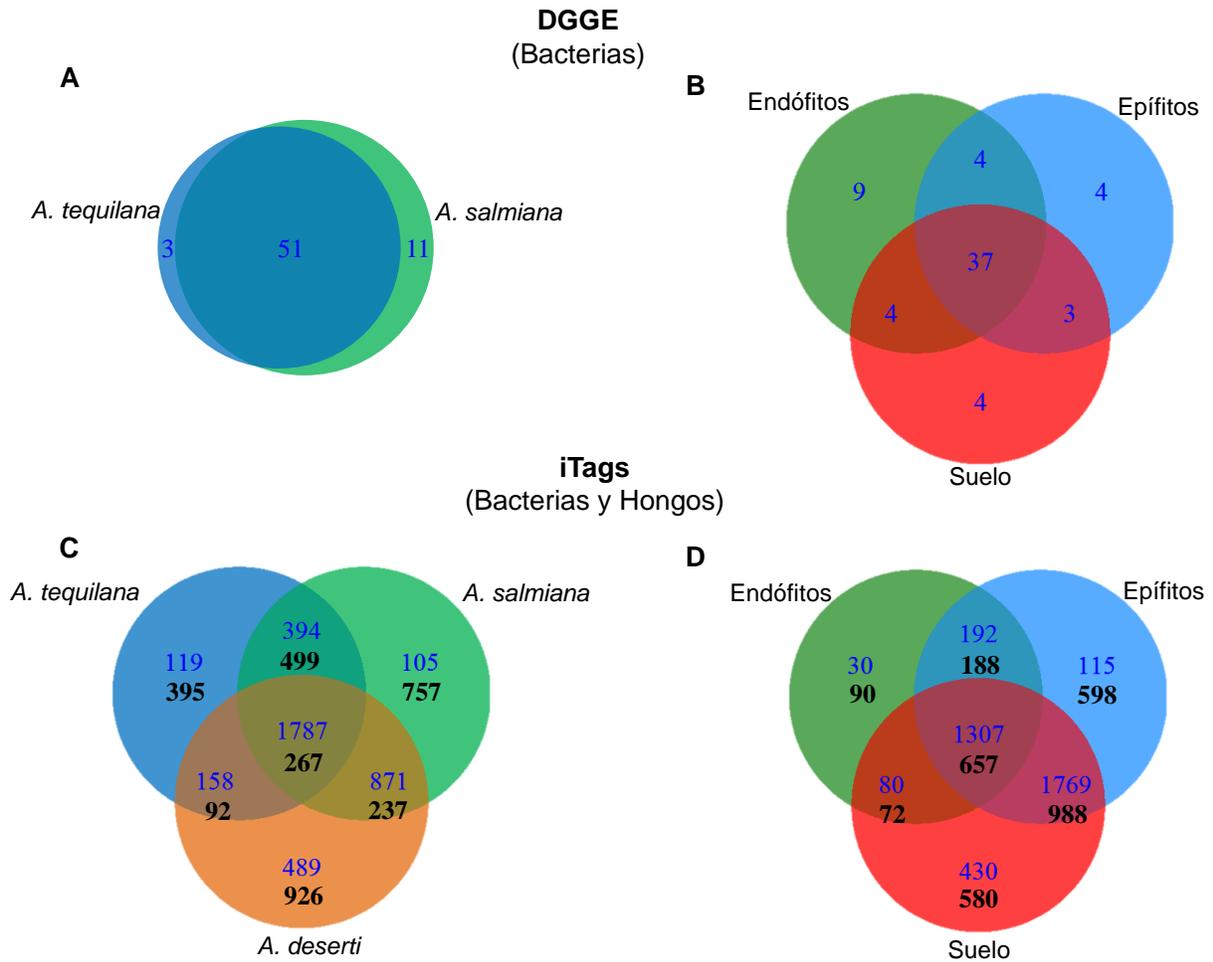
A partir de nuestro análisis de DGGE de las comunidades bacterianas detectamos 1097 bandas, las cuales fueron agrupadas en 65 OTUs a nivel de orden/familia (seis *phyla*), de los cuales 51 estuvieron presentes tanto en *A. tequilana* como en *A. salmiana*, es decir el 78.5% de los taxones bacterianos detectados se compartió entre estas dos especies de *Agave* (Fig. 6.1A). Dentro de los OTUs específicos de cada uno de los agaves, observamos que sólo tres fueron exclusivos de *A. tequilana* y once de *A. salmiana* (Fig. 6.1A, Apéndice D). De los 65 OTUs bacterianos detectados, 37 estuvieron presentes en los seis compartimentos analizados (suelo: suelo, suelo asociado a raíz; epísfera: rizósfera, filósfera; endósfera: endófitos de raíz y hoja) mientras que nueve fueron exclusivos de la endósfera, cuatro de las comunidades epífitas y cuatro de las comunidades de suelo (Fig. 6.1B, Apéndice D).

Por otro lado, con el análisis de iTags de las comunidades procariontes y fúngicas se obtuvieron 35,770,987 y 27,596,665 lecturas bacterianas y fúngicas, respectivamente. Después de aplicar los criterios de reproducibilidad técnica (Apartado 5.4.2), estas lecturas fueron agrupadas en 3,923 OTUs procariontes (33 *phyla*) y 3,173 OTUs fúngicos (seis *phyla*). De estos, 1,787 OTUs procariontes y 267 OTUs fúngicos estuvieron compartidos entre *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti*, es decir el 56% y 7%, respectivamente (Fig. 6.1C). También observamos que entre *A. salmiana* y *A. deserti*, las dos especies silvestres, se compartió el 22% de los OTUs procariontes (871 OTUs), mientras que entre *A. salmiana* y *A. tequilana*, la especie cultivada, se compartió únicamente el 10% de los OTUs (394 OTUs). En contraste, el 16% de los OTUs fúngicos (499 OTUs) estuvieron compartidos entre *A. tequilana* y *A. salmiana* (las

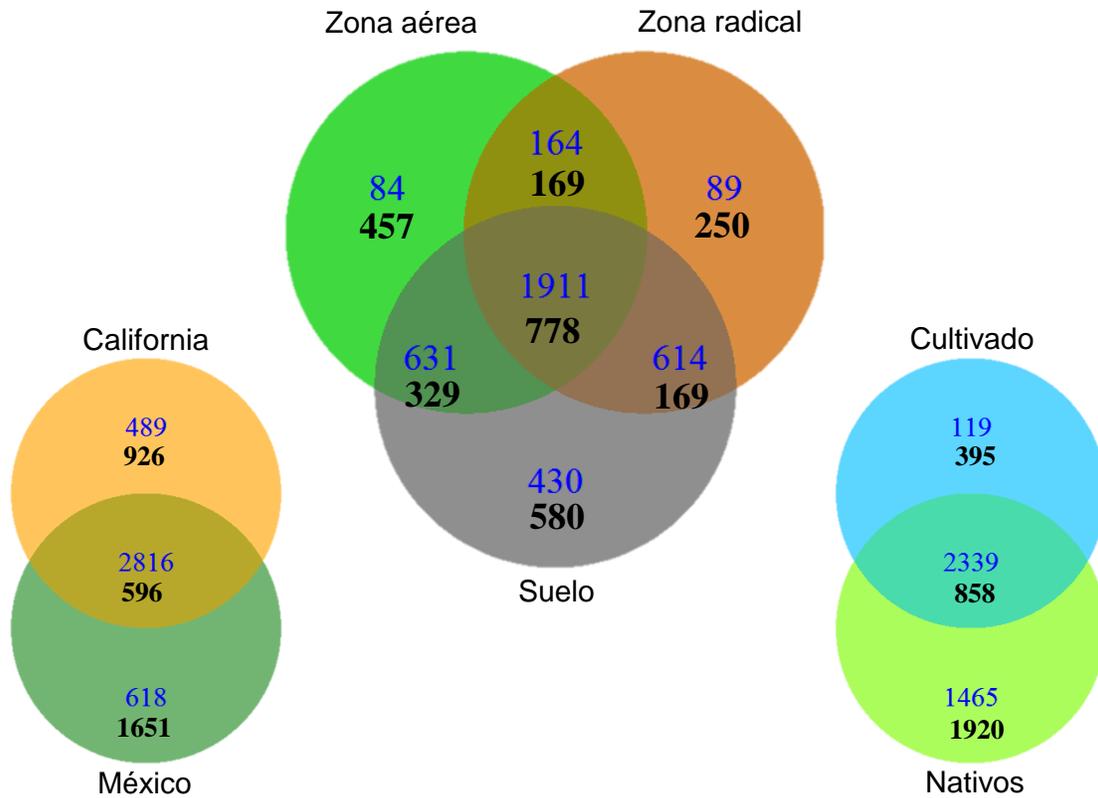
especies colectadas en México), mientras que sólo el 7.5% de los OTUs fúngicos (237 OTUs) estuvieron compartidos entre las especies silvestres, *A. salmiana* y *A. deserti*, (esta última colectada en California) (Fig. 6.1C).

La mayoría de los OTUs procariontes y fúngicos que se encontraron en las muestras de endósfera (hoja y raíz) estuvieron presentes también en la rizósfera, filósfera y el suelo circundante (Fig. 6.1D). Del mismo modo, observamos que la mayoría de los OTUs asociados con la parte aérea de la planta, se encontraron también en la zona radical y en las muestras de suelo. No obstante, en la parte aérea de la planta se observó una proporción mayor de OTUs fúngicos (16.8%) específicos de este compartimento en comparación con los bacterianos (2.2%) (Fig. 6.2). Particularmente, notamos que el porcentaje de OTUs procariontes compartidos entre los sitios de muestreo de México y California fue de 72.2%, mientras que el porcentaje de OTUs fúngicos fue 18.2% (Fig. 6.2). Este patrón fue consistente con el número de OTUs compartidos entre las especies de *Agave* en cada de una de las comunidades estudiadas (Fig. 6.3). Observamos que en las seis comunidades el porcentaje de OTUs procariontes compartido entre los tres agaves (suelo=63%, suelo asociado a raíz=64%, rizósfera=53%, filósfera=60%, endósfera raíz=29%, endósfera hoja=10%) fue al menos tres veces mayor que el porcentaje de OTUs fúngicos (suelo=10%, suelo asociado a raíz=14%, rizósfera=7%, filósfera=19%, endósfera raíz=7%, endósfera hoja=2%) (Fig. 6.3). Estos resultados muestran que, a diferencia de las comunidades procariontes, la distancia geográfica parece tener un efecto sobre las comunidades fúngicas asociadas con agaves. Adicionalmente, observamos que tanto el porcentaje de los OTUs procariontes y fúngicos compartido entre los tres agaves fue menor en las comunidades asociadas internamente (Endósfera hoja y raíz, *Archaea/Bacteria*= 10-29%, Hongos= 2-

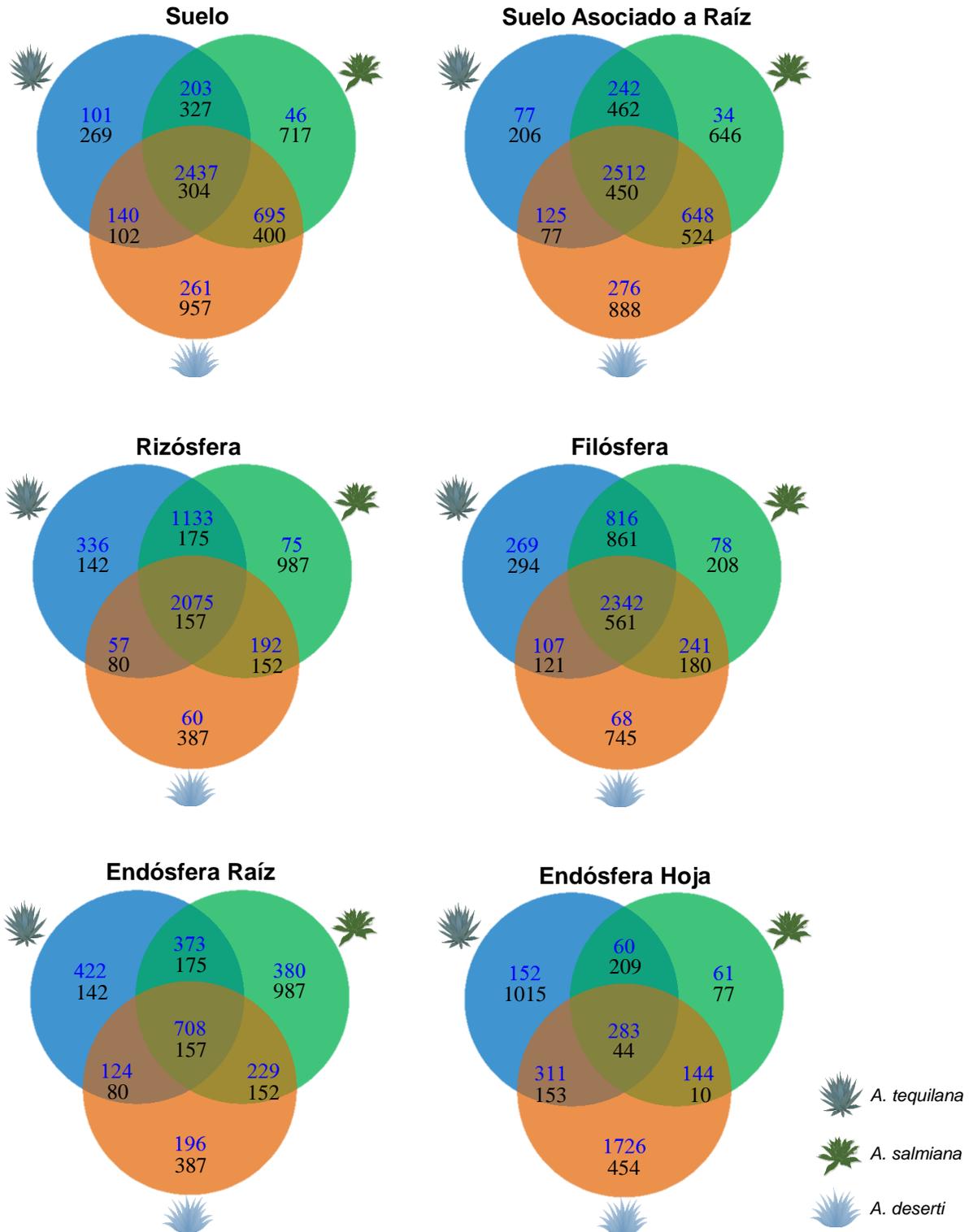
7%) en comparación con aquellas asociadas de forma externa (suelo, suelo asociado a raíz, rizósfera y filósfera; *Archaea/Bacteria*= 53-64%, Hongos= 7-19%)



**Figura 6.1** Diagramas de Venn de los OTUs compartidos entre las especies de *Agave* y los grupos de muestras analizados con DGGE (A-B) y secuenciación etiquetada (C-D, *Archaea/Bacteria*: azul, *Fungi*: negro).



**Figura 6.2** Diagramas de Venn de los OTUs compartidos entre la partes aérea y radical de la planta con el suelo, entre las muestras colectadas en México y California y los OTUs compartidos entre los agaves silvestres y el agave cultivado. *Archaea/Bacterias*: azul, *Fungi*: negro.

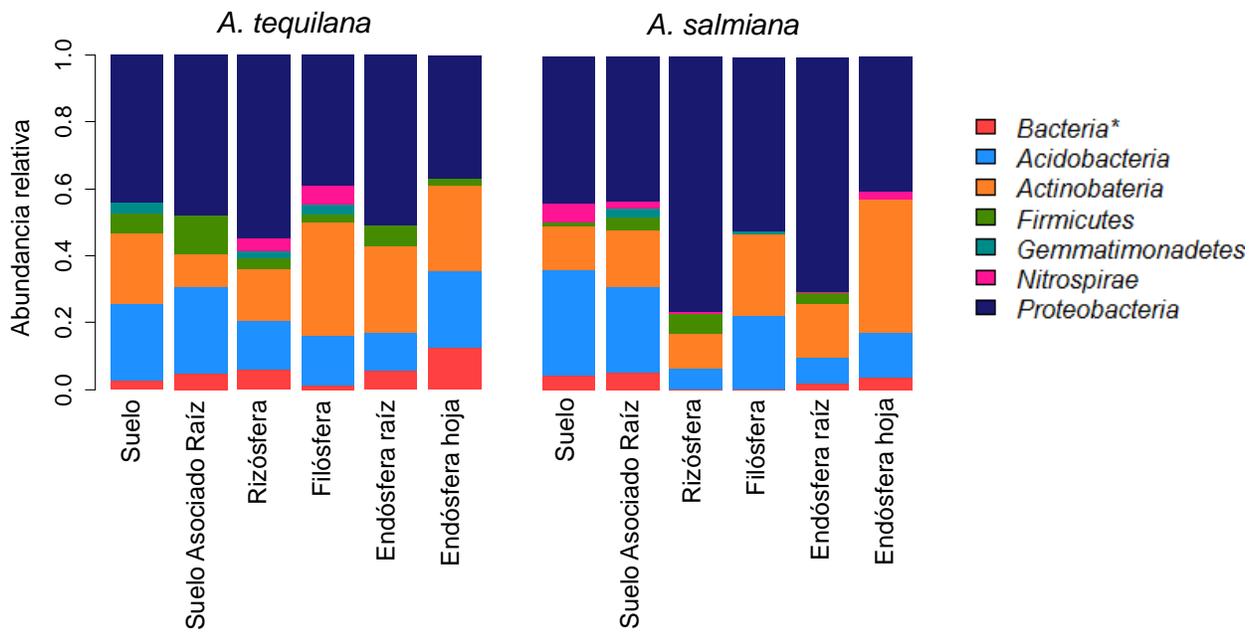


**Figura 6.3** Diagramas de Venn de los OTUs compartidos entre las tres especies de *Agave* en las seis comunidades analizadas. *Archaea/Bacteria*: azul, *Fungi*: negro.

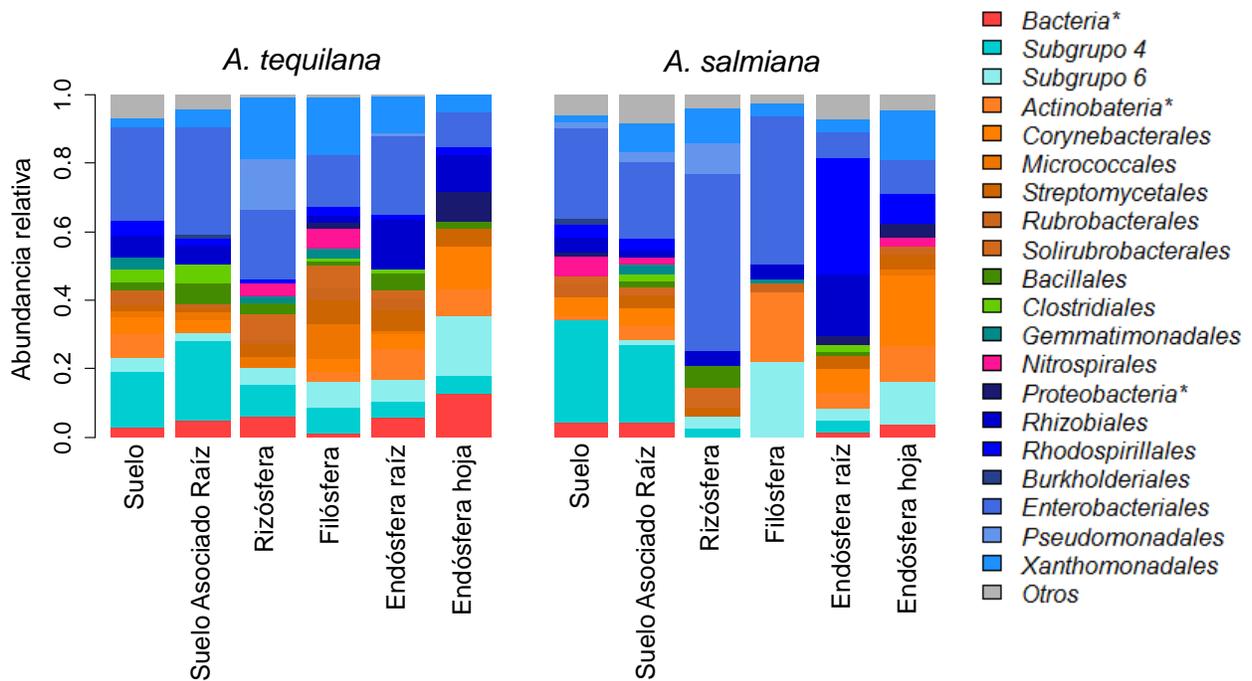
En el caso de las comunidades procariontes, a pesar de las diferencias en la resolución (OTUs y *phyla* detectados) entre DGGE y iTags, los *phyla Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (este último no detectado con DGGE) fueron determinados como dominantes, ya que constituyeron más del 80% de la abundancia relativa de las comunidades directamente asociadas (rizósfera, filósfera, endósfera raíz y hoja) con las tres especies de *Agave* (Figs. 6.4-6.7). En comparación con las comunidades provenientes del suelo, las comunidades asociadas directamente con los agaves, estuvieron enriquecidas con miembros de los *phylum Proteobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2= 50.84$ ,  $p$ menos de  $1.00 \times 10^{-12}$ ) y *Actinobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2= 11.07$ ,  $p$ menos de  $8.790 \times 10^{-4}$ ), mientras que hubo una disminución de *Acidobacteria* (Kruskal-Wallis  $X^2= 125.51$ ,  $p$ menos de  $2.20 \times 10^{-16}$ ) (Figs. 6.4-6.7). Lo anterior es consistente con lo se ha encontrado en otras plantas como *Arabidopsis thaliana* (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Shakya *et al.*, 2013).

Las seis comunidades fúngicas analizadas estuvieron dominadas por el *phylum Ascomycota* (92.1% de la abundancia relativa total en promedio), mientras que el *phylum Basidiomycota* estuvo presente en una menor proporción (7.7%) (Fig. 6.8-6.9). Llamó nuestra atención que los OTUs del *phylum Glomeromycota* (hongos micorrízico arbusculares), fueron detectados en una proporción baja: únicamente 36 OTUs, es decir el 1.1% de la abundancia relativa total. Los OTUs micorrízicos detectados fueron miembros de los géneros *Entrophospora* y *Glomus* y se encontraron asociados principalmente con los agaves silvestres, *A. salmiana* y *A. deserti*, respectivamente (Kruskal-Wallis  $X^2= 23.79$ ,  $p$ menos de  $1.01 \times 10^{-6}$ ). Los taxones micorrízicos estuvieron virtualmente ausentes de todas las comunidades fúngicas asociadas con *A. tequilana*.

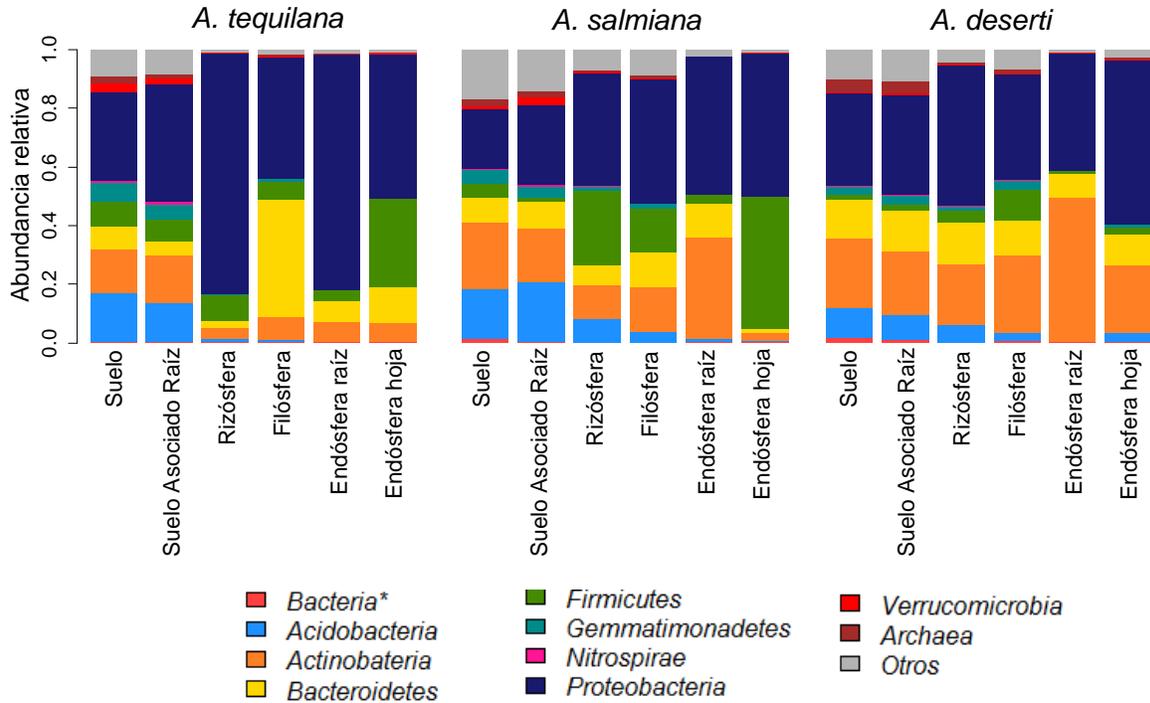
Se observaron diferencias entre los patrones de abundancia tanto de las comunidades procariontes como de las fúngicas entre las tres especies de *Agave*. En general, observamos que los patrones de abundancia relativa de los OTUs en las comunidades provenientes de suelo y suelo asociado a raíz fueron similares entre sí (*A. tequilana*: Kruskal-Wallis  $X^2= 0.333$ ,  $p$ menos de 0.5637; *A. salmiana*: Kruskal-Wallis  $X^2= 0.034$ ,  $p$ menos de 0.8535; *A. deserti*: Kruskal-Wallis  $X^2= 0.064$ ,  $p$ menos de 0.8002;), mientras que la composición de las comunidades epífitas y endófitas fueron diferentes entre ellas (*A. tequilana*: Kruskal-Wallis  $X^2= 7.58$ ,  $p$ menos de 0.05; *A. salmiana*: Kruskal-Wallis  $X^2= 18.39$ ,  $p$ menos de  $3.66 \times 10^{-4}$ ; *A. deserti*: Kruskal-Wallis  $X^2= 39.58$ ,  $p$ menos de  $1.088 \times 10^{-8}$ ; ) (Figs. 6.4-6.7). En contraste, los patrones de abundancia relativa entre las diferentes comunidades fúngicas presentaron variaciones más graduales entre los diferentes compartimentos analizados (Fig. 6.8-6.9). No obstante, observamos que tanto en *A. tequilana* como en *A. deserti*, la abundancia relativa de los órdenes fúngicos *Pleosporales* (Clase *Dothidiomycetes*) y *Eurotiales* (Clase *Euroiomycetes*) disminuyó e incrementó, respectivamente, en la transición entre las muestras de suelo y la endósfera de raíz. Sin embargo, en *A. salmiana* la abundancia relativa de ambos grupos taxonómicos fue estable entre dichos tipos de muestra. Por el contrario, el orden *Capnodiales* (Clase *Dothidiomycetes*) representó una parte significativa del microbioma de la parte aérea de los agaves colectados en México, sin embargo dicho orden estuvo prácticamente ausente en los diferentes tipos de muestra en *A. deserti* (Kruskal-Wallis  $X^2= 28.64$ ,  $p$ menos de  $8.70 \times 10^{-7}$ ). Del mismo modo, el orden *Bacillales* que constituyó más de 20% de la endósfera de hoja en los dos agaves mexicanos, representó menos del 5% en la endósfera de hoja de *A. deserti* (Kruskal-Wallis  $X^2= 12.65$ ,  $p$ menos de  $3.77 \times 10^{-4}$ ).



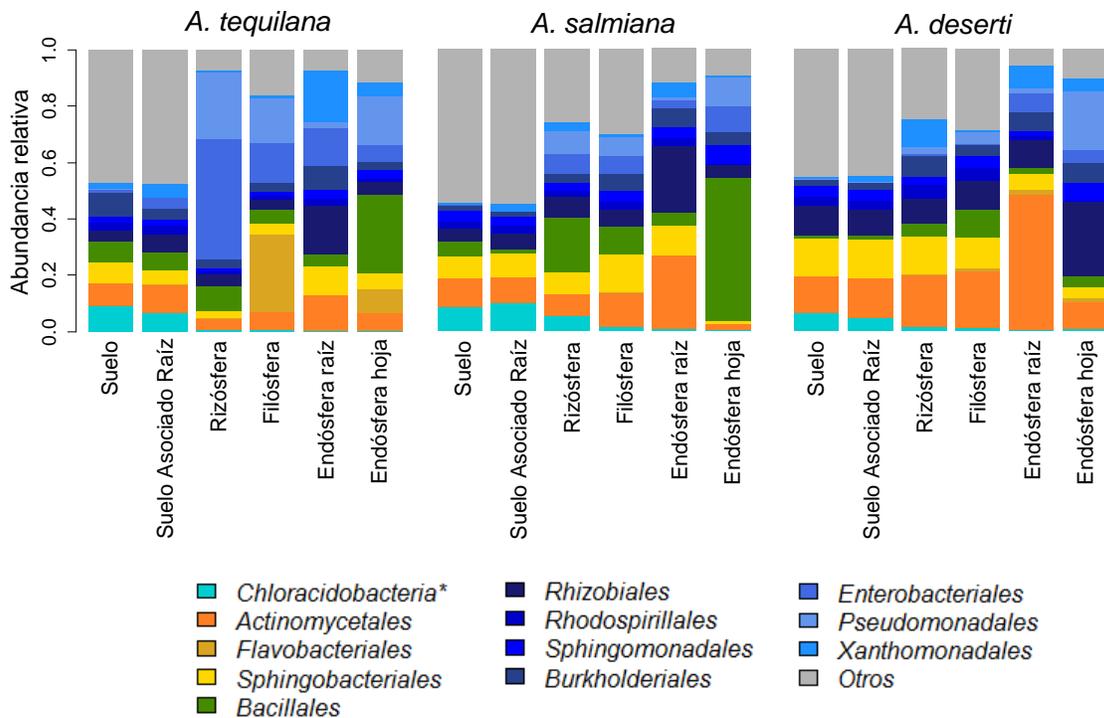
**Figura 6.4** Abundancia relativa a nivel de *phylum* de los taxones bacterianos detectados con DGGE en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de *phylum*.



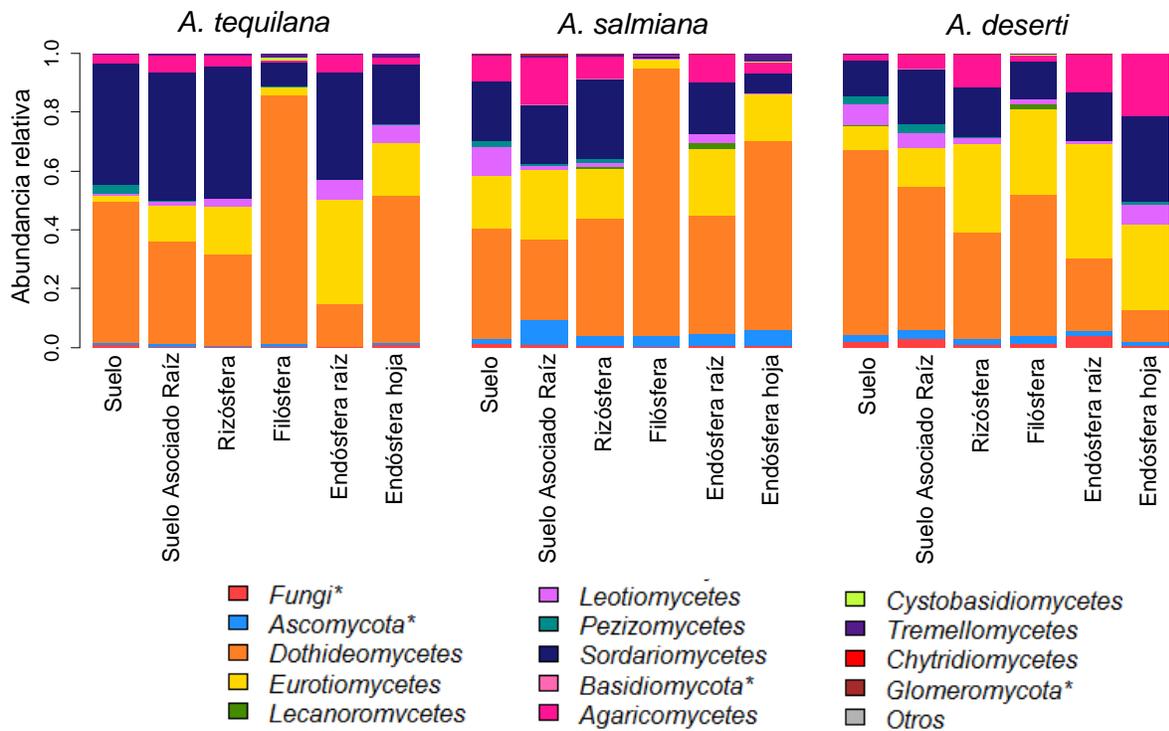
**Figura 6.5** Abundancia relativa a nivel de orden de los taxones bacterianos detectados con DGGE en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de orden.



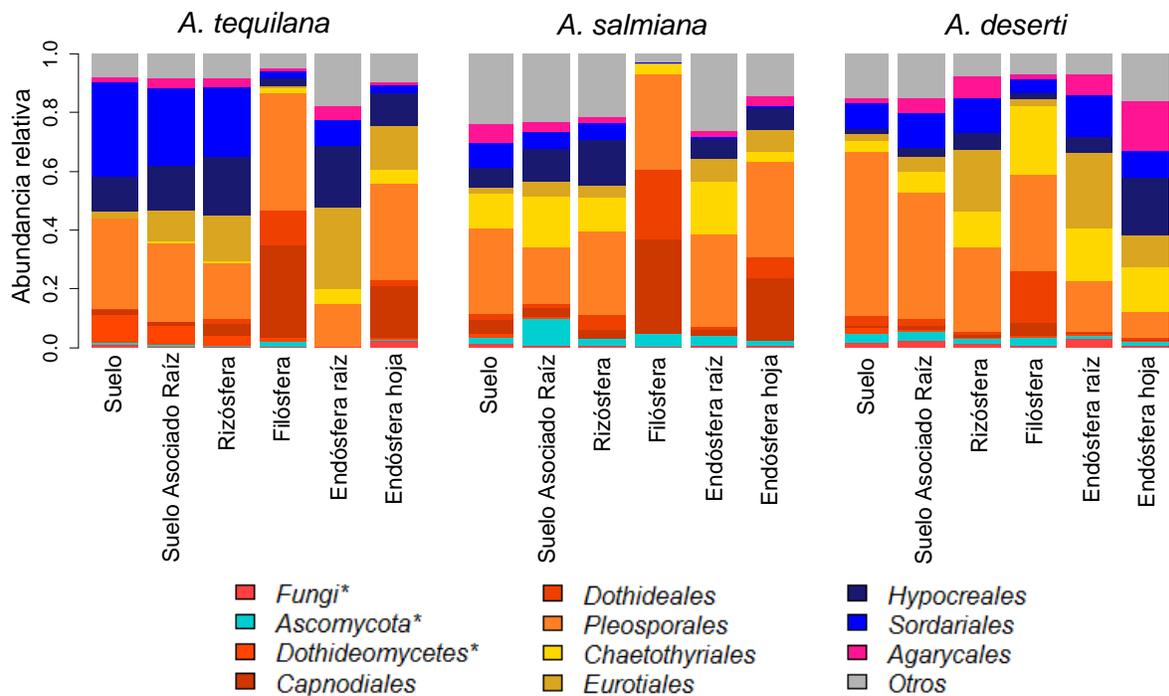
**Figura 6.6** Abundancia relativa a nivel de *phylum* de los taxones bacterianos detectados con iTags en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. deserti*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de *phylum*.



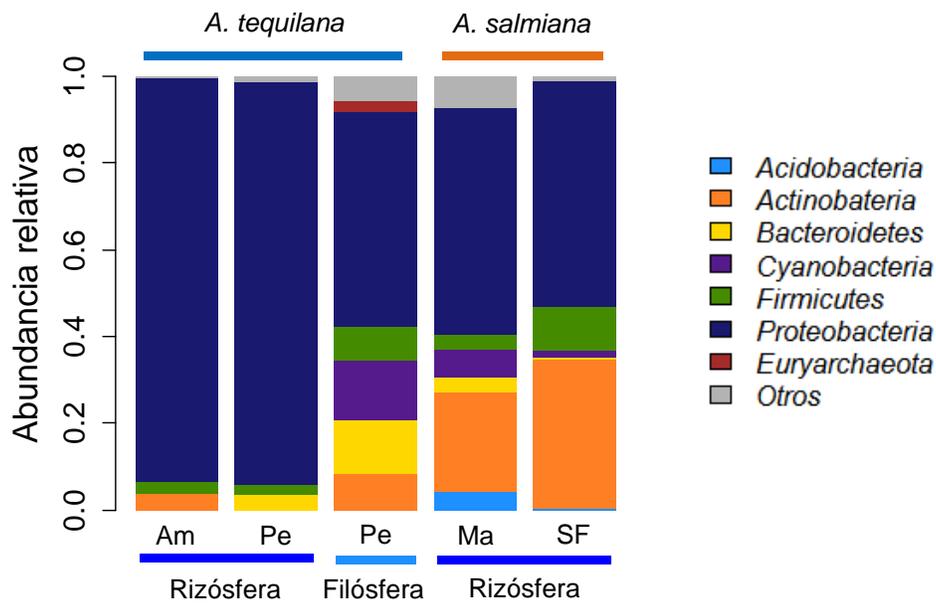
**Figura 6.7** Abundancia relativa a nivel de orden de los taxones bacterianos detectados con iTags en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. deserti*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de orden.



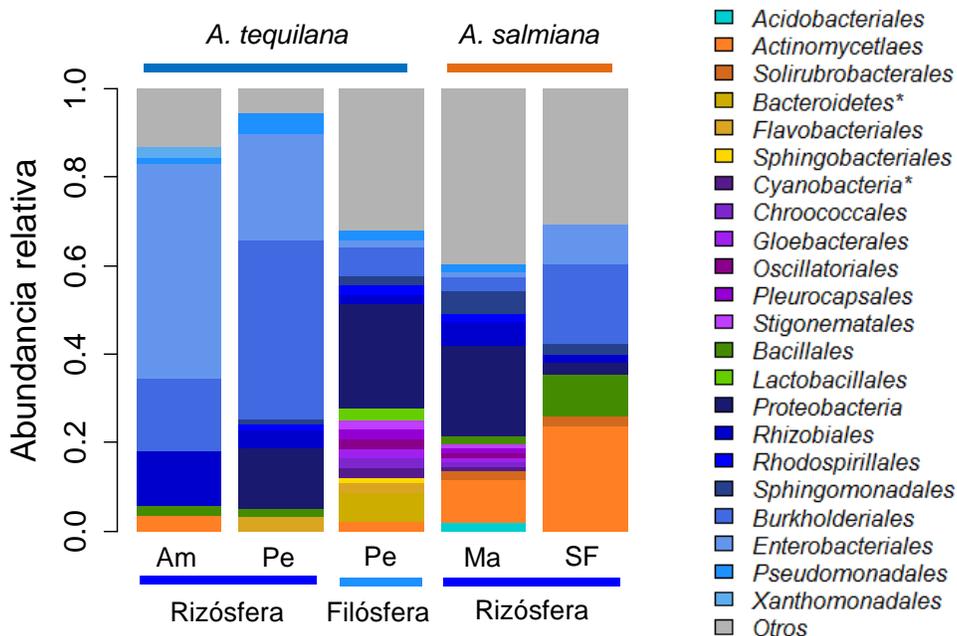
**Figura 6.8** Abundancia relativa a nivel de clase de los taxones fúngicos detectados con iTags en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. deserti*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de *phylum*.



**Figura 6.9** Abundancia relativa a nivel de orden de los taxones fúngicos detectados con iTags en las seis comunidades asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. deserti*. Los taxones marcados con asterisco no fueron identificados hasta nivel de orden.



**Figura 6.10** Abundancia relativa a nivel de *phylum* de los taxones bacterianos detectados en el análisis metagenómico de las comunidades de rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Los taxones marcados con asterisco no fueron determinados hasta nivel de *phylum*.



**Figura 6.11** Abundancia relativa a nivel de orden de los taxones bacterianos detectados en el análisis metagenómico de las comunidades de rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Los taxones marcados con asterisco no fueron determinados hasta nivel de orden.

La comunidad procarionte de la rizósfera de *A. tequilana*, el agave cultivado, estuvo enriquecida por los órdenes *Pseudomonadales* (Kruskal-Wallis  $\chi^2= 6.61$ ,  $p$ menos de  $9.97 \times 10^{-3}$ ) y *Enterobacteriales* (Kruskal-Wallis  $\chi^2= 21.37$ ,  $p$ menos de  $3.79 \times 10^{-6}$ ), en comparación con las rizósferas de los agaves silvestres (Fig. 6.7). En conjunto, los órdenes *Pseudomonadales* y *Enterobacteriales* representaron el 92% en una muestra de la rizósfera de *A. tequilana*, en promedio dichos órdenes representaron el 66% de la rizósfera de este agave (Fig. 6.7). Estos resultados fueron consistentes con el análisis preliminar de los metagenomas de rizósfera de *A. tequilana*, donde el *phylum Proteobacteria* representó más del 95% (Fig. 6.10) y el orden *Enterobacteriales* conformó 24-49% de la abundancia relativa de dicha comunidad (Fig. 6.11). Los órdenes más abundantes en las rizósferas de *A. salmiana* y *A. deserti* fueron *Actinomycetales* y *Bacillales*, respectivamente, y representaron en promedio sólo el 14% y 10% de las rizósferas silvestres. A diferencia de la rizósfera de *A. tequilana*, las rizósferas de los agaves silvestres, del mismo modo que en análisis metagenómico (Figs. 6.10-6.11, Apéndice E), mostraron una mayor riqueza (Figs. 6.4- 6.7, Apéndice E). Además de las similitudes mencionadas, con el análisis preliminar de los metagenomas se detectó una presencia mayor del *phylum Cyanobacteria* en la rizósfera de *A. salmiana* (más de 6%) y la rizósfera de *A. tequilana* (más de 10%) (Figs. 6.10-6.11), en comparación con lo detectado con el análisis de iTags (menos de 0.5%) (Figs. 6.4- 6.7). Los órdenes de *Cyanobacteria* detectados con el análisis metagenómico fueron: *Chroococcales*, *Gloeobacterales*, *Oscillatoriales*, *Pleurocapsales* y *Stigonematales*, mientras que los detectados con el análisis de iTags fueron: *mle1\_12*, *SM1D11*, *Nostocales*, *Chroococcales*, *Oscillatoriales* y *Pseudanabaenales*.

Las comunidades procariontes asociadas al suelo fueron similares entre los distintos sitios de muestreo, y los órdenes *Enterobacteriales* y *Pseudomonadales*, que fueron abundantes en la rizósfera, representaron menos de 1% en las comunidades de suelo de todos los agaves. Particularmente, llamó nuestra atención que en el caso de la filósfera de *A. tequilana*, los órdenes *Pseudomonadales*, *Enterobacteriales* y *Flavobacteriales* representaron una parte importante de la abundancia constituyendo en promedio el 58% de esta comunidad en el agave cultivado. La abundancia de estos pocos linajes bacterianos en la rizósfera y filósfera de *A. tequilana* es consecuencia de la baja presencia de otros órdenes como *Pirellulales*, *Solibacterales*, *Acidimicrobiales* y *Rhizobiales* en estas comunidades. Contrariamente, dichos órdenes resultaron ser significativamente más abundantes en las rizósferas silvestres: *Pirellulales* (Kruskal-Wallis  $X^2= 8.19$ ,  $p$ menos de  $4.20 \times 10^{-3}$ ); *Solibacterales* (Kruskal-Wallis  $X^2= 8.23$ ,  $p$ menos de  $4.05 \times 10^{-3}$ ); *Acidimicrobiales* (Kruskal-Wallis  $X^2= 12.85$ ,  $p$ menos de  $3.39 \times 10^{-4}$ ) y *Rhizobiales* (Kruskal-Wallis  $X^2= 13.25$ ,  $p$ menos de  $2.73 \times 10^{-4}$ ).

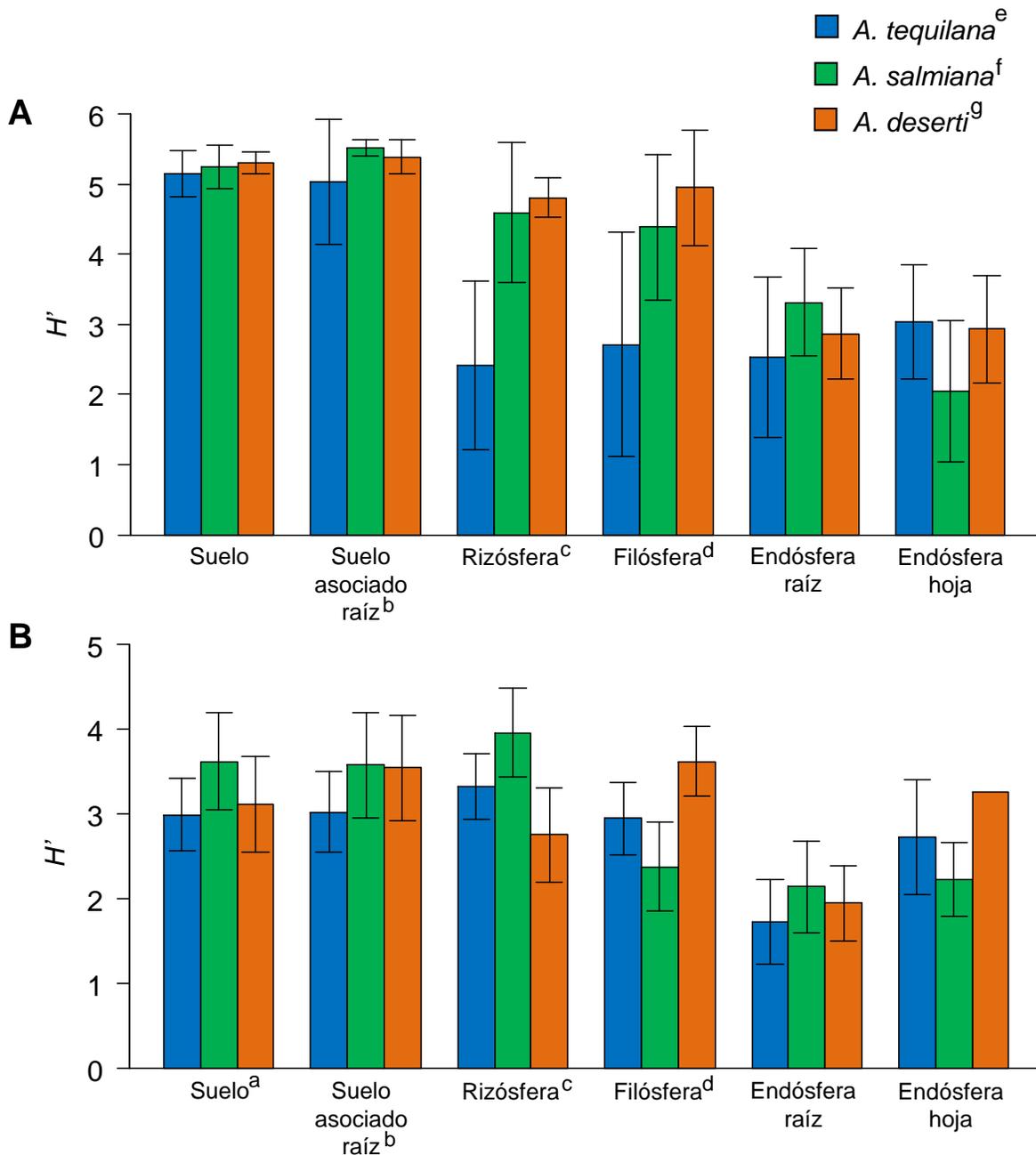
### **6.1.2 La diversidad microbiana es diferente entre los compartimentos de la planta y entre agaves silvestres y cultivados**

En general la diversidad de las comunidades microbianas, determinada por el índice de Shannon, estuvo afectada por el compartimento del que provenían y la especie de *Agave* con la que estuvieron asociadas. Los valores de Shannon fueron mayores en las muestras de suelo, seguidas por las muestras epífitas y endófitas (Fig. 6.12, Apéndice E). Tanto en las comunidades procariontes como en las fúngicas de las tres especies de *Agave*, la diversidad del suelo asociado a raíz fue ligeramente mayor que

en el suelo, lo que sugiere un posible efecto de los exudados radicales, u otros factores asociados a la planta, sobre el incremento de la diversidad microbiana local.

En el caso de las comunidades procariontes, encontramos que la rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana*, la especie cultivada, fueron menos diversas en comparación con aquellas asociadas con los agaves silvestres (Fig. 6.12A, Apéndice E). Esto fue consistente con los resultados obtenidos del análisis metagenómico (Figs. 6.10-1.11, Apéndice E), donde observamos que el índice de Shannon estimado para la rizósfera del agave nativo *A. salmiana*, fue hasta dos veces mayor ( $H' = 3.485-4.681$ , Apéndice E) que los valores del mismo índice para la rizósfera asociada con la especie cultivada *A. tequilana* ( $H' = 2.153-2.714$ , Apéndice E). Nuestros resultados sugieren una reducción de la diversidad natural epífita de *Archaea/Bacteria* en *A. tequilana* en comparación con los agaves silvestres. Esta pérdida de diversidad estuvo explicada directamente por la abundancia relativa de algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente el género *Leclercia* que representó hasta el 38% en las comunidades epífitas asociadas con *A. tequilana* mientras que en las comunidades epífitas de *A. salmiana* y *A. deserti* dicho género representó menos de 6% de la abundancia relativa. Finalmente, observamos que la diversidad microbiana en la filósfera de las tres especies de *Agave* fue casi tan alta como en la rizósfera (Fig. 6.11A-B, Apéndice E) o incluso mayor como lo mostraron los datos metagenómicos de dichas comunidades epífitas asociadas con *A. tequilana* (filósfera:  $H' = 4.694$ , rizósfera:  $H' = 2.153-2.714$ ; Apéndice E). Esto resulta interesante ya que las condiciones como contenido de humedad, exposición a la radiación solar, temperatura, entre otras son más severas en la parte aérea de la planta en comparación con la zona radical,

haciendo que ésta última resulte un ambiente más propicio para la proliferación de los microorganismos.



**Figura 6.12** Índice de Shannon ( $H'$ ), media  $\pm$  desviación estándar, de las comunidades procariontes (A) y fúngicas (B) asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti* detectadas con el análisis de iTags. Los superíndices a-d: diferencias significativas entre especies en el compartimento indicado de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (Apéndice E); e-g:

diferencias significativas entre compartimentos en la especie indicada de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (Apéndice E).

### **6.1.3 Discusión**

Los agaves son plantas adaptadas a ambientes pobres en nutrientes y con baja humedad, lo que los convierte en un recurso biótico importante en las zonas áridas y semiáridas. No obstante, es poco lo que se sabe acerca de las interacciones que estas plantas establecen con los microorganismos y como dichas interacciones pueden estar involucradas en la adecuación de las agaváceas a su ambiente.

Este trabajo es la primera aproximación que se realiza para conocer la composición de las comunidades microbianas (procariontes y hongos) asociadas de manera interna y externa con tres especies de *Agave*, una cultivada *A. tequilana* var. azul y dos silvestres: *A. salmiana* y *A. deserti*. La composición del microbioma de los agaves (*A. tequilana* y *A. salmiana*) fue evaluada inicialmente mediante un análisis de huella genética con DGGE de las comunidades bacterianas. Adicionalmente a este análisis, se realizó la secuenciación etiquetada (iTags) de las comunidades procariontes y fúngicas asociadas con las tres agaváceas antes mencionadas, los datos obtenidos de iTags nos proporcionaron una mayor resolución de la composición del microbioma de los agaves.

En general el porcentaje de OTUs procariontes (56%) compartidos entre los tres agaves fue mayor en comparación con el porcentaje de OTUs fúngicos (7%), lo que fue consistente al interior de cada una de las seis comunidades estudiadas. Particularmente observamos que el número de OTUs fúngicos compartidos entre las especies colectadas en México fue mayor con respecto a los que se compartieron con la especie colectada en California, lo que sugiere un posible efecto de la localización geográfica

sobre la composición de las comunidades fúngicas. Recientemente Talbot *et al.* (2014) encontraron que las comunidades fúngicas, así como las plantas y animales, son endémicas de *bioregiones* específicas; mencionando que de manera global, factores como la dispersión limitada o el clima pueden afectar el ensamble de las comunidades de hongos. Aunado a esto Meiser *et al.* (2013) observaron que en las comunidades fúngicas los taxones generalistas o aquellos distribuidos de forma global son poco comunes.

Con lo que respecta a las comunidades bacterianas, con el DGGE detectamos sólo seis *phyla* constituyendo dichas comunidades mientras que con el análisis de iTags se detectaron 33 *phyla* distintos (*Archaea/Bacteria*). A pesar de la diferencia en la resolución, se detectaron grupos bacterianos dominantes similares independientemente de la técnica utilizada. Esto sugiere que pese a las limitaciones propias del DGGE en comparación con la secuenciación masiva (Nocker *et al.*, 2007), esta técnica es útil para determinar los principales grupos que conforman las comunidades bacterianas asociadas con los agaves. De los 33 *phyla* detectados, las comunidades procariontes directamente asociadas con los tres agaves estuvieron dominadas por taxones de los *phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes*. Esto es consistente con lo que se ha observado previamente en otras plantas como *Arabidopsis thaliana* (Bulgarelli *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2012; Shakya *et al.*, 2013) y también con plantas de metabolismo CAM como las cactáceas, que cohabitan con los agaves, en las cuales los mismos grupos, además del phylum *Acidobacteria*, representaron más de 85% de las comunidades directamente asociadas con dichas plantas (Fonseca-García *et al.*, 2016). Es importante mencionar que aunque estos resultados fueron consistentes entre el análisis con iTags y el análisis metagenómico (comunidades epífitas de *A. tequilana* y

*A. salmiana*), el *phylum Cyanobacteria* estuvo mayormente representado en los resultados obtenidos del análisis metagenómico (iTags= menos de 0.5%, metagenomas= más de 6%). Estas diferencias pueden relacionarse con el sesgo originado por el uso de la PCR (amplificación preferencial del ADN más abundante) para la secuenciación dirigida (iTags), el cual no es un paso necesario en la secuenciación aleatoria del análisis metagenómico (NAS, 2007; Manichanh *et al.*, 2008). Las cianobacterias han sido detectadas también como parte de las comunidades microbianas epífitas de cactáceas (Fonseca-García, 2016), plantas que cohabitan con los agaves, donde se reportan géneros como *Phormidium* y *Microcoleus* (Orden *Oscillatoriales*), los cuales son similares a los encontrados en asociación con los agaves. Estos dos géneros de cianobacterias, además de otros como *Nostoc* (Orden *Nostocales*) y *Stigonema* (Orden *Stigonematales*), también detectados en las comunidades epífitas de los agaves, han sido reportados como microorganismos capaces de colonizar ambientes extremos como las costras biológicas de suelo en sistemas áridos (Nunes da Rocha *et al.*, 2015; Čapková *et al.*, 2016) y *biofilms* subaéreos de montañas y desiertos, contribuyendo a la formación de mini-ecosistemas microbianos gracias a que son fotosintéticos, capaces de fijar nitrógeno, tolerantes a la desecación y la radiación solar (Gorbushina, 2007).

Las comunidades fúngicas estuvieron constituidas en más del 90% por miembros del *phylum Ascomycota*, mientras que el *phylum Basidiomycota* representó poco menos del 8%, del mismo modo que en otras plantas de zonas semiáridas como los pastos perennes (Porrás-Alfaro *et al.*, 2011) o las cactáceas (Fonseca-García *et al.*, 2016), los cuales son colonizados de forma predominante por *Ascomycota*. A pesar de que las micorrizas se asocian con la mayoría de las plantas y son simbioses antiguos, al

menos de 400 millones de años (Humphreys *et al.*, 2010), en nuestro estudio representaron únicamente el 1% de las comunidades fúngicas asociadas sólo con los agaves silvestres. Esta baja o ausente colonización de los agaves por parte de los hongos micorrízicos pudo ser ocasionada por el uso de oligos universales en el análisis molecular de las comunidades fúngicas. Se ha demostrado que los oligos universales utilizados para la amplificación de marcadores moleculares fúngicos (subunidad 18S o ITS), no son del todo útiles en la detección de hongos micorrízicos (Redecker, 2000, Martin & Rygielwicz, 2005; Lee *et al.*, 2008). Dentro de las opciones que se plantean como factibles está el diseño de oligos específicos dirigidos a la amplificación de regiones que incluyan no sólo las subunidades ribosomales o los espaciadores internos, sino un conjunto de éstos para usarse como marcadores moleculares (Lee *et al.*, 2008; Stockinger *et al.*, 2010).

Con respecto a la diversidad de las comunidades microbianas, llamó nuestra atención la baja diversidad observada en las comunidades de rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana* en comparación con las especies silvestres *A. salmiana* y *A. deserti*. Los bajos niveles de diversidad en estas comunidades epífitas están directamente relacionados con el hecho de que sólo unos pocos grupos bacterianos, como los *Enterobacteriales* específicamente el género *Leclercia*, fueron dominantes en las comunidades asociadas con *A. tequilana*. Es importante mencionar que *A. tequilana* var. azul es un monocultivo que se encuentra bajo la Denominación de Origen Tequila, por lo que la propagación de estas plantas está restringida a la reproducción vegetativa (bulbilos o hijuelos de rizoma), de modo que sólo se obtienen plantas genéticamente idénticas a las parentales (Valenzuela *et al.*, 2011). Este monocultivo se encuentra sujeto a prácticas agrícolas como la desinfección radical de los hijuelos antes de la

plantación, teniendo en cuenta que el ensamble de las comunidades rizosféricas se da en etapas tempranas del desarrollo de las plantas (Chaparro *et al.*, 2014), es probable que la desinfección radical ocasione cierto nivel de perturbación en estas comunidades. Adicionalmente, existen otras prácticas como la falta de rotación de cultivos y el uso de plaguicidas y fertilizantes químicos que podrían estar perturbando las comunidades microbianas. De este modo, creemos probable que el manejo agrícola puede relacionarse con el incremento de los *Enterobacteriales* en las comunidades epífitas asociadas con *A. tequilana*, dentro de cuyos miembros se encuentran los géneros *Erwinia* y *Pantoea*, dos géneros que forman parte del complejo bacteriano responsable de la pudrición blanda en *A. tequilana* (Jiménez-Hidalgo *et al.*, 2004). En estudios recientes se ha observado que el manejo agrícola puede disminuir la diversidad microbiana (Hilton *et al.*, 2013), alterando las interacciones benéficas entre la planta y la microbiota nativa y adicionalmente permitir el incremento de microorganismos patógenos (Santhanam *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestro diseño experimental no provee evidencia suficiente para adjudicar la disminución de la diversidad microbiana en las comunidades epífitas con *A. tequilana* al manejo agrícola.

Consideramos que es necesario realizar otros estudios donde pueda evaluarse el efecto de la disminución de la microbiota nativa en cultivos, y así conocer las repercusiones del manejo agrícola sobre el microbioma los agaves y cómo esto afecta la adecuación de las mismas.

## 6.2 Capítulo 2: Factores que afectan la estructura de las comunidades asociadas con *Agave*

---

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados como parte de:

Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriaes JJ & Partida-Martínez LP (2014). **Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species.** *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857.

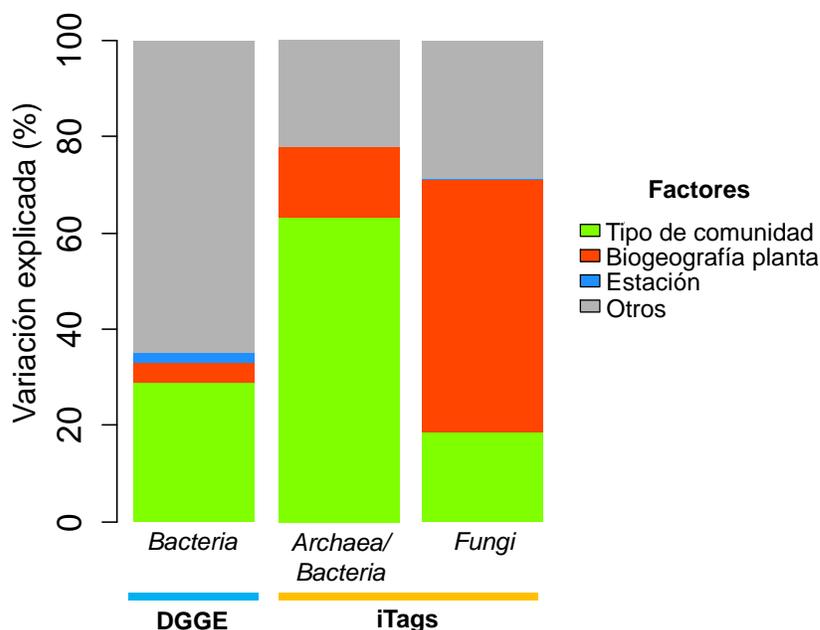
Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-García C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez LP & Tringe SG (2016). **Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species.** *New Phytologist* 209: 798-811.

### **6.2.1 El tipo de muestra y la biogeografía de la especie influyen en la composición de las comunidades microbianas en agaves silvestres y cultivados**

A partir de la evaluación del efecto global de todos los factores considerados y sus interacciones, sobre las comunidades procariontes y fúngicas por medio del análisis de varianza basado en permutaciones (PERMANOVA), observamos que el tipo de muestra, la biogeografía de la planta, así como la interacción entre estos dos, son los factores que ejercen una mayor influencia sobre las comunidades microbianas (Fig. 6.13; Tablas 6.1-6.2).

Si bien, los mismos factores tuvieron un efecto tanto en las comunidades procariontes como en las fúngicas, en el caso de *Archaea/Bacteria* el factor que explicó el mayor porcentaje de la variación, tanto en los datos obtenidos a partir de DGGE como iTags, fue el tipo de muestra. Este factor por sí solo explicó el 63% de la variación observada en la comunidades procariontes, mientras que el factor especie lo hizo en un 15% (Fig. 6.13; Tablas 6.1-6.2).

Por otro lado, en las comunidades fúngicas el factor que explicó el mayor porcentaje de variación fue la biogeografía de la especie hospedera: 52.7%, mientras que el tipo de muestra explicó un 18% (Fig. 6.13; Tabla 6.2). Además de estos factores, las comunidades fúngicas se vieron influidas, aunque en menor proporción, por la estacionalidad y la interacción entre este factor y el tipo de muestra (Fig. 6.13; Tabla 6.2), algo que, a nivel global, no ocurrió con las comunidades procariontes. Es importante mencionar que, debido a que las especies de *Agave* utilizadas en este trabajo no se encuentran en simpatria, el factor sitio no pudo ser evaluado de forma independiente del factor especie en el análisis global.



**Figura 6.13** Porcentaje de variación explicada por los diferentes factores que influyen las comunidades microbianas asociadas con los agaves, detectadas con iTags y DGGE.

**Tabla 6.1** PERMANOVA de las comunidades procariontes asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana* detectadas con DGGE, considerando todos los factores y sus interacciones. Se muestran únicamente valores estadísticamente significativos ( $P \leq 0.001$ ).

Factor <sup>a</sup>	<i>F</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>P</i>
<b>Global</b>			
Tipo de muestra <sub>5, 120</sub>	16.94	0.29	0.001
Especie <sub>1, 120</sub>	12.05	0.04	0.001
Tipo de muestra:Especie <sub>5, 120</sub>	5.27	0.09	0.001
Estación <sub>1, 120</sub>	5.71	0.02	0.001
<b>Suelo<sup>b</sup></b>			
Estación <sub>1, 40</sub>	11.86	0.15	0.001
Especie <sub>1, 40</sub>	3.79	0.05	0.001
Estación:Especie <sub>1, 40</sub>	6.63	0.08	0.001
<b>Epíspfera<sup>c</sup></b>			
Especie <sub>1, 40</sub>	35.01	0.31	0.001
Estación <sub>1, 40</sub>	12.85	0.11	0.001
Especie:Estación <sub>1, 40</sub>	15.58	0.14	0.001
<b>Endósfera<sup>d</sup></b>			
Estación <sub>1, 40</sub>	11.24	0.16	0.001
Tipo de muestra <sub>1, 40</sub>	4.80	0.07	0.001
Especie <sub>1, 40</sub>	4.50	0.06	0.001

<sup>a</sup>Los subíndices indican los grados libertad y los residuales para cada prueba de *F*.

<sup>b</sup>Comunidades provenientes de suelo y suelo asociado a raíz.

<sup>c</sup>Comunidades provenientes de rizósfera y filósfera.

<sup>d</sup>Comunidades provenientes de endósfera de hoja y raíz.

**Tabla 6.2** PERMANOVA de las comunidades procariontes y fúngicas asociadas con las tres especies de *Agave* detectadas con secuenciación etiquetada, considerando todos los factores y sus interacciones. Se muestran únicamente valores estadísticamente significativos ( $P \leq 0.05$ ).

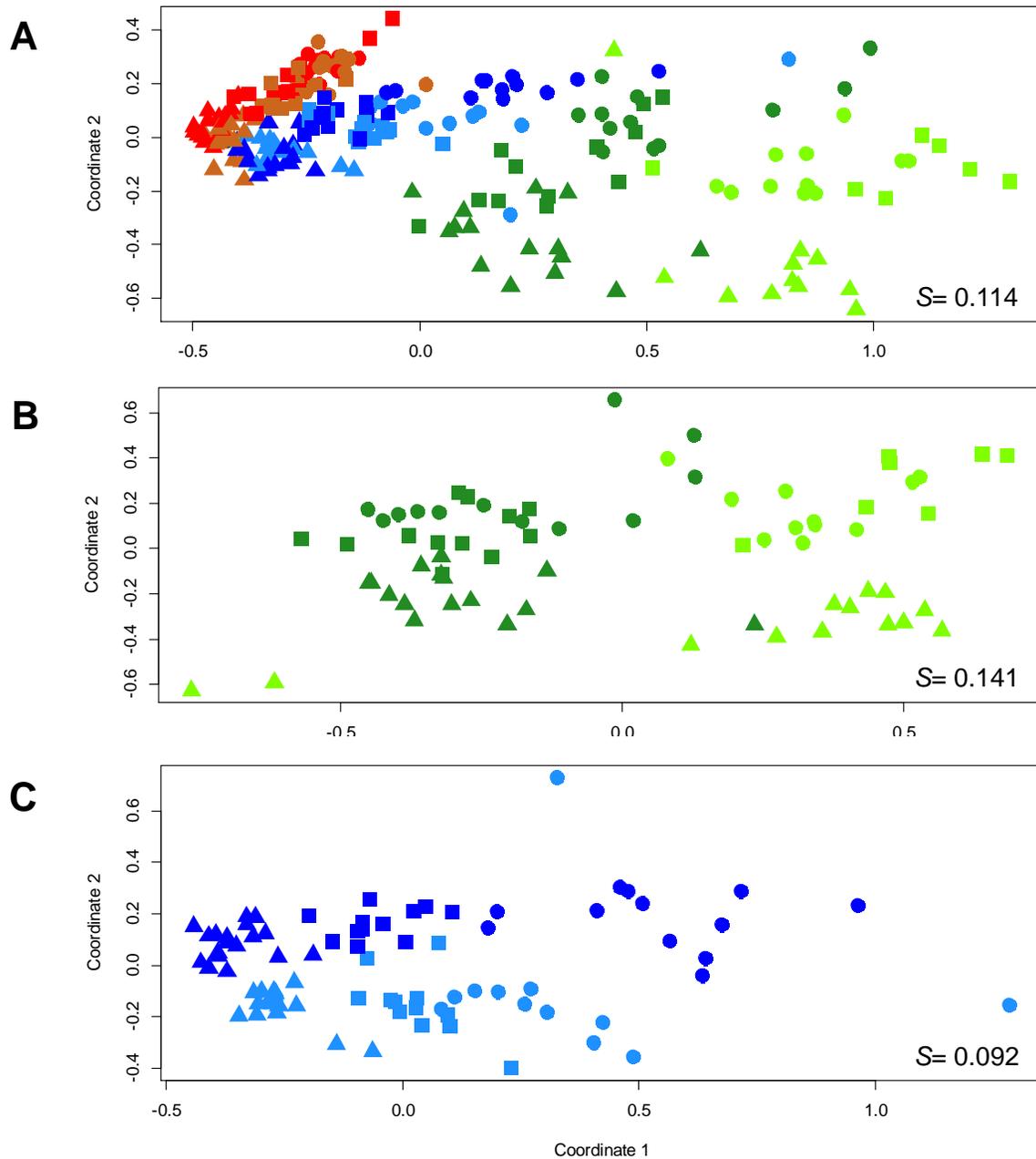
<b>Bacterias</b>				<b>Hongos</b>			
<b>Factor<sup>a</sup></b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Factor<sup>a</sup></b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Global</b>							
Tipo de muestra <sub>5, 199</sub>	183.25	0.63	0.001	Especie <sub>2, 190</sub>	350.97	0.53	0.001
Especie <sub>2, 199</sub>	107.10	0.15	0.001	Tipo de muestra <sub>5, 190</sub>	49.04	0.18	0.001
Tipo de muestra:Especie <sub>10, 199</sub>	10.52	0.07	0.001	Tipo de muestra:Especie <sub>10, 190</sub>	16.83	0.13	0.001
				Tipo de muestra:Estación <sub>5, 190</sub>	1.94	0.01	0.016
				Estación <sub>1, 190</sub>	2.54	0.002	0.050
<b>Suelo<sup>b</sup></b>							
Especie <sub>2, 71</sub>	88.06	0.67	0.001	Especie <sub>2, 71</sub>	190.85	0.82	0.001
				Tipo de muestra <sub>1, 71</sub>	4.28	0.01	0.019
<b>Epísfera<sup>c</sup></b>							
Especie <sub>2, 70</sub>	88.02	0.59	0.001	Especie <sub>2, 70</sub>	254.03	0.71	0.001
Tipo de muestra <sub>1, 70</sub>	32.06	0.11	0.001	Tipo de muestra:Especie <sub>2, 70</sub>	34.26	0.10	0.001
Tipo de muestra:Especie <sub>2, 70</sub>	7.14	0.05	0.001	Tipo de muestra <sub>1, 70</sub>	56.94	0.08	0.001
				Estación <sub>1, 70</sub>	2.98	0.00	0.049
<b>Endósfera<sup>d</sup></b>							
Tipo de muestra <sub>1, 58</sub>	110.96	0.48	0.001	Tipo de muestra <sub>1, 49</sub>	57.27	0.35	0.001
Especie <sub>2, 58</sub>	12.55	0.11	0.001	Especie <sub>2, 49</sub>	17.77	0.21	0.001
Tipo de muestra:Especie <sub>2, 58</sub>	7.27	0.06	0.001	Tipo de muestra:Especie <sub>2, 49</sub>	4.45	0.05	0.001
Especie:Estacion <sub>1, 58</sub>	5.23	0.04	0.001	Estación <sub>1, 49</sub>	3.76	0.02	0.008
Estación <sub>2, 58</sub>	4.62	0.02	0.014	Tipo de muestra:Estación <sub>1, 49</sub>	3.51	0.02	0.014
Tipo de muestra:Estación <sub>1, 58</sub>	3.36	0.01	0.027	Tipo de muestra:Especie:Estación <sub>1, 49</sub>	2.62	0.02	0.049

<sup>a</sup>Los subíndices indican los grados libertad y los residuales para cada prueba de *F*.

<sup>b</sup>Comunidades provenientes de suelo y suelo asociado a raíz.

<sup>c</sup>Comunidades provenientes de rizósfera y filósfera.

<sup>d</sup>Comunidades provenientes de endósfera de hoja y raíz.

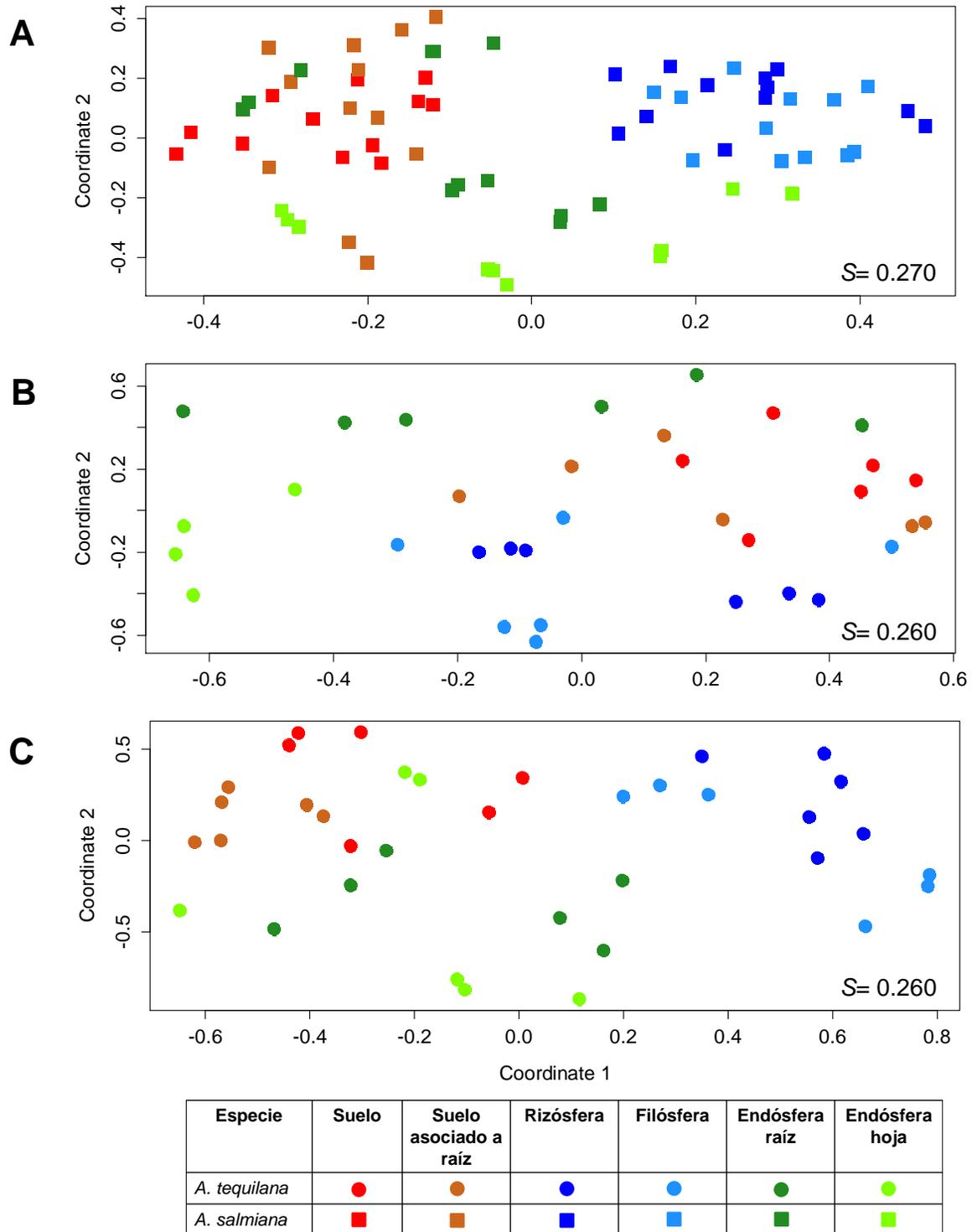


Especie	Suelo	Suelo asociado a raíz	Rizósfera	Filósfera	Endósfera raíz	Endósfera hoja
<i>A. tequilana</i>	●	●	●	●	●	●
<i>A. salmiana</i>	■	■	■	■	■	■
<i>A. deserti</i>	▲	▲	▲	▲	▲	▲

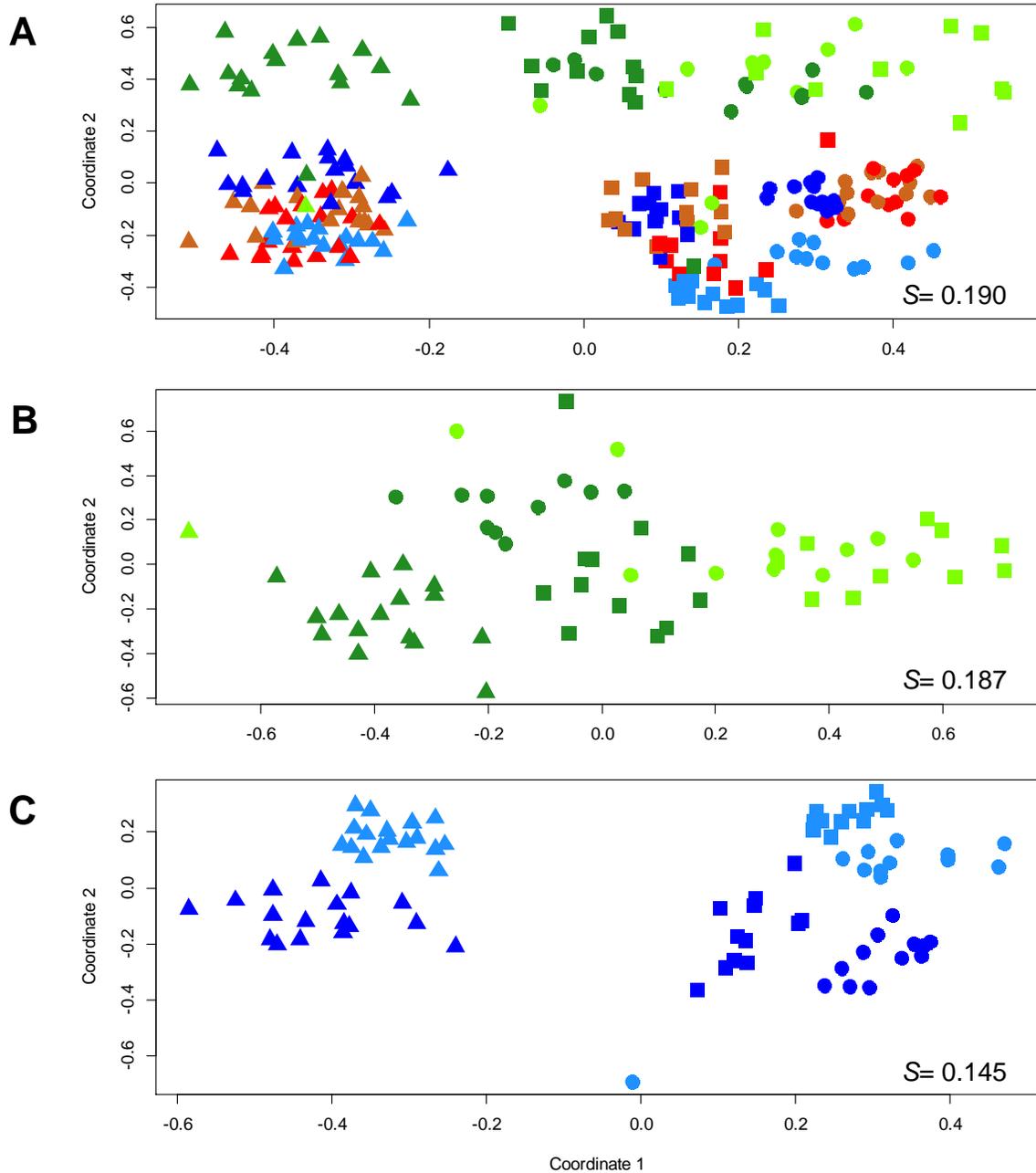
**Figura 6.14** Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis con iTags de las comunidades procariontes asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti*. A: Seis comunidades, B: endófitos, C: epífitos.

Con el objetivo de tener un soporte gráfico para los resultados del PERMANOVA a nivel global, se generó un análisis de ordenamiento con un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés), a partir de una matriz de distancias Bray-Curtis. En las gráficas de NMDS pudimos observar que tanto las comunidades procariontes como las fúngicas se agruparon de acuerdo al tipo de muestra y la biogeografía de la planta. No obstante, como previamente se observó en los resultados del PERMANOVA, la contribución de cada factor fue diferente entre *Archaea/Bacteria* y *Fungi*.

Los agrupamientos en las comunidades procariontes estuvieron determinados principalmente por el tipo de muestra, conjuntando a las comunidades en tres *subgrupos*: en un extremo el suelo (suelo y suelo asociado a raíz), seguido por las comunidades epífitas (rizósfera y filósfera) y al otro extremo las comunidades endófitas (endósfera de raíz y hoja) (Fig. 6.14A). Adicionalmente, las gráficas de NMDS mostraron también que la mayor variación entre muestras se encontró en las comunidades endófitas (Fig. 6.14A), en comparación con las muestras provenientes de suelo, cuya variación intra-muestral fue menor. En el caso de los datos obtenidos a partir de DGGE, el agrupamiento de las comunidades procariontes así como la formación de los *subgrupos*, fue consistente con lo observado con iTags para *A. tequilana* y *A. salmiana* (Fig. 6.14-6.15). Sin embargo, a diferencia de iTags, con DGGE el patrón de agrupamiento para *A. tequilana* fue similar sólo cuando los sitios de muestreo (Amatitán y Pénjamo) fueron analizados por separado (Fig. 6.15B-C).



**Figura 6.15** Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis con DGGE de las comunidades procariontes asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. A: seis comunidades de ambos sitios de muestreo (Magueyal y San Francisco) asociadas con *A. salmiana*, B: seis comunidades de Pénjamo asociadas con *A. tequilana*, C: seis comunidades de Pénjamo asociadas con *A. tequilana*.



Especie	Suelo	Suelo asociado a raíz	Rizósfera	Filósfera	Endósfera raíz	Endósfera hoja
<i>A. tequilana</i>	●	●	●	●	●	●
<i>A. salmiana</i>	■	■	■	■	■	■
<i>A. deserti</i>	▲	▲	▲	▲	▲	▲

**Figura 6.16** Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) del análisis con iTags de las comunidades fúngicas asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti*. A: Seis comunidades, B: endófitos, C: epífitos.

En el caso de las comunidades fúngicas el análisis global con NMDS nos mostró una diferencia notoria entre las muestras colectadas en México y las de California (Fig. 6.16A). Aunado a esto, pudimos observar que las muestras provenientes de la rizósfera y filósfera formaron un grupo cercano a las comunidades de suelo, mientras que las comunidades endófitas formaron un grupo distante de este último (Fig. 6.16A).

Considerando que el tipo de muestra fue un factor determinante en el agrupamiento de los datos, decidimos analizar el efecto de todos los factores por separado sobre los dos subgrupos asociados directamente con las plantas: epífitos y endófitos (Figs. 6.14B-C, 6.16B-C). Las comunidades epífitas procariontes y fúngicas se vieron afectadas por la biogeografía de las especies de *Agave*, sin embargo la influencia de este factor fue mayor sobre las comunidades fúngicas (Tabla 6.2; Figs. 6.14, 6.16). El tipo de muestra y la interacción entre este factor y la especie, explicaron el 15.6% y 17.6% de la variación en las comunidades epífitas procariontes y fúngicas, respectivamente. En el caso de las comunidades endófitas, observamos que tanto las comunidades procariontes como las fúngicas fueron afectadas no sólo por el tipo de muestra, la especie de *Agave* y la interacción entre estos dos factores (en conjunto explican 65% y 62.4% de la variación total en *Archaea/Bacteria* y *Fungi*, respectivamente), sino también por la estacionalidad (Tabla 6.2). De hecho, la estacionalidad y la interacción de este factor con otros, explicaron el 7.9% de la variación en las comunidades endófitas bacterianas y el 6.1% en las fúngicas (Figs. 6.14, 6.16; Tabla 6.2). Este patrón es consistente con las observaciones hechas a partir de los datos obtenidos de DGGE para las comunidades procariontes endófitas, donde el factor estacionalidad en conjunto con su interacción con otros factores explicó hasta el 29% de la variación total en dichas comunidades (Tabla 6.1).

Debido a la influencia de la localización geográfica de las especies de *Agave* sobre las comunidades microbianas, realizamos un análisis, similar al anteriormente descrito, para evaluar el efecto de todos los factores considerados y sus interacciones, en cada una de las especies de *Agave* por separado. A partir de estos análisis observamos que las comunidades microbianas asociadas con los dos agaves silvestres fueron afectadas de forma similar por los factores evaluados. Tanto en *A. salmiana* como en *A. deserti*, el tipo de muestra fue el factor que explicó la mayor cantidad de variación en las comunidades microbianas (Tabla 6.3), sin embargo el efecto de este factor fue aún mayor en las comunidades procariontes en comparación con las fúngicas (85-81% en *Archaea/Bacteria*; 74-62% en *Fungi* para *A. salmiana* y *A. deserti*, respectivamente). El factor sitio tuvo un efecto mínimo en las comunidades procariontes de *A. salmiana* y parece no haber afectado las comunidades asociadas con *A. deserti* (Tabla 6.3). Por el contrario, las comunidades fúngicas asociadas con *A. deserti* se vieron afectadas por el factor sitio y la interacción de éste con el tipo de muestra, explicando en conjunto el 15% de la variación total de estos datos. En el caso de las comunidades fúngicas de *A. salmiana* el factor sitio sólo explicó el 1.5% de la variación total. En contraste, las comunidades microbianas (*Archaea/Bacteria* y *Fungi*) asociadas con *A. tequilana* se vieron afectadas tanto por el sitio como por la estacionalidad, sugiriendo que los factores abióticos podrían jugar un papel importante en la conformación del microbioma de *A. tequilana*.

**Tabla 6.3** PERMANOVA de las comunidades procariontes y fúngicas al interior de cada una de las tres especies de *Agave*, con base en los datos obtenidos con secuenciación etiquetada, considerando todos los factores y sus interacciones. Se muestran únicamente valores estadísticamente significativos ( $P \leq 0.05$ ).

<b>Bacterias</b>				<b>Hongos</b>			
<b>Factor<sup>a</sup></b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>	<b>Factor<sup>a</sup></b>	<b>F</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b><i>A. tequilana</i></b>							
Tipo de muestra <sub>5, 47</sub>	64.14	0.79	0.001	Tipo de muestra <sub>5, 44</sub>	59.90	0.63	0.001
Estación <sub>1, 47</sub>	4.85	0.01	0.018	Tipo de muestra:Sitio <sub>5, 44</sub>	8.29	0.09	0.001
Sitio <sub>1, 47</sub>	4.76	0.01	0.018	Sitio <sub>1, 44</sub>	37.03	0.08	0.001
				Tipo de muestra:Estación:Sitio <sub>5, 44</sub>	4.63	0.05	0.001
				Tipo de muestra:Estación <sub>5, 44</sub>	3.81	0.04	0.001
				Estación <sub>1, 44</sub>	6.84	0.01	0.001
				Estación:Sitio <sub>1, 44</sub>	5.56	0.01	0.005
<b><i>A. salmiana</i></b>							
Tipo de muestra <sub>5, 42</sub>	83.52	0.86	0.001	Tipo de muestra <sub>5, 46</sub>	43.67	0.74	0.001
Tipo de muestra:Sitio <sub>5, 42</sub>	2.12	0.02	0.045	Sitio <sub>1, 46</sub>	4.53	0.01	0.004
<b><i>A. deserti</i></b>							
Tipo de muestra <sub>5, 62</sub>	78.67	0.81	0.001	Tipo de muestra <sub>5, 56</sub>	38.75	0.62	0.001
				Sitio <sub>2, 62</sub>	13.45	0.09	0.001
				Tipo de muestra:Sitio <sub>8, 62</sub>	2.45	0.06	0.002

<sup>a</sup>Los subíndices indican los grados libertad y los residuales para cada prueba de *F*.

### 6.2.2 Microorganismos clave asociados con agaves silvestres y cultivados

Considerando las relaciones ecológicas desde la perspectiva de los mercados microbianos, de acuerdo con Werner *et al.* (2014), hicimos uso del concepto de Pareto (la regla del 80-20) para detectar aquellos taxones bacterianos y fúngicos que constituyeran el 80% (microorganismos clave) de la abundancia relativa de las comunidades microbianas en las especies de *Agave* estudiadas. A partir de la detección de dichos taxones, se graficaron el promedio de la abundancia relativa y la prevalencia de éstos en cada tipo de muestra para cada una de las especies de *Agave* (Figs. 6.17-6.22), de este modo intentamos inferir cuales interacciones agaves-microorganismos podrían ser relevantes ecológica y funcionalmente.

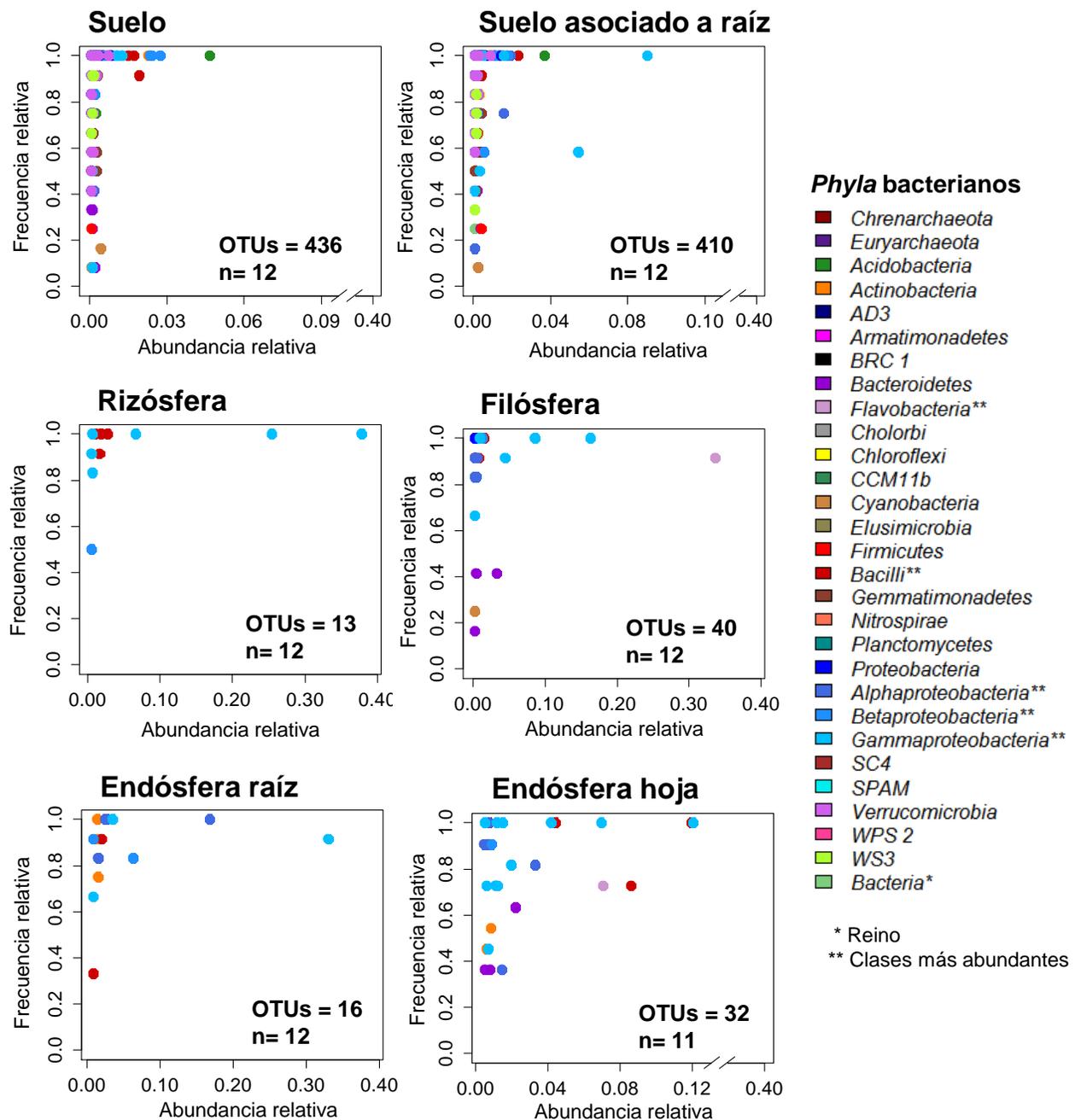
En general, nuestro análisis confirmó los bajos niveles de diversidad observados en las comunidades microbianas asociadas con *A. tequilana*, ya que un número reducido de taxones conformaron el 80% de estas comunidades en comparación con aquellas asociadas con los agaves silvestres, esto sugiere un posible efecto del manejo agronómico sobre el microbioma de *A. tequilana* (Figs. 6.17-6.22). A pesar de esta reducción en la diversidad microbiana, el análisis de Pareto también reveló que existe un grupo de microorganismos clave que se comparte a nivel de *phylum/clase* entre las tres especies de *Agave* estudiadas. Por otro lado, observamos que a un nivel taxonómico más fino (OTUs) existen diferencias entre los microorganismos clave asociados con las especies silvestres y la especie cultivada de *Agave*.

A partir de nuestro análisis, observamos que la endósfera bacteriana de hoja asociada con *A. tequilana* estuvo dominada por dos OTUs identificados como *Acinetobacter* (Clase *Gammaproteobacteria*) y *Bacillus* (Clase *Bacilli*) (cada uno con el

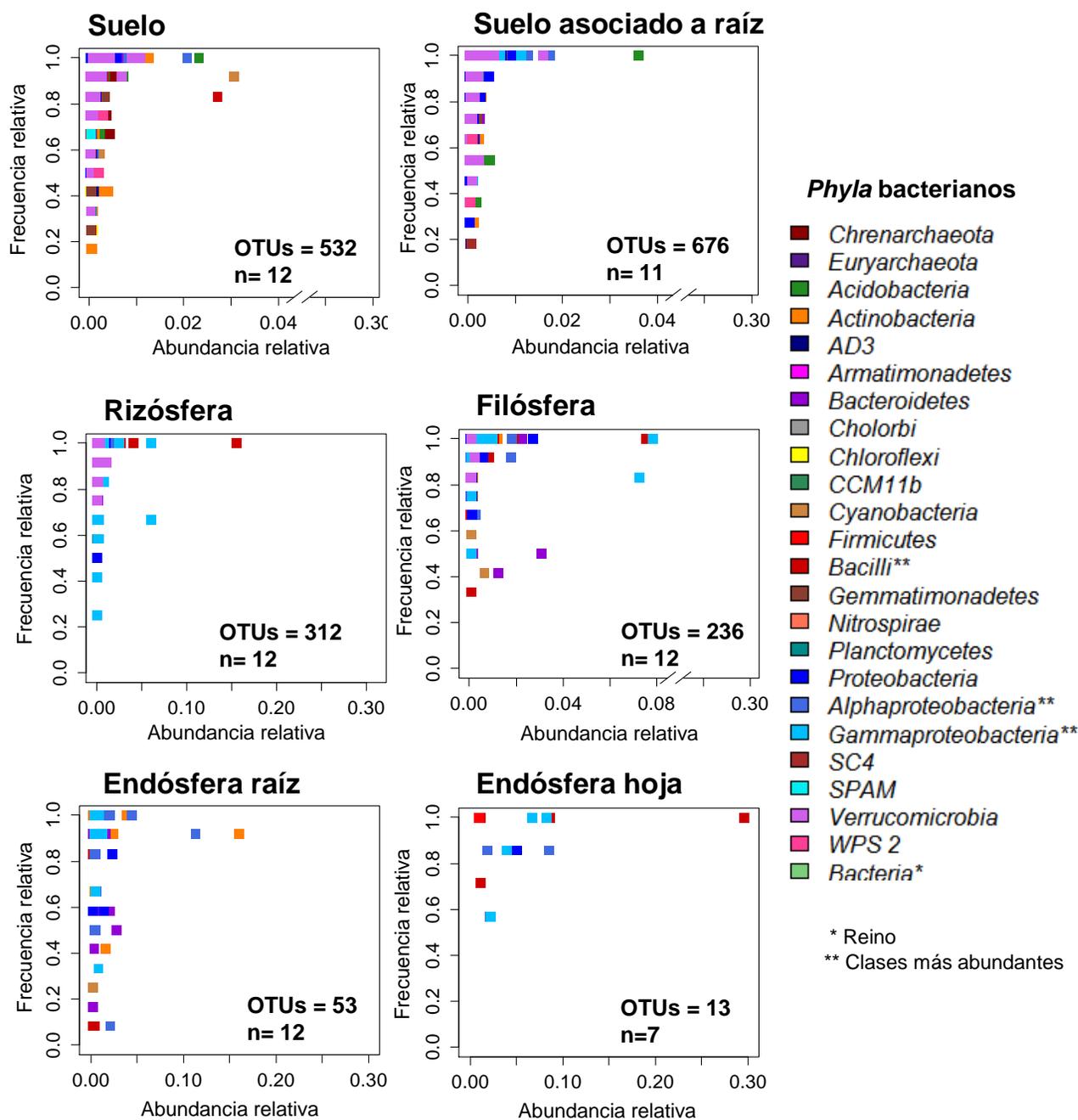
12% de la abundancia relativa), mientras que la endósfera de hoja de los agaves silvestres estuvo dominada por el OTU 4, identificado como *Leclercia* (Clase *Gammaproteobacteria*, representando 8-30% de la abundancia relativa, (Figs. 6.17-6.19). En el caso de la endósfera de raíz de *A. tequilana*, los microorganismos clave fueron los OTUs identificados como *Stenotrophomonas* (Clase *Gammaproteobacteria*, 33%) y *Agrobacterium* (Clase *Alphaproteobacteria*, 17%). En contraste, la endósfera de raíz de los agaves silvestres estuvo dominada por *Actinosynnemataceae* y *Promicromonospora* (Clase *Actinobacteria*, cada uno con el 16% de la abundancia relativa), además de *Rhizobiales* (Clase *Alphaproteobacteria*, 11%) en *A. salmiana* y *Leclercia* (Clase *Gammaproteobacteria*, 15%) en *A. deserti*. Es importante mencionar que las diferencias observadas en los microorganismos clave en la endósfera, no fueron perceptibles en las comunidades procariontes de suelo de las tres especies de *Agave* (Figs. 6.17-6.19).

En el caso de las comunidades fúngicas, encontramos que tanto en la endósfera de hoja de *A. tequilana* como en la de *A. salmiana* los tres OTUs más abundantes se identificaron como *Alternaria* (Orden *Pleosporales*, 9% y 14%, respectivamente), *Penicillium* (Orden *Eurotiales*, 7%, *A. tequilana*) y *Cladosporium* (Orden *Capnodiales*, 20%, *A. salmiana*) (Figs. 6.20, 6.22). En contraste, la endósfera de hoja de *A. deserti* estuvo dominada por los OTUs *Psathyrella* (Orden *Agaricales*, 17%) y *Cyphellophora* (Orden *Chaetothyriales*, 13%) (Fig. 6.22). Del mismo modo, encontramos que la endósfera de raíz de los agaves silvestres fue dominada por *Lophiostoma* (Orden *Pleosporales*, 6-11%), además de *Cladosporium* (Orden *Capnodiales*, 6%, *A. salmiana*) y *Cyphellophora* (Orden *Chaetothyriales*, 11%, *A. deserti*), mientras que la endósfera de

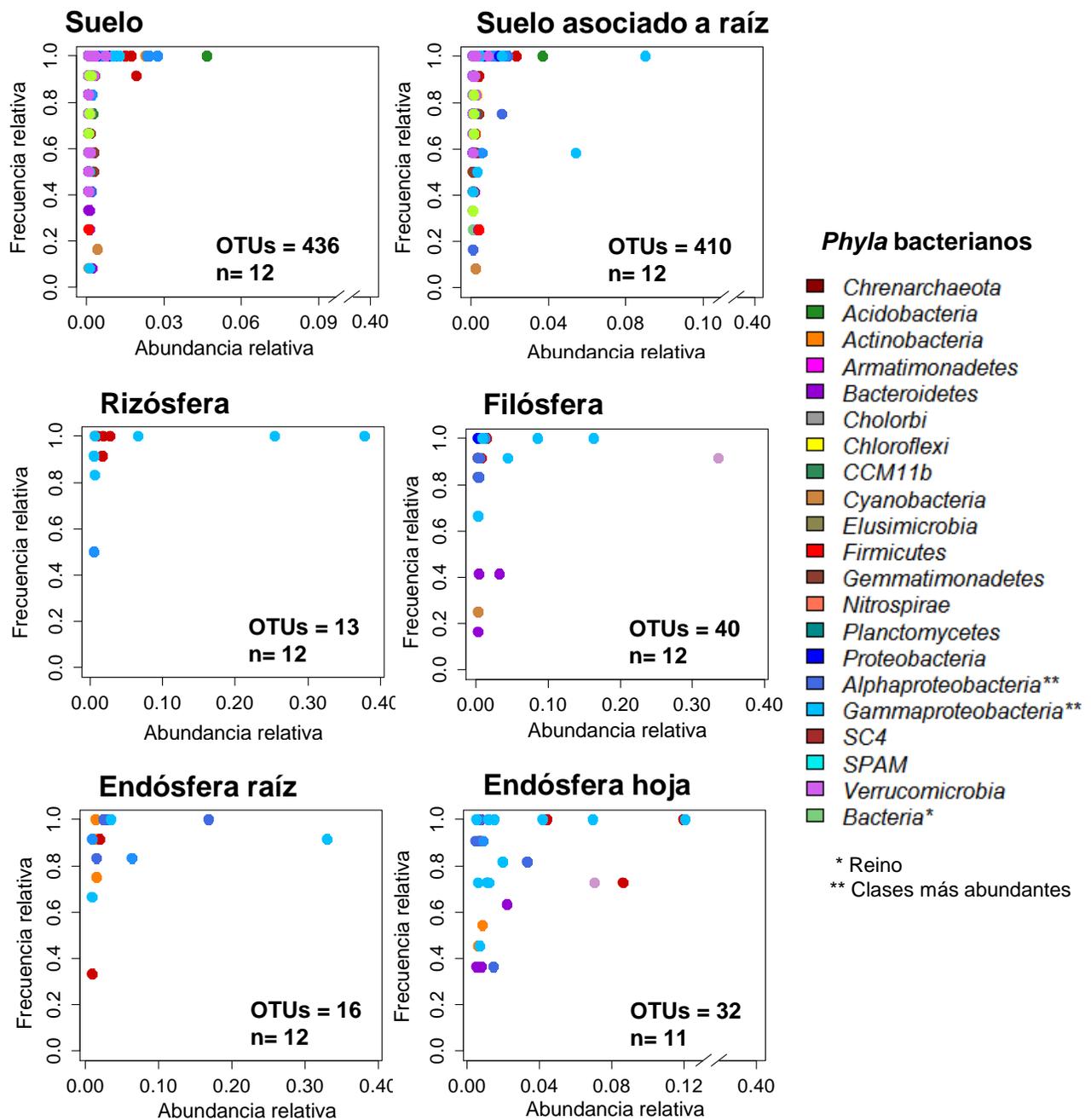
raíz de *A. tequilana* estuvo dominada por *Penicillium* (Orden *Eurotiales*, 28%) y *Fusarium* (Orden *Hypocreales*, 11%) (Figs. 6.20-6.22). Finalmente, se observó que el número de OTUs fúngicos en las comunidades de suelo fue mayor en aquellas asociadas con los agaves silvestres en comparación con *A. tequilana* (Figs. 6.17-6.19).



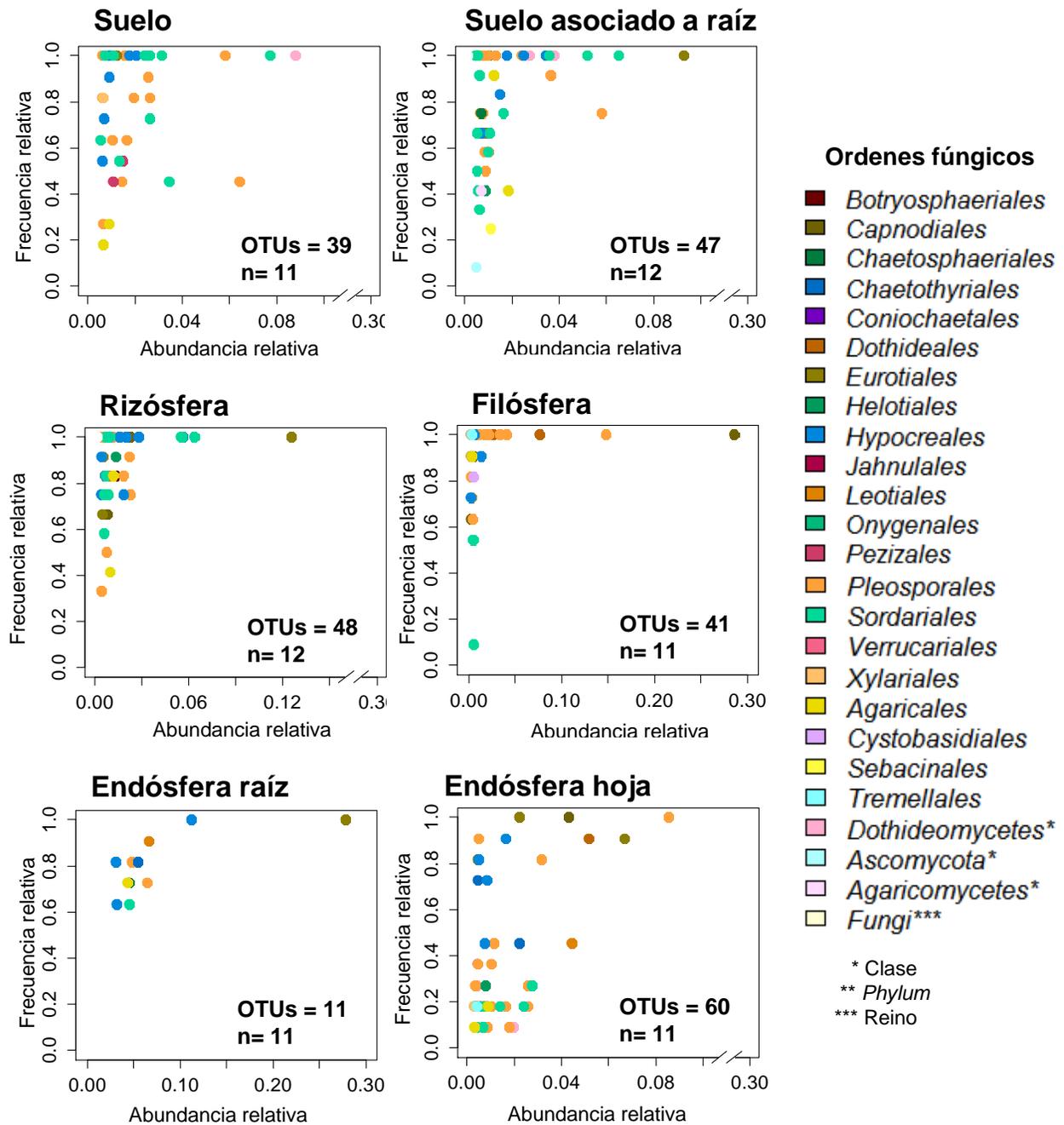
**Figura 6.17** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades procariontes asociadas con *A. tequilana*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.



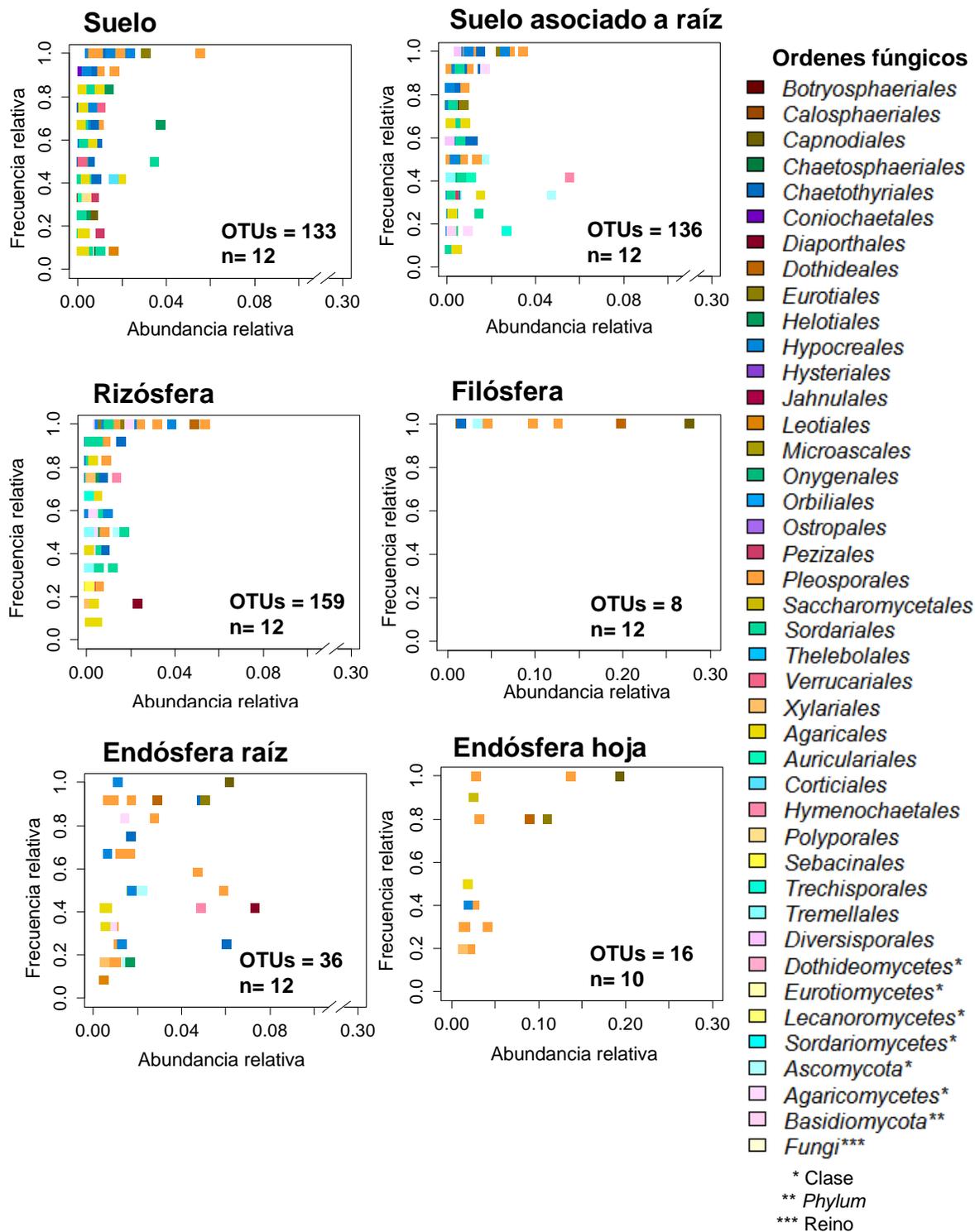
**Figura 6.18** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades procariontes asociadas con *A. salmiana*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.



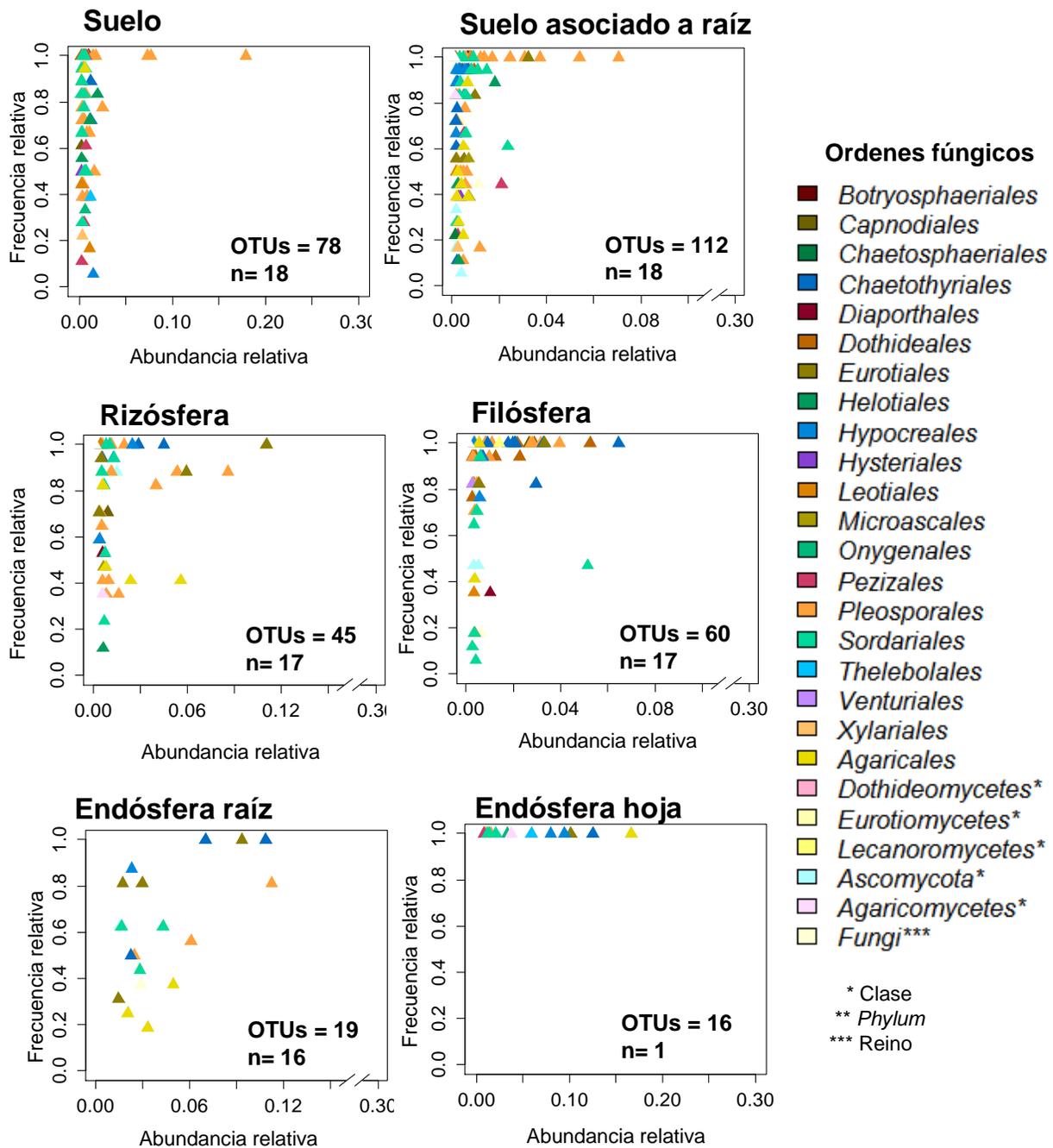
**Figura 6.19** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades procariontes asociadas con *A. deserti*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.



**Figura 6.20** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades fúngicas asociadas con *A. tequilana*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.



**Figura 6.21** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades fúngicas asociadas con *A. salmiana*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.



**Figura 6.22** Análisis de Pareto (frecuencia relativa vs. abundancia relativa) de las seis comunidades fúngicas asociadas con *A. deserti*. El número de OTUs clave y el número de muestras utilizadas para el análisis (n) se muestra en la base de cada gráfico.

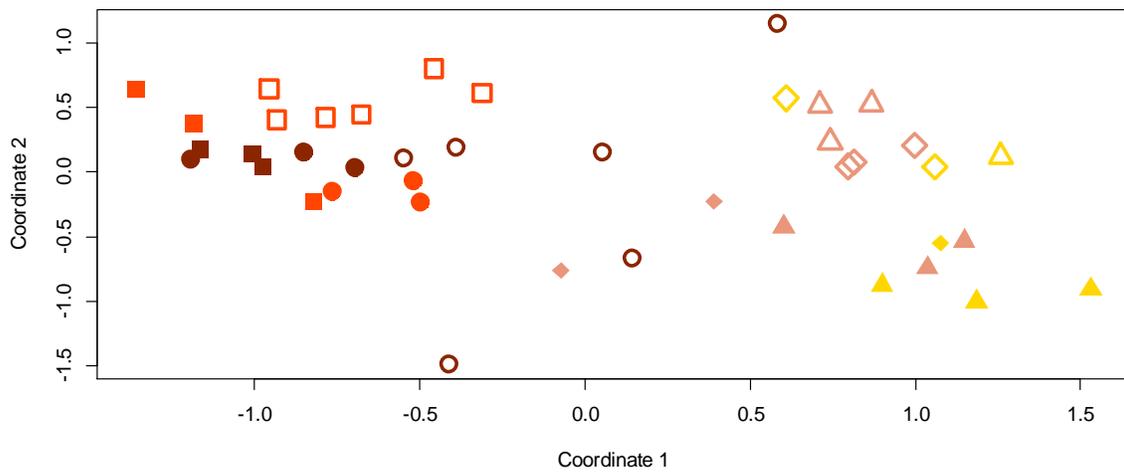
### 6.2.3 El microbioma endófito central de agaves en la sequía

El diseño experimental que implementamos en este trabajo nos permitió evaluar el efecto de la sequía, una condición que caracteriza el hábitat de los agaves, sobre las comunidades microbianas asociadas con estas plantas. Considerando los resultados obtenidos del NMDS y el PERMANOVA, los cuales mostraron que la estacionalidad afectó a las comunidades endófitas de bacterias y hongos (Tabla 6.2), se analizó el efecto de la sequía sobre las comunidades endófitas de hoja y raíz.

Analizamos de forma inicial el efecto de la sequía en los datos obtenidos del análisis de DGGE y encontramos un grupo de 15 OTUs que estuvieron compartidos entre la endósfera de hoja y raíz de *A. tequilana* y *A. salmiana* en todos los sitios de muestreo durante la época de secas (Apéndice D). Este conjunto de OTUs estuvo constituido por miembros de *Alpha*-, *Delta*-, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* y *Firmicutes* (Apéndice D). En ambos agaves el conjunto de 15 OTUs representó una mayor abundancia relativa durante la época de secas (más de 65%) en comparación con la época de lluvias (menos de 33%).

Con respecto al análisis del efecto de la sequía en los datos obtenidos de iTags, observamos que, del mismo modo que con el DGGE, en las comunidades procariontes endófitas asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*, pero no en aquellas con *A. deserti*, los taxones *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Alpha*-, *Beta*- y *Gammaproteobacteria* se enriquecieron durante la estación de secas en comparación con las lluvias (Fig. 6.23-6.24, Tabla 6.4). Esta diferencia entre los agaves mexicanos y *A. deserti* puede ser explicada por el hecho de que este último se desarrolla en el sitio más árido de los sitios estudiados (Nobel, 2003), lo que se refleja en una menor variación estacional. A pesar

de las diferencias entre los agaves, se identificó un grupo de 121 OTUs endófitos compartidos entre las muestras de hoja y 351 OTUs compartidos en las muestras de raíz de las tres especies de *Agave* en todos los sitios de muestreo (Fig. 6.24A). Estos grupos de OTUs representaron más del 50% del total de la comunidad bacteriana endófito para cada especie durante la época de secas.



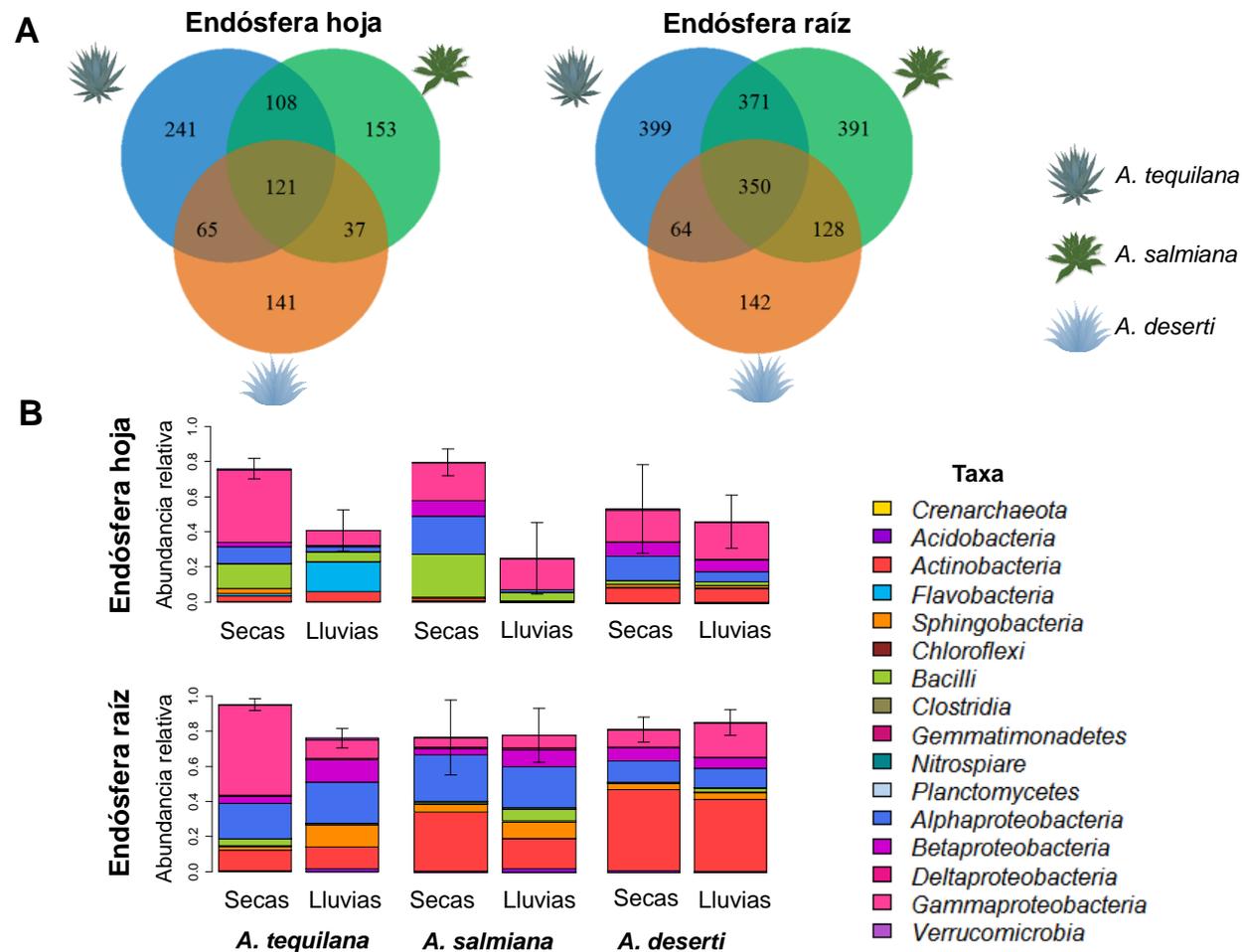
Comunidad	As.Ma	As.SF	At.Am	At.Pe	Estación
Endósfera hoja	△	◇	△	◇	Secas
Endósfera raíz	□	○	□	○	
Endósfera hoja	▲	◆	▲	◆	Lluvias
Endósfera raíz	■	●	■	●	

**Figura 6.23** Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de las comunidades procariontes endófitas asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. As.Ma: *A. salmiana* en el sitio El Magueyal, As.SF: *A. salmiana* en el sitio San Francisco, At.Am: *A. tequilana* en el sitio Amatitán, At.Pe: *A. tequilana* en el sitio Pénjamo.

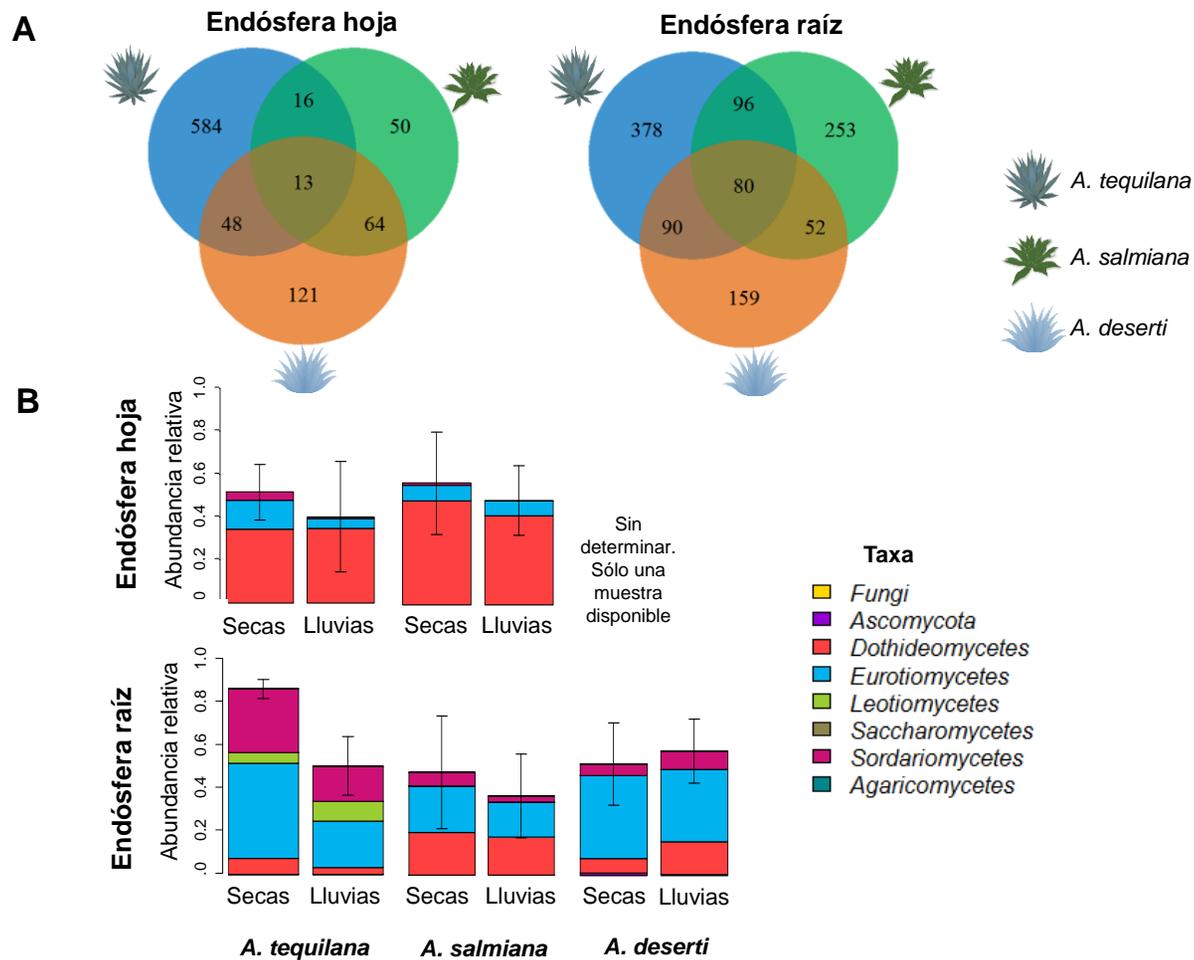
**Tabla 6.4** PERMANOVA de las comunidades microbianas endófitas asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*, detectadas con secuenciación etiquetada, considerando todos los factores y sus interacciones. Se muestran únicamente valores estadísticamente significativos ( $P \leq 0.05$ ).

Bacterias				Hongos			
Factor <sup>a</sup>	F	R <sup>2</sup>	P	Factor <sup>a</sup>	F	R <sup>2</sup>	P
Tipo de muestra <sub>1, 34</sub>	81.19	0.55	0.001	Tipo de muestra <sub>1, 35</sub>	40.56	0.40	0.001
Estación <sub>1, 34</sub>	11.00	0.07	0.001	Especie <sub>1, 35</sub>	11.57	0.11	0.001
Tipo de muestra:Estación <sub>1, 34</sub>	6.29	0.04	0.004	Tipo de muestra: Especie <sub>1, 35</sub>	6.040	0.06	0.004
Estación:Especie <sub>1, 34</sub>	5.66	0.04	0.008	Estación <sub>1, 35</sub>	4.50	0.04	0.008
Tipo de muestra:Especie <sub>1, 34</sub>	3.43	0.02	0.037	Tipo de muestra:Estación:Especie <sub>1, 35</sub>	2.76	0.03	0.044
Especie <sub>1, 34</sub>	3.50	0.02	0.038	Tipo de muestra:Estación <sub>1, 35</sub>	2.24	0.02	0.050

<sup>a</sup>Los subíndices indican los grados libertad y los residuales para cada prueba de *F*.



**Figura 6.24** Grupo bacteriano endófito central durante la sequía. A: Diagramas de Venn mostrando los OTUs bacterianos endófitos compartidos entre las tres especies de *Agave* en la época de secas. B: Abundancia relativa de los grupos bacterianos enriquecidos durante la época de secas en comparación con la época de lluvias en las tres especies de *Agave*; diferencias significativas entre secas y lluvias según la prueba de Kruskal-Wallis, *A. tequilana*:  $X^2 = 7.5$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.00617$  en endósfera de hoja,  $X^2 = 8.31$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.0039$  en endósfera de raíz y *A. salmiana*:  $X^2 = 4.5$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.03389$  en endósfera de raíz.



**Figura 6.25** Grupo fúngico endófito central durante la sequía. A: Diagramas de Venn mostrando los OTUs fúngicos endófitos compartidos entre las tres especies de *Agave* en la época de secas. B: Abundancia relativa de los grupos fúngicos enriquecidos durante la época de secas en comparación con la época de lluvias en las tres especies de *Agave*; diferencias significativas entre secas y lluvias según la prueba de Kruskal-Wallis, *A. tequilana*:  $X^2 = 4.03$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0.04461$  en endósfera de raíz.

En contraste con las diferencias observadas en las comunidades procariontes, las comunidades fúngicas endófitas se vieron menos afectadas por la estacionalidad (Fig. 6.25, Tabla 6.4). La endósfera de hoja fue similar entre los agaves mexicanos (Fig. 6.25), donde se encontraron taxones como: *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Cyphellophora*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Gibberella*. Aunque las comunidades fúngicas de la endósfera de raíz fueron diferentes entre las tres especies de *Agave* en términos de abundancia relativa, se detectó un grupo de 80 OTUs compartido en condiciones de sequía (Fig. 6.25A). Este grupo representó el 40% o más del total de la comunidad en cada especie (Fig. 6.25B).

Considerando lo anterior, creemos importante hacer uso de la definición de “microbioma central” para el desarrollo de futuras hipótesis funcionales. El microbioma central se define como un conjunto de miembros de la comunidad microbiana que se encuentra en todos los ensamblajes asociados con un hábitat en particular (Shade & Handelsman, 2012). Por lo tanto, estos grupos de OTUs compartidos entre las tres especies de *Agave* podrían representar un microbioma endófito central de secas con alguna posible función para los agaves.

#### **6.2.4 Discusión**

La composición y la diversidad del microbioma de las plantas son determinadas por diversos factores como, el genotipo de la planta (Pefiffer *et al* 2013; Kembel *et al.*, 2014), el sistema inmune de la misma (Lebeis, 2014), los diferentes compartimentos de la planta (Zarranoindia *et al.*, 2015; Fonseca-García *et al.*, 2016) y desde luego, por las interacciones con el ambiente (Schlaeppli *et al.*, 2014; Zhang & Yao, 2015). Debido a

esto, uno de los objetivos de nuestro estudio fue analizar el efecto de factores bióticos (tipo de muestra, especie hospedera) y abióticos (estacionalidad y localización geográfica) sobre las comunidades microbianas asociadas con las agaváceas de nuestro interés. A partir de dicho análisis, determinamos que el microbioma de los agaves es definido mayoritariamente por dos factores: el tipo de muestra y la biogeografía de la planta hospedera (Fig. 6.13). No obstante, estos dos factores afectan de forma diferencial a las comunidades procariontes y fúngicas (Fig. 6.13).

Las comunidades procariontes fueron afectadas mayormente por el tipo de muestra, de hecho observamos una clara diferencia entre las comunidades epífitas y endófitas y de estas en comparación con las comunidades provenientes del suelo (suelo y suelo asociado a raíz). Este resultado es consistente con estudios realizados en comunidades bacterianas asociadas directa (epífitas y endófitas, Marasco *et al.*, 2013; Zarranoindia *et al.*, 2015) o indirectamente (suelo, Zarranoindia *et al.*, 2015) con plantas no CAM de zonas semiáridas, donde el tipo de muestra ejerce una clara influencia sobre el ensamble de las comunidades. Del mismo modo, en un estudio reciente realizado por Fonseca-García *et al.* (2016) en dos especies de cactáceas que cohabitan con los agaves, el tipo de muestra fue el factor determinante en la composición de las comunidades de *Archaea/Bacteria*, explicando más de 60% de las disimilitudes entre las comunidades analizadas.

Por otro lado, la composición de las comunidades fúngicas asociadas con los agaves fue determinada principalmente por la biogeografía de la especie hospedera (Fig. 6.13). Se ha observado que en las comunidades fúngicas, los taxones con distribución global son poco comunes, de hecho su composición parece estar afectada por las condiciones ambientales locales (Meiser *et al.*, 2014; Zhang & Yao, 2015). Al

parecer las comunidades fúngicas presentan patrones biogeográficos similares a los de macroorganismos (Meiser *et al.*, 2014; Talbot *et al.*, 2014), relacionando directamente el efecto de la distancia geográfica sobre el ensamble de las mismas con las limitaciones en la dispersión (Peay *et al.*, 2007; Shakya *et al.*, 2013; Talbot *et al.*, 2014). De modo que la divergencia entre las comunidades fúngicas es mayor conforme la distancia geográfica aumenta (Meiser *et al.*, 2014), tal es el caso de las diferencias observadas entre las comunidades fúngicas asociadas con *A. deserti*, colectado en California a más de 2000 km de distancia, y aquellas asociadas con los agaves colectados en México. El efecto de la biogeografía sobre las comunidades fúngicas ha sido reportado en otras plantas de zonas áridas como *Artiplex* spp. (no CAM), cuyas comunidades fueron evaluadas en tres regiones áridas distintas, dos en Jordania y una en Nuevo México, mostrando una clara disimilitud entre los sitios geográficamente más distantes (Tahtamouni *et al.*, 2016).

Asumiendo que los microorganismos que son abundantes pueden tener un papel importante en la funcionalidad del microbioma para las plantas (Shade & Handelsman, 2012), utilizamos el concepto de Pareto para identificar los microorganismos con un rol clave, es decir aquellos que constituyeron al menos el 80% de la abundancia relativa de las comunidades microbianas asociadas a las tres especies de *Agave*.

En el caso de las comunidades procariontes, observamos que los taxones clave registrados para los agaves pertenecen a los mismos *phyla* (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*) detectados en otras plantas CAM que cohabitan con los agaves (Fonseca-García *et al.*, 2016), plantas no CAM de zonas áridas (Marasco *et al.*, 2013; Zarraonaindia *et al.*, 2015; Tahtamouni *et al.*, 2016), y plantas desarrolladas en condiciones ambientales distintas a las agaváceas (Lundberg

*et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2015; Edwards *et al.*, 2015). No obstante, diferentes taxones, al interior de cada *phylum*, fueron dominantes entre las especies vegetales. Mientras que los compartimentos endófitos (hoja y raíz) de los agaves estuvieron dominados por las clases *Gammaproteobacteria* (Orden *Enterobacteriales*), *Alphaproteobacteria* (Orden *Rhizobiales*), *Bacillales* (Orden *Bacilli*) y *Actinobacteria* (Orden *Actinomycetales*); taxones como *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales* (Clase *Gammaproteobacteria*, Lundberg *et al.*, 2012; Zarraonaindia *et al.*, 2015), *Burkholderiales* (Clase *Betaproteobacteria*, Lundberg *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2015), *Sphingobacteria*, *Flavobacteria* (*phylum Bacteroidetes*, Bulgarelli *et al.*, 2015; Fonseca-García *et al.*, 2016) y *Oscillatoriothycideae* (*phylum Cyanobacteria*, Fonseca-García *et al.*, 2016) dominaron las comunidades directamente asociadas con las otras especies vegetales. Esto sugiere que aunque existen factores que se conservan a lo largo de los distintos ambientes y que influyen de forma similar en la composición de las comunidades bacterianas (nivel de *phylum*), las variaciones a niveles taxonómicos más específicos en dichas comunidades sugieren un efecto de selección ejercido por la planta (Mendes *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2014). El efecto de selección de la planta sobre las comunidades bacterianas puede estar relacionado con los exudados radicales, ya que a través de estos exudados las plantas liberan diferentes nutrientes que pueden influir en la composición y diversidad de dichas comunidades (Haichar *et al.*, 2008; Bever *et al.*, 2012). Además es importante considerar que la composición de los exudados radicales es diferente entre especies o variedades vegetales (Costa *et al.*, 2006).

Con respecto a las comunidades endófitas fúngicas asociadas con los agaves, éstas estuvieron dominadas por los órdenes *Pleosporales*, *Capnodiales* (Clase *Dothideomycetes*), *Eurotiales* (Clase *Eurotiomycetes*) de forma similar a otras plantas CAM que cohabitan con los agaves como *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta* (Fonseca-García *et al.*, 2016), y plantas no CAM de zonas áridas como *Atriplex* ssp. (Tahtamouni *et al.*, 2016;), *Phoenix dactylifera* (Ben-Chobba *et al.*, 2013), pastos perennes (Porrás-Alfaro *et al.*, 2011) y *Yucca glauca* (Khidir *et al.*, 2010), donde principalmente taxones del orden *Pleosporales*, además de otros miembros de la clase *Dothideomycetes*, fueron los endófitos más abundantes. Sin embargo, difieren notablemente de los taxones endófitos más abundantes en zonas tropicales (Arnold & Luzotoni, 2007) y templadas (U'Ren *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2005), donde taxones de las clases *Sordariomycetes* (Arnold & Luzotoni, 2007; U'Ren *et al.*, 2012), *Pezizomycetes* (U'Ren *et al.*, 2012) y *Leotiomycetes* (O'Brien *et al.*, 2005) fueron más abundantes. Lo anterior es consistente con la idea de que las comunidades fúngicas son influenciadas de manera importante por las condiciones ambientales presentes en diferentes regiones geográficas (Meiser *et al.*, 2014; Talbot *et al.*, 2014; Zhang & Yao, 2015), es decir que factores como el clima y la dispersión limitada restringen la distribución de los taxones fúngicos.

Por otra parte, el análisis de Pareto reveló que en las comunidades microbianas epífitas y endófitas asociadas con *A. tequilana* existe un menor número de OTUs clave en comparación con aquellas asociadas con los agaves silvestres: *A. salmiana* y *A. deserti*. A pesar de las diferencias entre la especie de *Agave* cultivada y las silvestres, nuestro análisis mostró que existe un grupo de taxones bacterianos y fúngicos que están presentes en las comunidades microbianas asociadas con las tres especies de

*Agave* estudiadas, no obstante estos taxones comunes presentaron variaciones en su distribución entre los tres agaves. Lo anterior es consistente con estudios recientes realizados en *Arabidopsis thaliana* (Schlaeppi *et al.*, 2014; Haney *et al.*, 2015), *Hordeum vulgare* (Bulgarelli *et al.*, 2015) y especies cercanas a ambas, donde se observaron tanto taxones asociados de forma específica así como otros compartidos entre las diferentes especies de plantas. Por otra parte observamos que, a diferencia de las comunidades procariontes epífitas y endófitas, las comunidades de suelo no fueron significativamente diferentes entre el agave cultivado y los agaves silvestres. En contraste, las comunidades fúngicas provenientes del suelo asociadas con *A. tequilana* presentaron un menor número de taxones clave en comparación con las asociadas con *A. salmiana* y *A. deserti*.

Como ya hemos mencionado, los agaves son plantas que se desarrollan en zonas áridas, caracterizadas por largos periodos de sequía (seis meses o más). De hecho, nuestro análisis nos mostró que las comunidades microbianas endófitas, si bien fueron afectadas por la biogeografía de la planta hospedera, se vieron más influenciadas por el compartimento de la planta del que provenían y por las variaciones propias de las estaciones de secas y lluvias. Esta tendencia fue similar tanto para los datos obtenidos del análisis de DGGE como para aquellos resultados de la secuenciación etiquetada.

Considerando lo anterior y dadas las condiciones del hábitat de las comunidades endófitas (interior de la planta), fue interesante observar que, al menos en el caso de las comunidades procariontes, existe un grupo de taxones dentro de los agaves que incrementan su abundancia durante la época de sequía. Esto es consistente con estudios recientes donde se sugiere que las condiciones ambientales extremas, como las que existen en las zonas áridas, podrían tener un papel importante en el ensamble

de las comunidades procariontes endófitas (Marasco *et al.*, 2012; Zhang & Yao; 2015). Por otro lado, observamos que en el caso de las comunidades fúngicas, aunque existe un grupo endófito de taxones que se comparte durante la estación de secas, su abundancia no se ve significativamente afectada por las condiciones de sequía.

Adicionalmente, observamos que el número de taxones tanto bacterianos como fúngicos compartido entre los agaves durante la época de secas fue mayor en las comunidades de endósfera de raíz en comparación con la endósfera de hoja. Sería interesante analizar si el mayor número de taxones compartidos en la zona radical bajo condiciones de sequía, puede estar relacionado con un efecto de selección de la planta diferencial entre las partes aérea y radical, como consecuencia de la liberación de los exudados radicales y la especificidad de los microorganismos a ciertos compartimentos de la planta.

El análisis y entendimiento del microbioma *central* o *compartido* se considera un paso fundamental en la ecología de las comunidades microbianas, ya que los microorganismos que están compartiéndose entre comunidades diferentes probablemente tienen un papel funcional importante en el ecosistema (Shade & Handelsman, 2012; Shakya *et al.*, 2013). De hecho, algunos de los microorganismos compartidos entre los agaves durante la época de sequía han sido aislados y caracterizados para determinar posibles funciones en la adecuación de las agaváceas estudiadas (Apartado 6.3). Adicionalmente, los genomas de algunas de cepas han sido secuenciados, de modo que el análisis de dichos genomas será de utilidad para entender las interacciones planta-microorganismos y su complejidad en los ecosistemas de zonas áridas.

Nuestro estudio ha sido útil para conocer la composición, diversidad y los factores que determinan el microbioma de los agaves, que en conjunto con otros estudios que estén enfocados al entendimiento de las dinámicas de las comunidades microbianas para colonizar al hospedero, determinar cómo contribuyen las interacciones planta-microorganismo y microorganismo-microorganismo en la conformación de los consorcios microbianos, son el primer paso para lograr una visión integral de la complejidad de la interacción entre las plantas y su microbiota y su repercusión en la estabilidad de los ecosistemas.

## 6.3 Capítulo 3: Potencial funcional en las comunidades microbianas asociadas con *Agave*

---

Algunos de los resultados presentados en este capítulo han sido publicados como parte de:

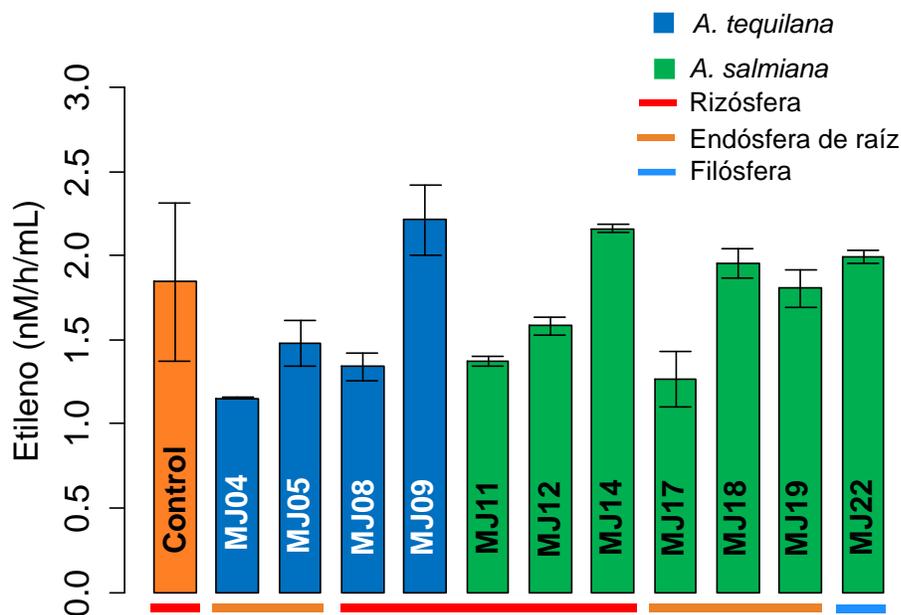
Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabrales JJ & Partida-Martínez LP (2014). **Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species.** *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857.

### **6.3.1 Potencial diazotrófico entre las comunidades microbianas asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana***

Debido a que el nitrógeno es uno de los nutrientes que influye de forma importante en el crecimiento de los agaves (Nobel & Hartsock, 1986; Nobel, 2003), uno de los objetivos de nuestro proyecto fue evaluar el posible potencial diazotrófico entre las comunidades microbianas asociadas con los agaves. A partir del uso de medios de cultivo selectivos libres de nitrógeno logramos aislar 18 cepas de la endósfera de raíz y rizósfera de *A. tequilana* y de la endósfera de raíz, rizósfera y filósfera de *A. salmiana* (Torres-Gómez, 2013).

Las 18 cepas aisladas fueron sometidas al ensayo de reducción de acetileno, de las cuales 11 fueron positivas en dicho ensayo, corroborando su actividad diazotrófica (Fig. 6.26). La caracterización molecular reveló que las cuatro cepas recuperadas de *A. tequilana* fueron miembros de la clase *Gammaproteobacteria*, tres géneros del orden *Enterobacteriales*: *Enterobacter* (2), *Citrobacter* (1) y uno del orden *Xanthomonadales*: *Stenotrophomonas*. Las siete cepas aisladas de *A. salmiana* incluyeron no solamente miembros de la clase *Gammaproteobacteria* como *Enterobacter* (2), *Klebsiella* (1) y *Stenotrophomonas* (1), sino también de la clase *Alphaproteobacteria*: *Belnapia* (1), Bacilli: *Bacillus* (1) y una levadura de la clase *Saccharomycetes*: *Clavispora* (Tabla 6.5). Para la caracterización molecular de las 11 cepas diazótroficas se utilizó el gen 16S rRNA, esto nos permitió comparar las secuencias obtenidas con las secuencias provenientes del análisis de iTags (región V4 del gen 16S rRNA). Esta comparación reveló que cinco de las 11 cepas fueron similares con el OTU 4, cuyo linaje corresponde al género *Leclercia* (Orden *Enterobacteriales*) y se encuentra asociado principalmente (más de 5%) con la epífera y la endósfera de las tres especies de

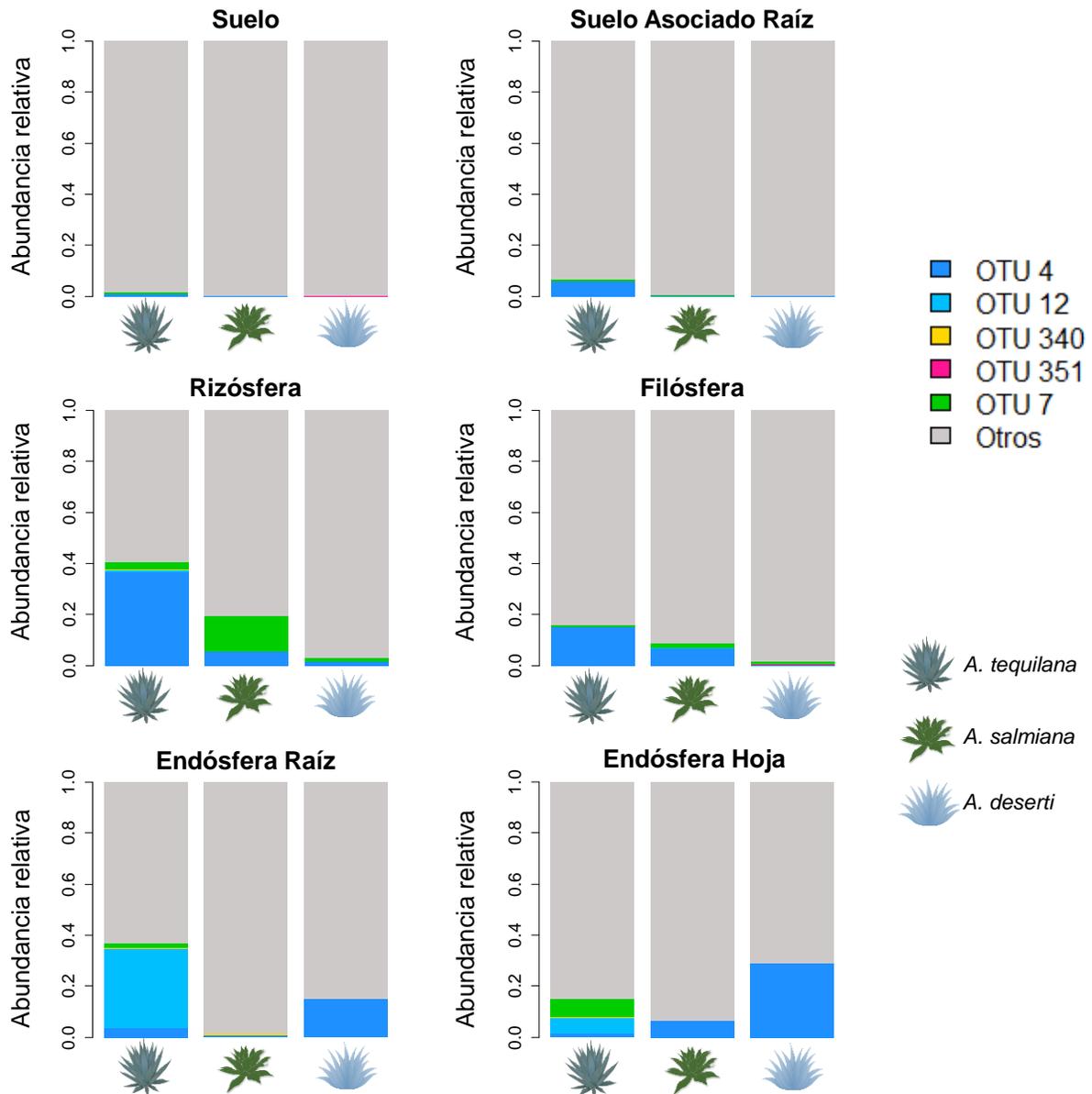
*Agave* estudiadas (Tabla 6.5; Fig. 6.27). Dos de las cepas aisladas coincidieron con el OTU 12, identificado como el género *Stenotrophomonas* (Orden *Xanthomonadales*) y que estuvo asociado principalmente (más de 5%) con las comunidades endófitas de *A. tequilana* (Tabla 6.5; Fig. 6.27). Las tres cepas bacterianas restantes fueron similares a tres OTUs distintos: los OTUs bacterianos 7, 340 y 351 cuyo linaje corresponde a los géneros *Bacillus* (Orden *Bacillales*), *Trabulsiella* (Orden *Enterobacteriales*) y *Roseomonas* (Orden *Rhodospirillales*) (Tabla 6.5; Fig. 6.27). Finalmente, la levadura aislada de la rizósfera de *A. salmiana* fue similar al OTU fúngico 1745 identificado únicamente como *Fungi*. El OTU 1745 estuvo presente en las comunidades fúngicas de endósfera de hoja, filósfera, rizósfera y suelo asociadas con *A. tequilana*, en las seis comunidades asociadas con *A. salmiana* y sólo estuvo presente en las comunidades de rizósfera y suelo asociado a raíz asociadas con *A. deserti*. En todos los casos la abundancia relativa del OTU 1745 representó menos de 0.5%.



**Figura 6.26** Producción de etileno en cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* que fueron positivas en el ensayo de reducción de acetileno.

**Tabla 6.5** Cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* positivas en el ensayo de reducción de acetileno

ID	Cepa	Origen	OTU en iTags 99% identidad
MJ04	<i>Citrobacter murlinae</i>	<i>A. tequilana</i> endo raíz	OTU 4
MJ05	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>A. tequilana</i> endo raíz	OTU 4
MJ08	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	<i>A. tequilana</i> rizósfera	OTU 12
MJ09	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>A. tequilana</i> rizósfera	OTU 4
MJ11	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	OTU 7
MJ12	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	OTU 1745
MJ14	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	OTU 4
MJ17	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	OTU 12
MJ18	<i>Enterobacter sacchari</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	OTU 340
MJ19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	OTU 4
MJ22	<i>Belnapia rosea</i>	<i>A. salmiana</i> filósfera	OTU 351



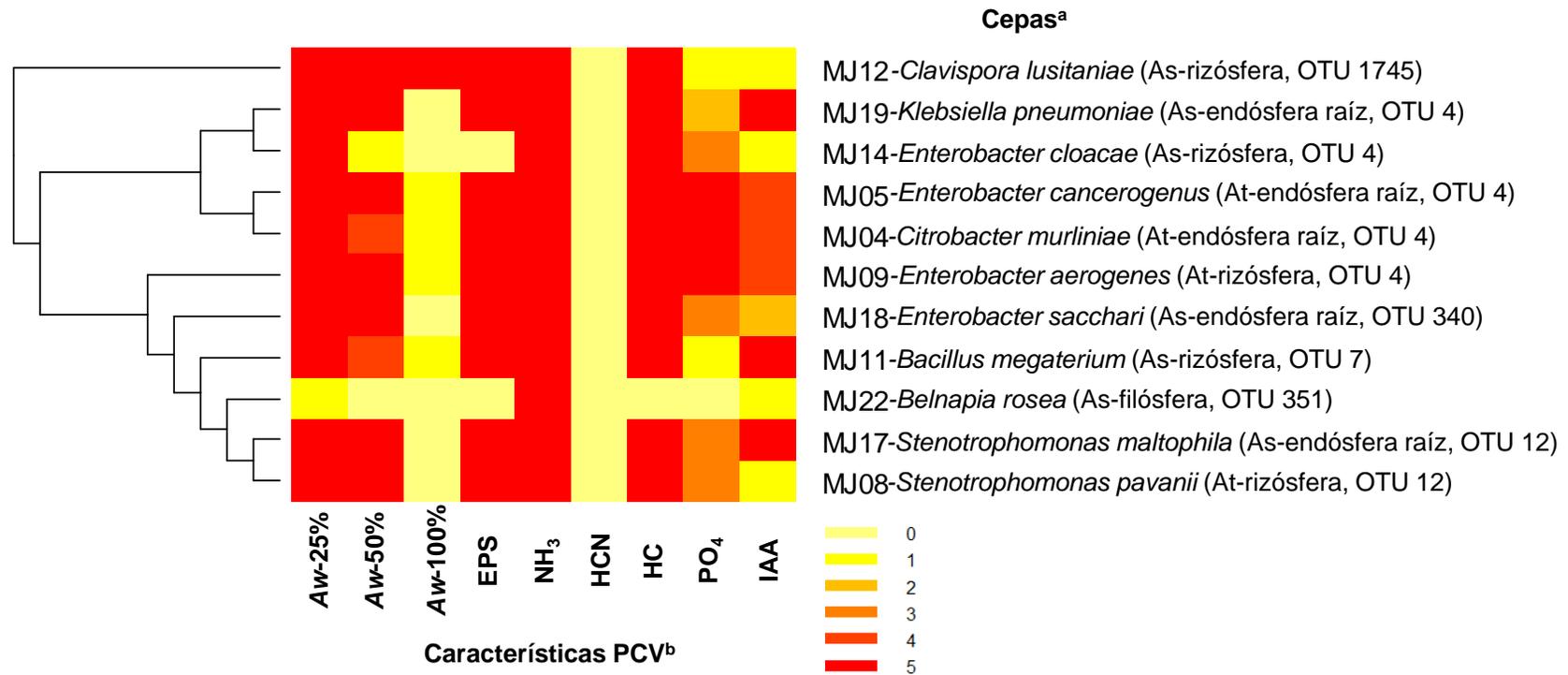
**Figura 6.27** Abundancia relativa de los OTUs bacterianos que fueron coincidentes (99% de identidad) con las cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* que fueron positivas en el ensayo de reducción de acetileno, en las seis comunidades asociadas con las tres especies de *Agave* estudiadas.

### **6.3.2 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal asociados con *A. tequilana* y *A. salmiana***

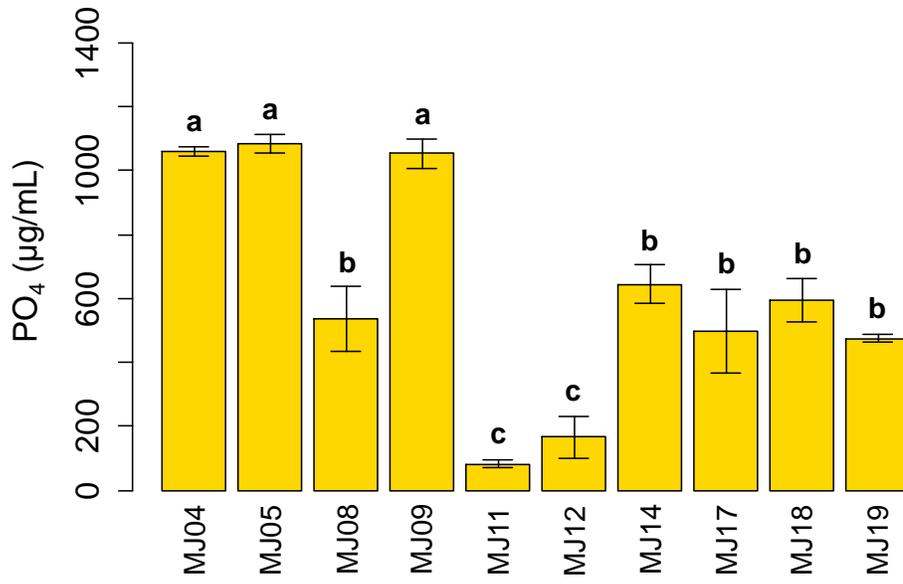
Para determinar el potencial de promoción del crecimiento vegetal (PCV) en los microorganismos asociados con los agaves, se seleccionaron las 11 cepas que fueron positivas en el ensayo de reducción de acetileno (Tabla 6.5). Estas cepas se sometieron a un conjunto de pruebas para determinar características de PCV *in vitro*, enfocadas tanto a las características comunes de PCV como aquellas relacionadas con la tolerancia a sequía (Apéndice F, Fig. 6.28).

Con respecto a la tolerancia a sequía, se evaluaron dos características: la capacidad de crecimiento de las cepas en un medio con tres diferentes niveles de reducción de disponibilidad de agua ( $A_w$ ) y la producción de exopolisacáridos (EPS). Las 11 cepas evaluadas lograron crecer en el medio con el 25% de reducción en  $A_w$ , pero sólo la cepa MJ12 (*Clavispora lusitanae*) proveniente de la rizósfera de *A. salmiana* logró crecer en el medio con 100% de reducción en  $A_w$ , a un nivel similar al crecimiento obtenido en el medio control (TSA sin adición de sorbitol). La segunda característica evaluada para determinar la capacidad de tolerancia a sequía fue la producción de EPS, esta característica se asocia con un incremento en la retención de humedad, la estimulación en la producción de exudados radicales y la protección de raíces contra daños mecánicos debidos a la rigidez del suelo ocasionada por sequía (Rolli *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013, Alami *et al.*, 2010). De las 11 cepas evaluadas, nueve cepas presentaron el halo con apariencia limosa característico de la producción de EPS y además fueron positivas en la prueba de tinción con azul alcian, lo que confirma la capacidad de producir EPS en estas cepas (Apéndice F, Fig. 6.28).

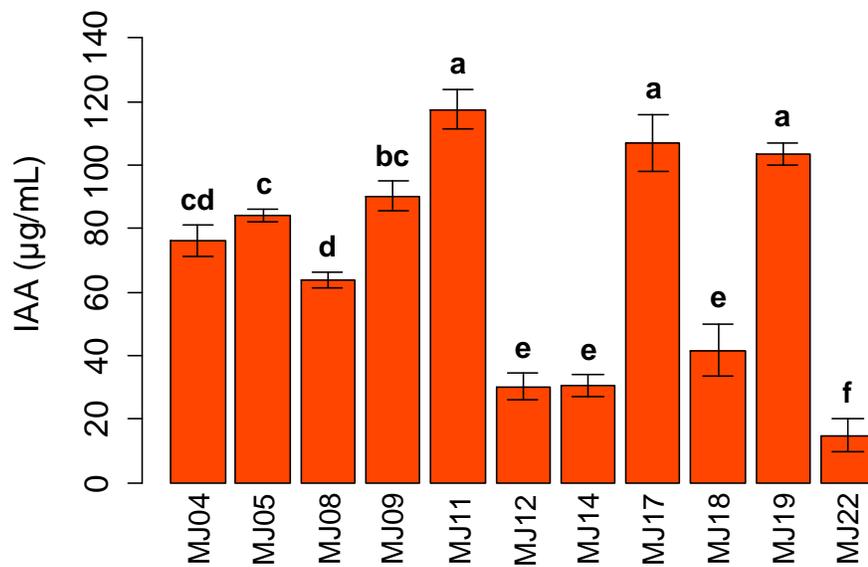
Por otro lado, observamos que la mayoría de las cepas analizadas presentan potencial para promover el crecimiento vegetal de forma indirecta a través de la producción de amonio y la hidrólisis de celulosa, y de forma directa por medio de la solubilización de fosfatos y la producción de ácido indolacético (Fig. 6.28). Específicamente observamos que, aunque casi todas las cepas fueron capaces de solubilizar fosfatos, MJ04 (*Citrobacter murlinae*), MJ05 (*Enterobacter cancerogenus*) y MJ09 (*Enterobacter aerogenes*), aisladas de *A. tequilana*, presentaron mayor capacidad de solubilización (Apéndice F, Fig. 6.28-6.29), siendo diferentes del resto de las cepas evaluadas (ANOVA:  $F_{9, 20} = 86.33$ ,  $R_2 = 0.9636$ ,  $P = 4.997e-14$ ; Fig. 6.29). En el caso de la producción de ácido indolacético (IAA), se observó una diferencia significativa entre las cepas MJ11 (*Bacillus megaterium*), MJ17 (*Stenotrophomonas maltophila*) y MJ19 (*Klebsiella pneumoniae*), aisladas de *A. salmiana*, y el resto de las cepas evaluadas (ANOVA:  $F_{10, 22} = 130.9$ ,  $R_2 = 0.976$ ,  $P = 2.2e-16$ , Fig. 6.30), ya que dichas cepas fueron las que presentaron una mayor producción de IAA (Apéndice F, Fig. 6.28).



**Figura 6.28** Filogenia de las 11 cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* con un *heatmap* de la actividad registrada para las diferentes características promotoras del crecimiento vegetal evaluadas. La escala de colores representa valores 0-5, donde 0 representa actividad nula o ausente y 5 se refiere al valor más alto de actividad. <sup>a</sup>Entre paréntesis se indica el origen de aislamiento de la cepa: As= *A. salmiana*, At= *A. tequilana*, y el OTU coincidente dentro de las comunidades asociadas con los agaves, detectadas con los iTags. <sup>b</sup>Características de promoción del crecimiento vegetal (PCV): Aw= disponibilidad de agua reducida de forma gradual (25-100%), EPS= producción de exopolisacáridos, NH<sub>3</sub>= producción de amonio, HCN= producción de cianuro de hidrógeno, PO<sub>4</sub>= solubilización de fosfatos, IAA= producción de ácido indolacético.



**Figura 6.29** Cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* solubilizadoras de fosfatos. Diferencias de acuerdo al ANOVA:  $F_{9, 20} = 86.33$ ,  $R_2 = 0.9636$ ,  $P = 4.997e-14$ . Letras distintas indican diferencias significativas.



**Figura 6.30** Cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* productoras de ácido indolacético. Diferencias de acuerdo al ANOVA:  $F_{10, 22} = 130.9$ ,  $R_2 = 0.976$ ,  $P = 2.2e-16$ . Letras distintas indican diferencias significativas.

### **6.3.3 Microorganismos promotores del crecimiento vegetal aislados de *Agave* y su efecto sobre *A. tequilana***

Considerando los resultados obtenidos del ensayo de reducción de acetileno, la caracterización de PCV y la determinación de tolerancia a sequía de las diferentes cepas analizadas, decidimos evaluar el efecto de las mismas sobre el desarrollo de plantas de *A. tequilana*. Para esto, se estableció un experimento a nivel de campo en un predio de cultivo comercial con plantas de *A. tequilana* de dos años de edad. En dicho experimento se evaluaron las 11 cepas, previamente caracterizadas, de forma individual y en consorcios, además de dos controles, de modo que se establecieron 24 tratamientos diferentes (Tabla 5.2).

Las plantas de *A. tequilana* son de crecimiento lento y alcanzan la etapa de madurez agronómica entre los cinco y siete años después de ser plantadas (Ruiz-Corral, 2007). Debido a esto y a que nuestro experimento se realizó en plantas con apenas dos años de edad, decidimos evaluar de forma preliminar el efecto de la inoculación de las diferentes cepas en las plantas de *A. tequilana* a través de un análisis de huella metabólica. Este tipo de análisis es reconocido por ser una forma eficiente de evaluar muestras fitoquímicas complejas, como los extractos crudos de plantas (Goodacre *et al.*, 2003), es utilizado de forma común para fenotipar metabólicamente (Montero-Vargas *et al.*, 2013; García-Flores *et al.*, 2015) y conocer el estadio fisiológico de las plantas (Maier *et al.*, 2010; García-Flores *et al.*, 2012).

A partir de dicho análisis se pudo generar un mapa metabólico con el cual se detectaron las similitudes o diferencias entre los perfiles de los 24 tratamientos evaluados (Fig. 6.31). Dicho mapa está basado en la intensidad detectada para cada

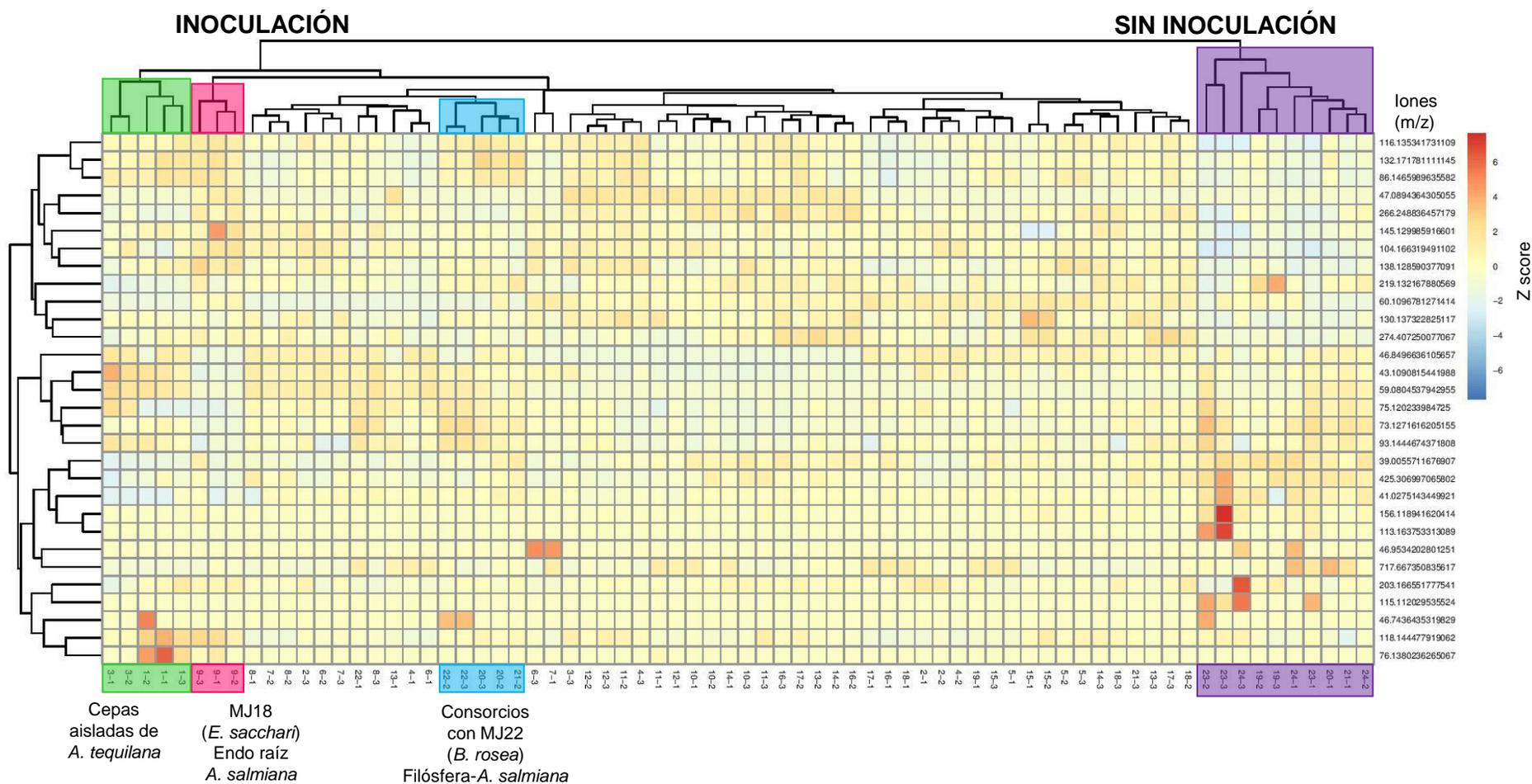
uno de los metabolitos (iones) y su variación en los perfiles metabólicos de los diferentes tratamientos.

El mapa metabólico mostró que los perfiles de los tratamientos que recibieron algún tipo de inoculación, ya fuera individual o en consorcio, fueron similares entre sí y formaron un grupo distinto al conjunto de tratamientos que no recibió ningún tipo de bioinoculante (Fig. 6.31). Particularmente, observamos que en el grupo de los tratamientos inoculados se formaron algunos subgrupos que resultan interesantes, por ejemplo el subgrupo formado por los tratamientos 20, 21 y 22 (Tabla 5.2). Estos tratamientos están constituidos por consorcios que incluyen todas las cepas aisladas tanto de endósfera de raíz como de rizósfera de *A. tequilana* y *A. salmiana* pero en combinación con la cepa MJ22 (*Belnapia rosea*), cuyo origen es la filósfera de *A. salmiana* (Tabla 5.2). Los tratamientos 20, 21 y 22 son consorcios similares a los tratamientos 17, 18 y 19 ya que incluyen las mismas cepas, excepto que estos últimos no incluyen la cepa MJ22 (*Belnapia rosea*). Sin embargo, los tratamientos 17, 18 y 19 no mostraron ser similares entre sí, de igual forma el tratamiento 11, inoculado únicamente con la cepa MJ22 (*Belnapia rosea*), no se agrupó entre sí o con otros tratamientos (Fig. 6.31).

Del mismo modo, observamos otro subgrupo formado exclusivamente por las muestras del tratamiento 9 (Fig. 6.31), el cual fue inoculado con la cepa MJ18 (*Enterobacter sacchari*), proveniente de la endósfera de raíz de *A. tequilana*. Aunque la cepa MJ18 (*Enterobacter sacchari*) no dio los mejores resultados en la caracterización de la promoción del crecimiento vegetal (Apéndice F, Fig. 6.28), si resultó ser una de las cepas positivas en el ensayo de reducción de acetileno (Fig. 6.26). El resto de los

tratamientos no presentaron un patrón de agrupamiento de acuerdo a los perfiles metabólicos observados (Fig. 6.31).

En general, el análisis de huella metabólica mostró que la inoculación biológica ejerce un efecto en los metabolitos producidos en el tejido foliar de *A. tequilana*, sin embargo es necesario realizar otros estudios para identificar estos metabolitos, saber si son precursores de compuestos relevantes y determinar si el efecto observado está en realidad relacionado con el desarrollo, la salud y la productividad de las plantas *A. tequilana*.



**Figura 6.31** Mapa metabólico de las muestras de tejido foliar de plantas de *A. tequilana* provenientes de los 24 tratamientos establecidos en campo (n=3/tratamiento). Se muestran los diferentes agrupamientos formados de acuerdo al perfil de metabolitos detectado. La descripción detallada de cada uno de los tratamientos puede consultarse en la (Tabla 5.3).

#### 6.3.4 Discusión

En nuestro estudio logramos aislar 11 microorganismos de las comunidades de rizósfera, endósfera de raíz y filósfera asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Dichos microorganismos se determinaron como potenciales diazótrofos y promotores del crecimiento vegetal.

Las cepas diazótroficas aisladas de los agaves incluyeron mayormente miembros de la clase *Gammaproteobacteria*, principalmente de los género *Enterobacter* lo que difiere de otros estudios realizados en plantas CAM como *Mamillaria fraileana* (López *et al.*, 2011), y no CAM de zonas semiáridas como *Lolium multiflorum* (Castanheira *et al.*, 2014) y *Prosopis strombulifera* (Sgroy *et al.*, 2009), de donde se aislaron principalmente cepas de los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* (Clase *Gammaproteobacteria*) y *Bacillus* (Clase *Bacilli*). Esto es consistente con la idea de que el efecto de selección de la planta en combinación con condiciones ambientales de clima y suelo están mediando la selección y reclutamiento de los microorganismos asociados con las plantas (Mendes *et al.*, 2013; Soussi *et al.*, 2015).

Las cepas confirmadas como diazótroficas en el ensayo de reducción de acetileno aisladas de *A. salmiana* fueron siete y pertenecen a cuatro grupos taxonómicos diferentes. En comparación, las cepas recuperadas de *A. tequilana* fueron cuatro y pertenecen a un solo grupo taxonómico. Este resultado puede estar relacionado directamente con la reducción de la diversidad observada en las comunidades asociadas con *A. tequilana*. Una de las cepas con actividad diazotrófica confirmada, MJ22 (*Belnapia rosea*), fue aislada de la filósfera de *A. salmiana*, sugiriendo la posibilidad de que en el caso de los agaves, la fijación biológica de nitrógeno tiene lugar no sólo en la zona radical sino también en la parte aérea de la planta. Adicionalmente,

MJ22 (*B. rosea*) resulta de interés ya que algunos estudios han demostrado que algunas cepas de *Belnapia* spp., presentes en la capas endurecidas del suelo, pueden estar involucradas en el ciclo del carbono en suelos de zonas áridas pobres en nutrientes (Csotonyi *et al.*, 2010). Otra de las cepas que fue positiva en el ensayo de reducción de acetileno fue la levadura MJ12 (*Clavispora lusitaniae*), lo que resulta de interés ya que la fijación de nitrógeno generalmente se atribuye a organismos procariontes (Kneip *et al.*, 2007). El potencial diazotrófico en esta levadura puede considerarse como el resultado de dos procesos distintos: la transferencia horizontal de genes relacionados con la fijación de nitrógeno o la asociación simbiótica con organismos procariontes que realicen dicho proceso. En este último caso, en un estudio reciente realizado por Ruiz-Herrera *et al.* (2015), se reportó por primera vez la asociación endosimbiótica de fijación de nitrógeno que involucra al hongo patógeno del maíz *Ustilago maydis* y a la bacteria endosimbionte *Bacillus pumilus*. Considerando lo anterior, creemos que sería pertinente realizar estudios moleculares enfocados en la búsqueda de diferentes genes relacionados con la enzima nitrogenasa y el gen 16S rRNA para confirmar la actividad diazotrófica de la cepa MJ12 (*Clavispora lusitaniae*) y determinar los procesos involucrados en este fenómeno.

En el caso de la caracterización de la promoción del crecimiento vegetal (PCV), una de las características analizadas fue la solubilización de fosfatos, considerada como una característica importante, ya que el fósforo es uno de los macronutrientes limitantes del desarrollo de los agaves y se obtiene del suelo en forma de fosfatos (Nobel, 2003). Los niveles de fósforo en el tejido foliar de los agaves es usualmente bajo en comparación con otras plantas de interés agronómico (Nobel, 2003). Este elemento es importante en la división celular, degradación de azúcares y transferencia

de nutrientes, entre otros procesos (Behera *et al.*, 2013). Dentro de los microorganismos solubilizadores de fosfatos, los géneros bacterianos más importantes son *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Enterobacter* (Behera *et al.*, 2013, Rodríguez & Fraga, 1999). En nuestro estudio las mejores solubilizadoras fueron las cepas MJ04 (*Citrobacter murlinae*), MJ05 (*Enterobacter cancerogenus*) y MJ09 (*E. aerogenes*). Los niveles de solubilización que observamos fueron mayores que los registrados en la literatura para cepas de las mismas especies aisladas en zonas silvestres subtropicales y áreas cultivadas (Chen *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2004).

Otra de las características evaluadas fue la producción de ácido indolacético (IAA). El IAA es una de las auxinas fisiológicamente más activas incrementando la longitud y número de raíces, lo que está directamente relacionado en la adquisición de nutrientes por parte de la planta (Mohite, 2013). En nuestro estudio observamos que de las cepas evaluadas, tres presentaron niveles significativamente mayores de producción de ácido indolacético (más de 100 µg/mL), estas cepas fueron MJ11 (*Bacillus megaterium*), MJ17 (*Stenotrophomonas maltophila*) y MJ19 (*Klebsiella pneumoniae*). Estos niveles fueron similares a los registrados por cepas de los mismos taxones aisladas de la rizósfera de cultivos como maíz, algodón y avena (Mohite, 2013; Marques *et al.*, 2010) e incluso similares con los niveles producidos por los géneros registrados como mayores productores de IAA como *Pseudomonas*, *Enterobacter* y algunas especies de *Rhizobium* (Mu'minah *et al.*, 2015; Mohite, 2013; Sahasrabudhe, 2011).

Con respecto a la evaluación preliminar de la inoculación de las 11 cepas caracterizadas en las plantas de *A. tequilana*, nuestros resultados mostraron un efecto diferencial entre las plantas sometidas a la inoculación biológica y aquellas que no fueron inoculadas con ninguna de las cepas. Particularmente resultó de interés

observar que el grupo de tratamientos cuyos consorcios estuvieron formados por cepas provenientes de la endósfera de raíz y la rizósfera de *A. tequilana* y *A. salmiana*, en combinación con la cepa asociada a la filósfera de *A. salmiana*, mostraron perfiles metabólicos similares. Por el contrario cuando el consorcio de cepas de endósfera de raíz, el consorcio de cepas de rizósfera y la cepa de filósfera se inocularon de forma independiente, no hubo similitudes entre sus perfiles metabólicos. En estudios recientes (Santhanam *et al.*, 2015), se ha reportado que la inoculación de consorcios bacterianos específicos en comparación con inoculaciones individuales, ayudan a incrementar la defensa contra algunas enfermedades fúngicas. Sin embargo, nuestro análisis del efecto de la inoculación biológica no provee aún evidencia suficiente para determinar si las cepas inoculadas están afectando el desarrollo, la salud y la productividad de las plantas de *A. tequilana*. Es necesario realizar otros estudios que proporcionen evidencia sobre aspectos primordiales como la capacidad de las cepas inoculadas para colonizar las plantas de *A. tequilana*, parámetros importantes para la industria como el contenido de azúcares en estas plantas o aspectos agronómicos como el contenido de macronutrientes (N, P, K) o la incidencia de enfermedades en el cultivo.

Las 11 cepas aisladas de *A. tequilana* y *A. salmiana* poseen características promotoras del crecimiento y de tolerancia a sequía y recientemente los genomas de estas cepas han sido secuenciados. Los datos obtenidos de estos genomas, además de la evaluación del efecto de la inoculación biológica en las plantas, nos ayudarán a entender el tipo de interacciones que estas cepas establecen con los agaves y si juegan un papel importante en la adecuación de estas plantas a su ambiente.

## 7 Conclusiones

Nuestro estudio provee un análisis de la composición y diversidad tanto de las comunidades procariontes como de las comunidades fúngicas asociadas con seis compartimentos distintos de tres especies de *Agave*, y determina los factores que influyen en el ensamble de dichas comunidades. Adicionalmente, aislamos algunos microorganismos que fueron caracterizados como promotores del crecimiento vegetal y tolerantes a sequía.

Encontramos que las comunidades procariontes están conformadas principalmente por miembros de los *phyla* *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que las comunidades fúngicas se componen principalmente de los *phyla* *Ascomycota* y *Basidiomycota*. Nuestro diseño experimental nos permitió determinar que el tipo de comunidad y la especie hospedera fueron los factores que tuvieron una mayor influencia en el ensamble de las comunidades microbianas asociadas con los tres agaves. Estos factores influyeron de manera diferencial a las comunidades procariontes y fúngicas, mientras que el tipo de muestra fue el factor determinante en las comunidades procariontes, las comunidades fúngicas estuvieron determinadas por la biogeografía de la especie hospedera. Esta diferencia en la influencia de los factores puede estar relacionada con la dispersión limitada de los hongos, apoyando la idea de que los taxones fúngicos distribuidos de manera global son poco comunes: “no todos los hongos están en todos lados”.

Los resultados de nuestro estudio muestran una reducción en la diversidad de las comunidades microbianas asociadas con *A. tequilana*, la especie cultivada, en comparación con *A. salmiana* y *A. deserti*, las especies silvestres. Aunque se ha

reportado que las prácticas agrícolas, características de un monocultivo como *A. tequilana*, pueden alterar la diversidad microbiana, nuestro diseño experimental no provee evidencia suficiente para adjudicar la disminución de la diversidad al manejo agronómico.

A pesar de las diferencias encontradas entre las comunidades microbianas asociadas con los agaves, detectamos la presencia de microorganismos clave (análisis de Pareto) que son comunes en los tres agaves, sugiriendo que las tres especies de *Agave* pueden estar actuando de manera similar con su microbiota en cierto nivel. Aunado a esto se confirmó, en el caso de las comunidades procariontes, la existencia de un grupo de microorganismos endófitos que incrementan su abundancia en la época de secas. Adicionalmente, se aisló un conjunto de 11 cepas de las comunidades de endósfera de raíz, rizósfera y filósfera asociadas con *A. tequilana* y *A. salmiana*. Estas cepas son diazótrofes potenciales, poseen características promotoras del crecimiento vegetal y tolerancia a sequía. Esto representa un acervo microbiológico importante para la realización de estudios funcionales en planta.

En conclusión, nuestro estudio representa el primer paso para lograr una visión integral de la interacción entre los agaves y su microbiota, lo que nos permitirá entender cómo estas interacciones participan en la adecuación de estas plantas a su ambiente.

## 8 Perspectivas

Aunque nuestro estudio hace aportaciones importantes sobre la estructura de las comunidades microbianas asociadas con los agaves, los factores que determinan dichas comunidades y el potencial funcional dentro de ellas, es necesario resolver otras preguntas que nos ayuden a comprender de una manera más profunda las interacciones planta-microorganismo y cuáles de estas interacciones poseen roles centrales en el desarrollo, la salud y la productividad de las plantas.

De manera inicial, la anotación de los genomas y metagenomas, que se encuentran en proceso, podrían proporcionar información con respecto a funciones diferenciales entre los microorganismos asociados con *A. tequilana* y *A. salmiana*. De modo que se pueda determinar si estas funciones están asociadas con la adaptación de la planta nativa a condiciones de sequía extrema o si son importantes en la defensa contra patógenos, y si existen funciones conservadas entre la especie nativa y la cultivada que jueguen un rol central en la adecuación.

El estudio de las interacciones planta-microorganismo en ambientes naturales representa un reto debido al grado de complejidad de las comunidades microbianas silvestres. Reducir la complejidad de las comunidades microbianas es un enfoque interesante que nos permitiría descifrar el papel de ciertas interacciones en la adecuación de las plantas, como por ejemplo los experimentos que involucran el trasplante de individuos a suelos con una microbiota más simple en comparación con la nativa. Es probable que este tipo de experimentos puedan aportar argumentos que nos ayuden a comprender si el manejo agronómico tiene un papel preponderante en la

disminución de la diversidad microbiana, como la que observamos en las comunidades asociadas con el monocultivo de *A. tequilana*.

Considerando que los agaves se reproducen principalmente de manera vegetativa, por lo que es probable que exista transmisión vertical de microorganismos, sería interesante analizar el microbioma de estas plantas en términos de una sucesión temporal a lo largo del desarrollo de las mismas. Adicionalmente con ayuda de un análisis de transcriptoma de ciertas etapas bajo condiciones de estrés, sería posible determinar que grupos de microorganismos están interactuando con la planta de forma importante para lograr la adecuación de la misma a su ambiente.

Con respecto al conjunto de cepas aisladas que mostraron características de promoción del crecimiento vegetal (PCV) y considerando que se encuentran en asociación con plantas de zonas áridas, resulta de interés evaluar, si a nivel de planta, la actividad de PCV se presenta en las cepas como una característica *per se* o como un efecto inducido bajo condiciones de estrés por sequía.

Estos estudios serían útiles para comprender de un modo más profundo las interacciones entre las plantas y su microbiota, además de determinar la importancia de dichas interacciones para la adecuación de la planta. Adicionalmente, podrían derivar en algún desarrollo biotecnológico como la generación de bioinoculantes.

## 9 Referencias

- Alami Y, Achouak W, Marol C & Heulin T (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3393–3398.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Anderson MJ (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32–46.
- Arnold AE & Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88: 541-549.
- Bashan Y, Okon Y & Henis Y (1980) Ammonia causes necrosis in tomato leaves infected by *Pseudomonas tomato* (Okabe) Alstatt. *Physiology and Plant Pathology* 17:111-119.
- Bautista-Cruz A, Martínez-Gallegos V, Martínez-Martínez L & Martínez-Gutiérrez G (2015) Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of *Agave agustifolia* Haw. (maguey espadín). *Pakistan Journal of Botany* 47:1033-1038.
- Bautista-Justo M, García-Oropeza L, Barboza-Corona E & Parra-Negrete LA (2001) El *Agave tequilana* Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria-Universidad de Guanajuato* 11: 26-34.
- Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, Dutta SK & Thatoi HN (2013) Diversity, mechanisms and biotechnology of phosphate solubilizing microorganisms in mangrove—A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 97-110.

- Ben-Chobba I, Elleuch A, Ayadi I, Khannous L, Namsi A, Cerqueria F, Drira N, Gharsallah N & Vallaeyts T (2013) Fungal diversity in adult palm (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 14: 1084-1099. doi:10.1631/jzus.B1200300
- Berg G, Grube M, Schloter M & Smalla K (2014) Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* 5: 1 doi 10.3389/fmicb.2014.00148
- Bever JD, Platt TG & Morton ER (2012) Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology* 66: 265–283.
- Bondoso J, Balagué V, Gasol JM & Lage OM (2014) Community composition of the *Planctomycetes* associated with different macroalgae. *FEMS Microbiology Ecology* 88: 445-456.
- Bordenstein SR & Theis KR (2015) Host Biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS One* 13: 1-23 doi:10.1371/journal.pbio.1002226.
- Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppi K, Loren Ver, van Themaat E, Ahmadinejad N, Assenza F, Rauf P, Huettel B, Reinhardt R, Schmelzer E, Peplies J, Gloeckner FO, Amann R, Eickhorst T & Schulze-Lefert P (2012) Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488: 91–95.

- Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Loren Ver, vanThemaat E & Schulze-Lefert P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807–838.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch PC, Weiman A, Dröge J, Pan Y, McHardy AC & Schulze-Lefert P (2015) Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe* 17: 392–403.
- Caballar-Hernández S, Palma-Cruz FJ, Hernández-Cuevas L & Robles C (2013) Arbuscular mycorrhizal potential and mycorrhizal fungi diversity associated with *Agave potatorum* Zucc. in Oaxaca, Mexico. *Ecological Research* 28:217-226.
- Camargo-Ricalde S, Dhillon SS & Jiménez-González C (2003) Mycorrhizal perennials of the Matorral Xerofilo and the Selva Baja Caducifolia communities in the semiarid Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Mycorrhiza* 13: 77–83.
- Čapková K, Hauer T, Řeháková K & Doležal J (2016) Some like it high! Phylogenetic diversity of high-elevation cyanobacterial community from biological soil crusts of Western Himalaya. *Microbial Ecology* 71: 113-123.
- Castanheira N, Dourado AC, Alves PI, Cortés-Pallero AM, Delgado-Rodríguez AI, Prazeres A, Borges N, Sánchez C, Barreto-Crespo MT & Fareleira P (2014) Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. *Microbiological Research* 169: 768–779.
- Castric PA (1975) Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 21:613-618.
- Chaparro JM, Badri DV & Vivanco JM (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal* 8: 790–803.

- Chen YP, Rekha PD, Aurun AB, Shen FT, Lai WA & Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34: 33-41.
- Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H & Sa T (2004) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1970-1974.
- Cline WR (2008) Global warming and agriculture. *Finance and Development* March: 23-27.
- Collins SL, Sinsabaugh RL, Crenshaw C, Green L, Porras-Alfaro A, Stursova M & Zeglin L (2008) Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology* 96: 413-420.
- CONABIO (2006) Mapa *Agave, Mezcales y Diversidad*. 2da Edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G & Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 236-249.
- CRT (2014) Estadísticas por categoría de Tequila y Tequila 100% Agave. <http://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>.
- Cui M & Nobel PS (1992) Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 122: 643-649.
- Csotonyi JT, Swiderski J, Stackebrandt E & Yurkov V (2010) A new environment for aerobic anoxygenic bacteria: biological soil crusts. *Environmental Microbiology Reports* 2: 651–656.

- Davis SC, Dohleman FG & Long SP (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* 3: 68–78.
- Davis SC, LeBauer DS, Long SP (2014) Light to liquid fuel: theoretical and realized energy conversion efficiency of plants using Crassulacean Acid Metabolism (CAM) in arid conditions. *Journal of Experimental Botany* 65: 3471–3478.
- DeAngelis KM, Brodie EL, DeSantis TZ, Andersen GL, Lindow SE, Firestone MK (2008) Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME Journal* 3: 168–178.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P & Andersen GL . (2006) Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied Environ Microbiology* 72: 5069–5072.
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM & Chauhan SM (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159:371-394.
- Duarte S, Cassio F & Pascoal C (2012) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology - Insights from Freshwaters. En: Magdeldin S (ed.), Gel Electrophoresis - Principles and Basics. Rijeka: Intech Europe. pp. 173-196.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C & Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Edgar RC (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* 10: 996–998.

- Edwards KJ (2001) Miniprep procedures for the isolation of plant ADN. En: Karp A, Issac PG, Ingram DS (eds.), *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 22-23.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA & Sundaresan V (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 911–920.
- Ezcurra E, Mellink E, Wehncke E, González C, Morrison S, Warren A, Dent D & Driessen P (2006) Natural history and evolution of the world's deserts. En: Ezcurra E (ed.), *Global deserts outlook*. Nairobi: United Nations Environment Programme. pp. 1-27.
- Fonseca-García C, Coleman-derr D, Garrido E, Visel A, Tringe SG & Partida-Martínez LP (2016) The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host specificity. *Frontiers in Microbiology* 7:150. doi:10.3389/fmicb.2016.00150
- Gaiero JR, McCall CA, Thompson KA, Day NJ, Best AS & Dunfield KE (2013) Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany* 100: 1738–1750.
- Gamalero E & Glick BR (2011) Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. En: Maheshwari DK (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 17-46.
- García-Flores M, Juárez-Colunga S, Montero-Vargas JM, López-Arciniega JAI, Chagolla A, Tiessen A & Winkler R (2012) Evaluating the physiological state of maize (*Zea mays* L.) plants by direct-injection electrospray mass spectrometry (DIESI-MS). *Molecular BioSystems* 8: 1658–1660.

- García-Flores M, Juárez-Colunga S, García-Casarrubias A, Trachsel S, Winkler R & Tiessen A (2015) Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 1042-1052.
- García-Mendoza A (2002) Distribution of *Agave* (*Agavaceae*) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177–187.
- García-Mendoza A (2007) Los agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Moya E, Romero-Manzanares A & Nobel PS (2011) Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy* 3: 4–14.
- Gentry HS (1982) The Agaves of continental North America. Tucson: The University of Arizona Press. 670 p.
- Goodacre R, York EV, Heald JK & Scott IM (2003) Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* 62: 859-863.
- Good-Avila SV, Souza V, Gaut BS & Eguiarte LE (2006) Timing and rate of speciation in *Agave* (*Agavaceae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 9124–9129.
- Gorbushina A (2007) Life on rocks. *Environmental Microbiology* 9: 1613-1631.
- Gordon SA & Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology* 26:192–195.
- Guimaraes DP, Costa FAA, Rodrigues MI & Maugeri F (1999) Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 16:129-139.

- Hacquard S & Schadt CW (2015) Towards a holistic understanding of the beneficial interactions across the *Populus* microbiome. *New Phytologist* 205: 1424-1430.
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T & Achouak W (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal* 2: 1221–1230.
- Hallsworth JE, Nomura Y, & Iwahara M (1998) Ethanol-induced water stress and fungal growth. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86: 451–456.
- Haney CH, Samuel BS, Bush J & Ausubel FM (2015) Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants* 1: 15051.
- Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK & Burns RC (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185–1207.
- Hill MO (1973) Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* 54: 427–432.
- Hilton S, Bennett AJ, Keane G, Bending GD, Chandler D, Stobart R & Mills P (2013) Impact of shortened crop rotation of oilseed rape on soil and rhizosphere microbial diversity in relation to yield decline. *PLoS ONE* 8: e59859.
- Holtum JAM, Chambers D, Morgan T & Tan DKY (2011) *Agave* as a biofuel feedstock in Australia. *GCB Bioenergy* 3: 58-67.
- Huang Y, Niu B, Gao Y, Fu L & Li W (2010) CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26: 680-682.
- Humphreys CP, Franks PJ, Rees M, Bidartondo MI, Leake JR & Beerling DJ (2010) Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants. *Nature Communications* 1: 1-7.

- Huntenmann M, Ivanova NN, Mavromatis K, Tripp HJ, Paez-Espino D, Palaniappan K, Szeto E, Pillay M, Chen I-MA, Pati A, Markowitz VM & Kyrpides NC (2015) The Standard Operating Procedure of DOE-JGI Metagenome Annotation Pipeline (MAP v.4) <https://img.jgi.doe.gov/docs/MetagenomeAnnotationSOP.pdf>.
- Jiménez-Hidalgo I, Virgen-Calleros G, Martínez-de la Vega O, Vandemark G & Olalde-Portugal V (2004) Identification and characterization of bacteria causing soft-rot in *Agave tequilana*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 317-331.
- Junker J, Bielow C, Bertsch A, Sturm M, Reinert K & Kohlbachert O (2012) TOPPAS: A graphical workflow editor for analysis of high throughput proteomics data. *Journal of Proteome Research* 11: 3914-3920.
- Kavamura VN, Santos SN, Da Silva JL, Parma MM, Ávila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD & Soares de Melo I (2013) Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* 168:183–191.
- Kembel SW, O'Connor TK, Arnold HK, Hubbel SP, Wright SJ & Green JL (2014) Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proceedings of the National Academy of Science* 111: 13715-13720.
- Khidir HH, Eudy DM, Porrás-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO & Sinsabaugh RL (2010) A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environment* 74, 35–42.
- Kindt R & Code R (2005) Tree Diversity Analysis: A Manual and Software for Common Statistical Methods for Ecological and Biodiversity Studies. Nairobi: World Agroforestry Centre (ICRAF) 196 p.

- Kneip C, Lockhart P, Voss C & Maier UG (2007) Nitrogen fixation in eukaryotes— new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology* 7: doi:10.1186/1471-2148-7-55
- Koljalg U (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of *Fungi*. *Molecular Ecology* 22: 5271–5277.
- Lançani MD, Taketani RG, Kavamura VN, Melo IS (2013) Microbial community biogeographic patterns in the rhizosphere of two Brazilian semi-arid leguminous trees. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 1233–1241.
- Lebeis SL (2014) The potential for give and take in plant – microbiome relationships. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–6. doi:10.3389/fpls.2014.00287.
- Lebeis SL (2015) Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level. *Current Opinion in Plant Biology* 24: 82-86.
- Lee J, Lee S & Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal *Fungi*. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 339-349.
- Li W & Godzik A (2006) Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22: 1658-1659.
- Li H, Pattathil S, Foston MB, Ding S-Y, Kumar R, Gao X, Mittal A, Yarbrough JM, Himmel ME, Ragauskas AJ, Hahn MG & Wyman CE (2014) Agave proves to be a low recalcitrant lignocellulosic feedstock for biofuels production on semi-arid lands. *Biotechnology for Biofuels* 7: 50.
- López B, Bashan Y & Bacilo M (2011) Endophytic bacteria of *Mamillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology* 193: 527-541.

- Lottmann J, O'Callaghan M, Baird D & Walter C (2010) Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of field-grown genetically modified pine trees (*Pinus radiata* D.) *Environmental Biosafety Research* 9: 25-40.
- Lundberg DS, Lebeis SL, Paredes SH, Yourstone S, Gehring J, Malfatti S, Tremblay J, Engelbrektson A, Kunin V, del Rio TG, Edgar RC, Eickhorst T, Ley RE, Hugenholtz P, Tringe SG & Dangl JL (2012) Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86–90.
- Lundberg DS, Yourstone S, Mieczkowski P, Jones CD & Dangl J (2013) Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature Methods* 10: 999-1002.
- Lüttge U (2004) Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629-652.
- Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM & Tiedje JM (2001) The RDP-II (ribosomal database project) *Nucleic Acids Research* 29: 173–174.
- Maier TS, Kuhn J & Müller C (2010) Proposal for field sampling of plants and processing in the lab for environmental metabolic fingerprinting. *Plant Methods* 6: <http://www.plantmethods.com/content/6/1/6>.
- Maignien L, DeForce EA, Chafee ME, Eren MA & Simmons SL (2014) Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio* 5: 1–10. doi:10.1128/mBio.00682-13.
- Mancilla-Margalli NA & López MG (2006) Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 7832-7839.

- Manichanh C, Chapple CE, Frangeul L, Gloux K, Guigo R & Dore J (2008) A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequences for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acid Research* 36: 5180-5188.
- Manly BF (1986) *Multivariate statistical methods: A primer*. London: Chapman and Hall, Ltd. 159 p.
- Martínez-López JR, Vázquez-alvarado RE, Gutiérrez-Ornelas E, Peña del Ría MA, López-Cervantes R, Olivares-Sáenz E, Contreras-Vidales JA & Valdez-Cepeda RD (2009) Mycorrhiza effect on nutritional quality and biomass production of *Agave* (*Agave americana* L.) and cactus pera (*Opuntia lindheimeri* Engelm.). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 11: 69-77.
- Martínez-Rodríguez JC, De la Mora-Amutio M, Plascencia-Correa LA, Audelo-Regalado E, Guardado FR, Hernández-Sánchez E, Peña-Ramírez YJ, Escalante A, Beltrán-García MJ & Ogura T (2014) Cultivable bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their roles as plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology* 45: 1333-1339.
- Marasco R, Rolli E, Ettoumi B, Vigani G, Mapelli F, Borin S, Abou-Hadid AF, El-Behairy US, Sorlini C, Cherif A, Zocchi G & Daffonchio D (2012) A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PLoS One* 7: e48479.
- Marasco R, Rolli R, Fusi M, Cherif A, Abou-Hadid A, El-Bahairy U, Borin A, Sorlini C & Daffonchio D (2013) Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associate bacterial communities from different

biopedoclimatic environments. *Biomed Research International* 2013: 491091.  
[dx.doi.org/10.1155/2013/491091](https://doi.org/10.1155/2013/491091).

Marques APGC, Pires C, Moreira H, Rangel AOSS & Castro PML (2010) Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1229-1235.

Martin KJ & Rygiewicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28.

Meiser A, Bálint M & Schmitt I (2014) Meta-analysis of deep-sequenced fungal communities indicates limited taxon sharing between studies and the presence of biogeographic patterns. *New Phytologist* 201: 623–635.

Mellado-Mojica E & López MG (2012) Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60: 11704-11713.

Mendes R, Garbeva P & Raaijmakers JM (2013) The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 634–663.

Mendes LW, Kuramae EE, Navarrete AA, van Veen JA & Tsai SM (2014) Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME Journal* 8: 1577–1587.

Mohite B (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13: 638-649.

Montero-Vargas JM, González-González LH, Gálvez-Ponce E, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Chagolla A, Montagnon C & Winkler R (2013). Metabolic

phenotyping for the classification of coffee trees and the exploration of selection markers. *Molecular BioSystems* 9: 693–699.

Mu'minah, Baharuddin, Subair H & Fahrudin (2015) Isolation and screening bacterial exopolysaccharide (EPS) from potato rhizosphere in highland and the potential as a producer indole acetic acid (IAA) *Procedia Food Science* 3: 74-81.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.

Muyzer G, De Wall EC & Uitterlinden G (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59 :695-700.

Muyzer G (1999) DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural communities. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.

NAS (2007) The new science of metagenomics. Washington: National Academies Press. 158 p.

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170:265-270.

Nava-Cruz NY, Medina-Morales MA, Martínez JL, Rodríguez R & Aguilar CN (2014) Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*: doi10.3109/07388551.2014.923813

Nobel PS (2003) Environmental biology of Agaves and Cacti. Cambridge: Cambridge University Press. 270 p.

Nobel PS (2010) Desert Wisdom, *Agaves and Cacti*: CO<sub>2</sub>, Water, Climate Change. Nueva York: iUniverse. 182 p.

- Nobel PS & Hartsock TL (1986) Influence of nitrogen and other nutrients on the growth of *Agave deserti*. *Journal of Plant Nutrition* 9: 1273-1288.
- Nocker A, Burr M & Camper AK (2007) Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* 54: 276–89.
- Noy-Meir (1973) Desert ecosystems: environment and procedures. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 25-51.
- Nunes da Rocha U, Cadillo-Quiroz H, Karaoz U, Rajeev L, Klitgord N, Dunn S, Truong V, Buenrostro M, Bowen BP, García-Pichel F, Mukhopadhyay A, Norrthen TR & Brodie EL (2015) Isolation of a significant fraction of non-phototroph diversity from a desert biological soil crust. *Frontiers in Microbiology* 6: 277 doi: 10.3389/fmicb.2015.00277.
- Obledo EN, Barragán-Barragán LB, Gutiérrez-González P, Ramírez-Hernández BC, Ramírez JJ & Rodríguez-Garay B (2003) Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 237–241.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J-M & Vilgalys R (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544–5550.
- Oksanen J, Guillaume-Blanchet F, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH & Wagner H (2013) VEGAN: community ecology package. R package, version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>. (Consulta: 19 de septiembre de 2014)

- Panke-Buisse K, Poole AC, Goodrich JK, Ley RE & Kao-Kniffin J (2015) Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. *ISME Journal* 9: 980–989.
- Partida-Martínez LP & Heil M (2011) The microbe-free plant: fact or artifact? *Frontiers in Plant Science* 2: 100.
- Paulo EM, Vasconcelos MP, Oliveira IS, Affe HMJ, Nascimento R, Melo IS, Roque MRA & Assis SA (2012) An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 32: 710-714.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SE & Garbelotto M (2007) A strong species area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal *Fungi*. *Ecology Letters* 10: 470–480.
- Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES & Ley RE. 2013. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6548–6553.
- Pimienta-Barrios E, Zañudo-Hernández J & López-Alcocer E (2009) Efecto de las micorrizas arbusculares en el crecimiento, fotosíntesis y anatomía foliar de plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Acta Botánica Mexicana* 89: 63–78.
- Porras-Álfaro A, Herrera J, Natvig DO, Lipinski K & Sinsabaugh RL (2011) Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 103: 10–21.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J & Glockner FO (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41: 590–596.

- Quinn GP & Keough MJ (2002) Experimental design and data analysis for biologists. New York: Cambridge University Press. 537 p.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. (Consulta: 10 de julio de 2014)
- Ravenscroft N, Cescutti P, Hearshaw MA, Ramsout R, Rizzo R & Timme EM (2009) Structural analysis of fructans from *Agave americana* grown in South Africa for spirit production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57: 3995-4003.
- Redecker D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal *Fungi* colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80.
- Rennie RJ (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogenfixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology* 27:8-14.
- Rodríguez H & Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319–339.
- Rolli E, Marasco R, Vigani G, Ettoumu B, Mapelli F, Deangelis ML, Gandolfi C, Casati E, Previtali F, Gerbino R, Pierotti F, Borin S, Sorlini C, Zocchi G & Daffonchio D (2015) Improved plant resistance to drought is promoted by root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology* 17: 316-331.
- Rosenberg E, Sharon G, Atad I & Zilber-Rosenberg I (2010) The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms. *Environmental Microbiology Reports* 2: 500–506.

- Ruiz S, Adriano L, Ovando I, Navarro C & Salvador M (2011) Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. *African Journal of Biotechnology* 10: 9631–9639.
- Ruiz-Corral JA (2007) Requerimientos agroecológicos y potencial productivo del agave *Agave tequilana* Weber. En: Rulfo-Vilchis FO, Pérez-Domínguez JF, Del Real-Laborde JI & Byerly-Murphy KF Conocimientos y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen tequila. INIFAP-CIRPC. pp. 11-36.
- Ruiz-Herrera J, León-Ramírez C, Vera-Núñez A, Sánchez-Arreguín A, Ruiz-Medrano R, Salgado-Lugo H, Sánchez-Segura L & Peña-Cabriales JJ (2015) A novel intracellular nitrogen-fixing symbiosis made by *Ustilago maydis* and *Bacillus* spp. *New Phytologist* 207: 769-777
- Sahasrabudhe MM (2011) Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Annals of Biological Research* 2: 460-468.
- Sánchez JI, Martínez B, Guillén R, Jiménez-Díaz R & Rodríguez A (2006) Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7495–7502.
- Santhanam R, Luu VT, Weinhold A, Goldberg J, Oh Y & Baldwin IT (2015) Native root-associated bacteria rescue a plant from sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: E5013-E5020.

- Schlaeppi K, Dombrowski N, Oter RG, van Themaat EVL & Schulze-Lefert P (2014) Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111: 585–592.
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, Del Papa MF, Lagares A & Luna V (2009) Isolation and characterization of endophytic plant growth promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 371-381.
- Shade A & Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology* 14: 4–12.
- Shakya M, Gottel N, Castro H, Yang ZK, Gunter L, Labbe J, Muchero W, Bonito G, Vilgalys R, Tuskan G, Podar M & Schadt CW (2013) A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. *PLoS ONE* 8: e76382.
- Soussi A, Ferjani R, Marasco R, Guesmi A, Cherif H, Rolli E, Mapelli F, Ouzari HI, Daffonchio D & Cherif A (2015) Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*: doi 10.1007/s11104-015-2650-y.
- Stockinger H, Krüger M & Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal *Fungi*. *New Phytologist* 187: 461-474.
- Tahtamouni ME, Khresat S, Lucero M, Sigala J & Unc A (2016) Diversity of endophyte across the soil-plant continuum for *Artiplex* spp. in arid environments *Journal of Arid Land* 8: 241-253. doi: 10.1007/s40333-015-0061-9
- Talbot JM, Bruns TD, Taylor JW, Smith PD, Branco S, Glassman SI, Erlandson S, Vilgalys R, Liao H-L, Smith ME & Peay KG (2014) Endemism and functional

convergence across the North American soil mycobiome. *Proceedings of the National Academy of Science* 111: 6341-6346.

Teather RM & Wood PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 43:777-780.

Torres-Gómez MJ (2013) Microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a *Agave salmiana* subsp. *crassispina* y *Agave tequilana* Weber var. azul. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya. 111 p.

Turner TR, James EK & Poole PS (2013) The plant microbiome. *Genome Biology* 14: 209.

U'Ren JM, Lutzoni F, Miadlikowska J, Laetsch AD & Arnold AE (2012) Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany* 99: 898-914.

Valenzuela A (2011) A new agenda for blue agave landraces: food, energy and tequila. *GCB Bioenergy* 3: 15–24.

Venables WN & Ripley BD (2002) *Modern applied statistics with S*. New York: Springer. 497 p.

Vandenkoornhuysen P, Quaiser A, Duhamel M, Le Van A, Dufresne A (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist* 206: 1196–1206.

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM & Cole JR (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261–5267.

- Werner GDA, Strassmann JE, Ivens ABF, Engerlmoer DJP, Verbruggen E, Queller DC, Noë R, Johnson NC, Hammerstein P & Kiers ET (2014) Evolution of microbial markets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 1237-1244.
- Winogradsky S (1935) The method in soil microbiology as illustrated by studies on *Azotobacter* and the nitrifying organisms. *Soil Science* 40: 59-76.
- Winter K & Smith JAC (1996) An introduction to crassulacean metabolism. Biochemical principles and ecological diversity. En: Winter K & Smith JAC Crassulacean Acid Metabolism. Berlin: Springer-Verlag. pp. 1-13.
- Withford W (2002) Ecology of desert ecosystems. Londres: Academic Press. 343 p.
- Xu YH, Rossi F, Colica G, Deng SQ, De Philippis R & Chen LZ (2013) Use of cyanobacterial polysaccharides to promote shrub performances in desert soils: a potential approach for the restoration of desertified areas. *Biology and Fertility of Soils* 49: 143–152.
- Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, Bokulich NA, Mills DA, Martin G, Taghavi S, van der Lelie D & Gilbert JA (2015) The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6: e02527-14.
- Zhang T & Yao Y-F (2015) Endophytic fungal communities associated with vascular plants in high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *Plos One* 10: e0130051. doi:10.1371/journal.pone.0130051.
- Zilber-Rosenberg I & Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 723–735.

## Apéndice A

Altura, diámetro y localización geográfica de las plantas muestreadas de *A. tequilana* y *A. salmiana* en la región del Bajío durante los años 2012 y 2013.

Especie	Etiqueta	Altura (cm)	Diámetro (cm)	A/D	Hijuelos	Plantas Vecinas	Estación <sup>a</sup>	Sitio	Localización Geográfica
<i>A. tequilana</i>	AtPe <sub>1-1</sub>	135	135	1	0	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.971, W 101°41.689
	AtPe <sub>1-2</sub>	154	135	1.14	6	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.957, W 101°41.659
	AtPe <sub>1-3</sub>	142	134	1.06	1	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.982, W 101°41.678
	AtAm <sub>1-1</sub>	136	187	0.73	0	<i>A. tequilana</i>	Secas	Amatitan	N 20°50.792, W 103°43.666
	AtAm <sub>1-2</sub>	134	176	0.76	2	<i>A. tequilana</i>	Secas	Amatitan	N 20°50.748, W 103°43.690
	AtAm <sub>1-3</sub>	148	190	0.78	0	<i>A. tequilana</i>	Secas	Amatitan	N 20°50.702, W 103°43.739
	AtPe <sub>2-1</sub>	121	132	0.92	3	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°25.982, W 101°41.698
	AtPe <sub>2-2</sub>	129	173	0.74	1	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°25.944, W 101°41.602
	AtPe <sub>2-3</sub>	137	181	0.76	2	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°26.006, W 101°41.632
	AtAm <sub>2-1</sub>	146	187	0.78	0	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Amatitan	N 20°50.814, W 103°43.663
	AtAm <sub>2-2</sub>	145	192	0.75	1	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Amatitan	N 20°50.766, W 103°43.695
	AtAm <sub>2-3</sub>	144	192	0.75	0	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Amatitan	N 20°50.687, W 103°43.729
	AtPe <sub>3-1</sub>	133	146	0.91	2	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.990, W 101°41.691
	AtPe <sub>3-2</sub>	143	127	1.13	4	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.944, W 101°41.607
	AtPe <sub>3-3</sub>	144	129	1.12	3	<i>A. tequilana</i>	Secas	Pénjamo	N 20°25.995, W 101°41.622
	AtPe <sub>4-1</sub>	150	178	0.84	3	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°25.995, W 101°41.698
	AtPe <sub>4-2</sub>	149	185	0.80	4	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°25.999, W 101°41.696
AtPe <sub>4-3</sub>	138	192	0.72	4	<i>A. tequilana</i>	Lluvias	Pénjamo	N 20°26.006, W 101°41.661	

Continuación...

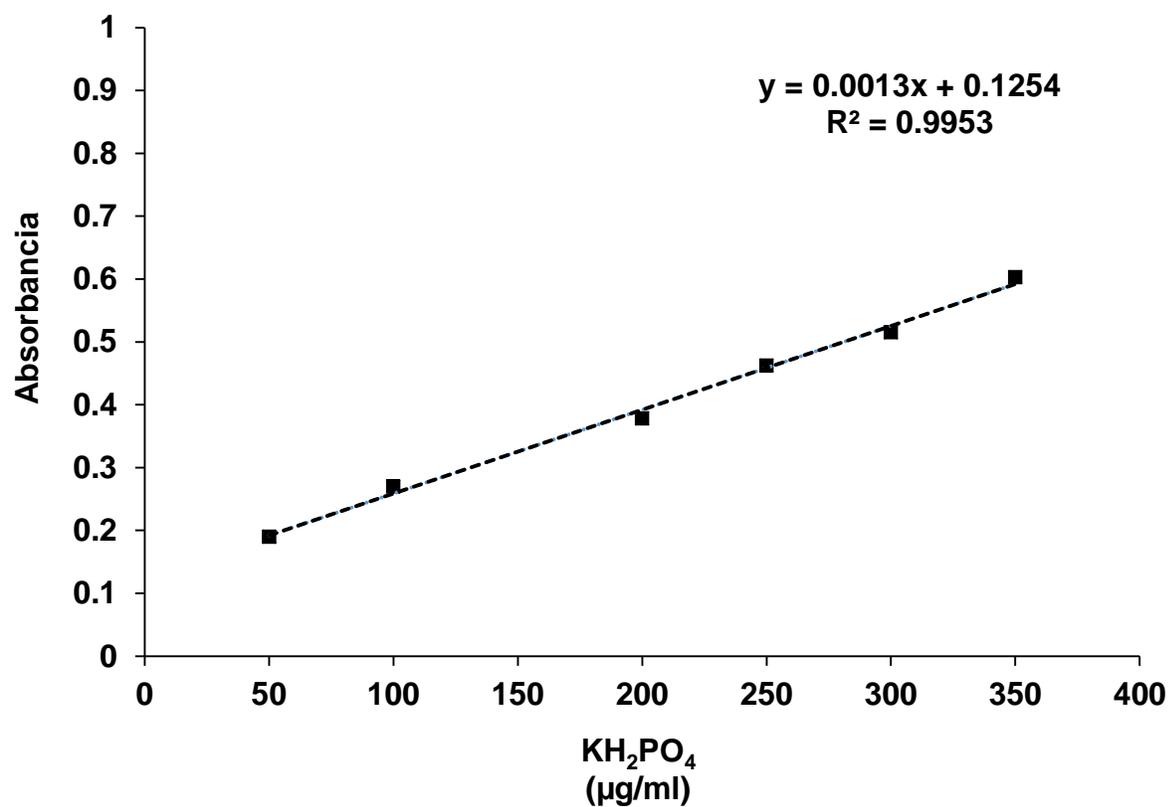
Especie	Etiqueta	Altura (cm)	Diámetro (cm)	A/D	Hijuelos	Plantas Vecinas	Estación <sup>a</sup>	Sitio	Localización Geográfica
<i>A. salmiana</i>	AsMa <sub>1-1</sub>	70	66	1.06	6	<i>M. geometrizzans</i> , <i>O. robusta</i>	Secas	El Magueyal	N 21°05.403, W 100°17.561
	AsMa <sub>1-2</sub>	85	114	0.74	4	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	El Magueyal	N 21°05.209, W 100°17.746
	AsMa <sub>1-3</sub>	78	82	0.95	0	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	El Magueyal	N 21°04.106, W 100°16.105
	AsSF <sub>1-1</sub>	89	109	0.81	0	-	Secas	San Felipe	N 21°38.477, W 100°03.407
	AsSF <sub>1-2</sub>	94	114	0.82	0	-	Secas	San Felipe	N 21°40.178, W 100°02.651
	AsSF <sub>1-3</sub>	103	109	0.94	6	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	San Felipe	N 21°40.224, W 101°02.818
	AsMa <sub>2-1</sub>	71	129	0.55	1	grupo <i>A. salmiana</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°05.200, W 100°17.733
	AsMa <sub>2-2</sub>	70	64	1.09	5	<i>M. geometrizzans</i> , <i>O. robusta</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°04.097, W 100°16.116
	AsMa <sub>2-3</sub>	94	127	0.74	4	grupo <i>A. salmiana</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°04.106, W 100°16.105
	AsSF <sub>2-1</sub>	103	79	1.30	1	Malezas	Lluvias	San Felipe	N 21°40.217, W 101°02.654
	AsSF <sub>2-2</sub>	70	62	1.13	0	Malezas	Lluvias	San Felipe	N 21°40.178, W 101°02.758
	AsSF <sub>2-3</sub>	77	98	0.78	0	Malezas	Lluvias	San Felipe	N 21°38.526, W 101°03.285
	AsMa <sub>3-1</sub>	62	63	0.98	2	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	El Magueyal	N 21°05.363, W 100°17.642
	AsMa <sub>3-2</sub>	62	59	1.05	5	<i>O. robusta</i>	Secas	El Magueyal	N 21°05.250, W 100°17.730
	AsMa <sub>3-3</sub>	63	71	0.89	0	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	El Magueyal	N 21°04.108, W 100°16.103
	AsSF <sub>3-1</sub>	89	122	0.73	0	<i>O. robusta</i>	Secas	San Felipe	N 21°39.960, W 101°02.796
	AsSF <sub>3-2</sub>	93	110	0.84	3	grupo <i>A. salmiana</i>	Secas	San Felipe	N 21°40.013, W 101°02.874
	AsSF <sub>3-3</sub>	83	104	0.80	2	grupo <i>A. salmiana</i> , <i>O. imbricata</i>	Secas	San Felipe	N 21°38.564, W 101°03.275
	AsMa <sub>4-1</sub>	103	123	0.83	0	<i>A. salmiana</i> , <i>O. robusta</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°05.215, W 100°17.759
	AsMa <sub>4-2</sub>	93	116	0.80	3	<i>A. salmiana</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°05.177, W 100°17.769
AsMa <sub>4-3</sub>	76	82	0.93	1	<i>M. geometrizzans</i> , <i>O. robusta</i>	Lluvias	El Magueyal	N 21°04.095, W 100°16.116	
AsSF <sub>4-1</sub>	89	97	0.92	1	<i>A. salmiana</i> , <i>M. geometrizzans</i>	Lluvias	San Felipe	N 20°25.995, W 101°41.698	
AsSF <sub>4-2</sub>	101	108	0.93	1	<i>A. salmiana</i> , <i>M. geometrizzans</i>	Lluvias	San Felipe	N 20°25.999, W 101°41.696	
AsSF <sub>4-3</sub>	86	104	0.83	0	grupo <i>A. salmiana</i>	Lluvias	San Felipe	N 20°26.006, W 101°41.661	

<sup>a</sup> Las muestras correspondientes al año 2012 se colectaron para la época de secas de Mayo 28 a Junio 7 y en el caso de la época de lluvias de Octubre 10 a Octubre 15. En el caso de las muestras correspondientes al año 2013, la colecta de secas se realizó de Mayo 27 a Mayo 31 y para la época de lluvias de Septiembre 30 a Octubre 4.

## Apéndice B

Curva de calibración para la cuantificación de solubilización de fosfatos ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

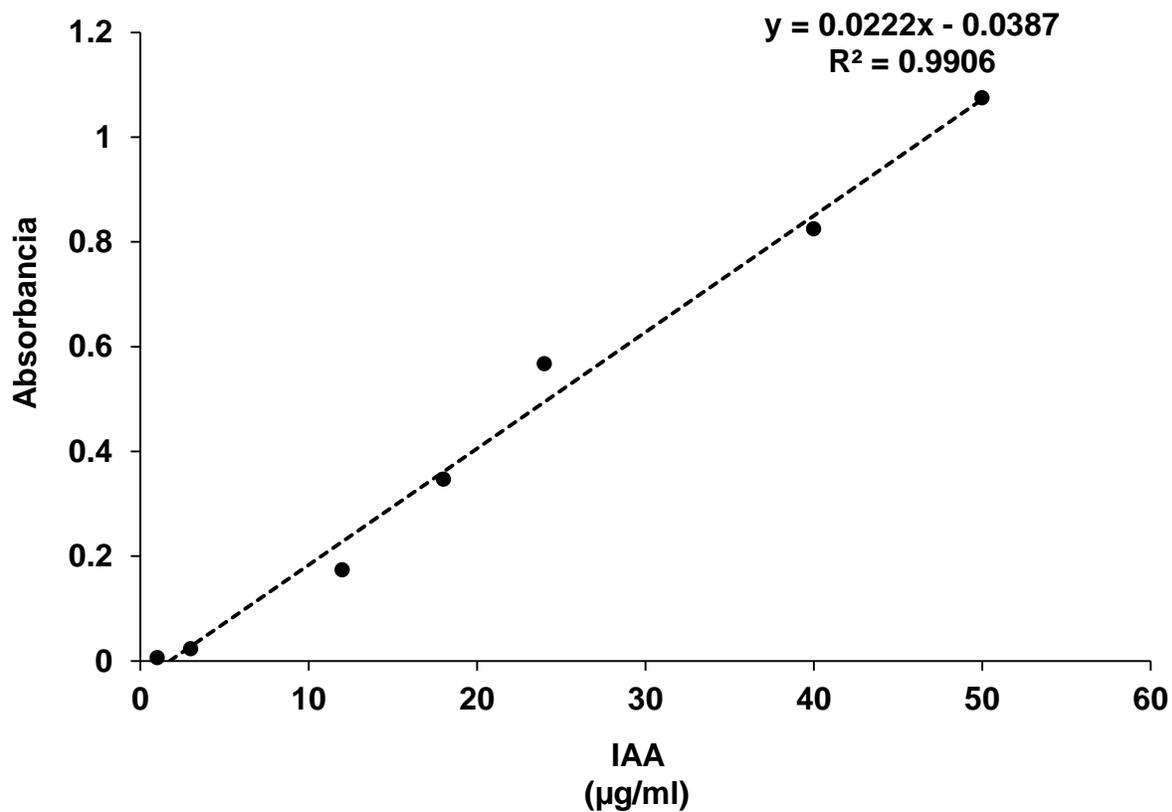
Concentración de soluciones madre de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Concentración estimada de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) a partir de la recta
Blanco	0	0
50	0.087	49.6875
100	0.169	100.9375
200	0.33	201.5625
250	0.422	259.0625
300	0.482	296.5625
350	0.575	354.6875



## Apéndice C

Curva de calibración para la cuantificación de producción de ácido indolacético (IAA)

Concentración de soluciones madre de IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia	Concentración estimada de IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) a partir de la recta
Blanco	0	0
1	0.006	2.013513514
3	0.023	2.779279279
12	0.174	9.581081081
18	0.347	17.37387387
24	0.567	27.28378378
40	0.825	38.90540541
50	1.075	50.16666667



## Apéndice D

OTUs asociados con *A. tequilana* y *A. salmiana* detectados con DGGE, indicando aquellos que son endófitos centrales de secas y aislados relacionados.

OTU	Linaje <sup>a</sup>	Tipo de comunidad <sup>b</sup>	Especie <sup>c</sup>	Estación <sup>d</sup>	Número de cepas aisladas <sup>e</sup>
18	<i>Bacteria</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
20	<i>Bacteria</i>	3	At	LL	-
41	<i>Bacteria</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
64	<i>Bacteria</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
84	<i>Acidobacteria</i>	1, 3	As/At	S/LL	-
7	<i>Acidobacteria Gp4</i>	3	As	LL	-
28	<i>Acidobacteria Gp4</i> <sup>f</sup>	2, 3	As/At	S/LL	-
42	<i>Acidobacteria Gp4</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
6	<i>Acidobacteria Gp6</i>	3	As	LL	-
29	<i>Acidobacteria Gp6</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
43	<i>Acidobacteria Gp6</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
65	<i>Acidobacteria Gp6</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
45	<i>Actinobacteria</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
63	<i>Actinobacteria</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
90	<i>Actinobacteria</i>	1	As/At	S/LL	-
92	<i>Actinobacteria</i>	1	As/At	LL	-
67	<i>Corynebacteriales</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
55	<i>Mycobacterium</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
36	<i>Microbacteriaceae</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
47	<i>Streptomyces</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-

23	<i>Rubrobacter</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
46	<i>Rubrobacter</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
35	<i>Solirubrobacterales</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
2	<i>Bacillaceae</i>	3	As	LL	-
27	<i>Bacillus</i>	2	At	S	-
31	<i>Bacillus</i>	2	As/At	S	1
58	<i>Bacillus</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
56	<i>Clostridium</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
80	<i>Gemmatimonadetes</i>	2	At	S	-
69	<i>Gemmatimonas</i>	1, 2	As/At	S/LL	-
30	<i>Nitrospira</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
91	<i>Proteobacteria</i>	1, 3	As	LL	-
24	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	2, 3	As/At	LL	-
66	<i>Devosia</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
54	<i>Xanthobacteraceae</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
83	<i>Acetobacteraceae</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
70	<i>Gluconacetobacter</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
68	<i>Reyranella</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
5	<i>Rhizobium</i>	3	As	LL	-
94	<i>Comamonadaceae</i>	1	As/At	LL	-
71	<i>Deltaproteobacteria</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
93	<i>Gammaproteobacteria</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
3	<i>Enterobacteriaceae</i>	3	As	LL	-
12	<i>Enterobacteriaceae</i>	3	As	LL	-
32	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
33	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 2	As/At	S/LL	-

34	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
48	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
59	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
60	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 3	As/At	S/LL	7
62	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	7
81	<i>Enterobacteriaceae</i>	2	As	LL	-
88	<i>Enterobacteriaceae</i>	1, 2	As/At	S/LL	-
40	<i>Enterobacter</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
61	<i>Enterobacter</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	7
52	<i>Pantoea</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
76	<i>Pectobacterium</i>	1	As/At	LL	-
25	<i>Acinetobacter</i>	2, 3	As/At	S/LL	-
26	<i>Acinetobacter</i>	2, 3	As/At	S/LL	-
37	<i>Pseudomonas</i>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
57	<i>Xanthomonadales</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	-
8	<i>Stenotrophomonas</i>	3	As	LL	-
9	<i>Stenotrophomonas</i>	3	As	S/LL	-
16	<i>Stenotrophomonas</i>	1, 3	As	LL	-
38	<i>Stenotrophomonas</i> <sup>f</sup>	1, 2, 3	As/At	S/LL	2

<sup>a</sup>Las secuencias de cada OTU están depositadas en el NCBI bajo los números de acceso KJ659221-KJ659285.

<sup>b</sup>Tipo de comunidad, 1: suelo-suelo asociado a raíz, 2: rizósfera-filósfera y 3: endósfera de hoja-raíz.

<sup>c</sup>Especie, As: *Agave salmiana*, At: *Agave tequilana*.

<sup>d</sup>Estación, S: estación de secas, LL: estación de lluvias.

<sup>e</sup>Número de cepas aisladas relacionadas con cada OUT, basados en un 97% de similitud en la secuencia del gen 16S rRNA.

<sup>f</sup>OTUs endófitos centrales de secas.

## Apéndice E

### Diversidad de las comunidades asociadas con *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. deserti*

Índice de Shannon ( $H'$ ) para las comunidades microbianas detectadas con iTags.

Tipo de muestra	Archaea-Bacteria			Fungi		
	<i>A. tequilana</i> <sup>e</sup>	<i>A. salmiana</i> <sup>f</sup>	<i>A. deserti</i> <sup>g</sup>	<i>A. tequilana</i> <sup>e</sup>	<i>A. salmiana</i> <sup>f</sup>	<i>A. deserti</i> <sup>g</sup>
Suelo <sup>a</sup>	5.149 ± 0.324	5.252 ± 0.310	5.303 ± 0.161	2.987 ± 0.431	3.616 ± 0.575	3.109 ± 0.564
Suelo Asociado Raíz <sup>b</sup>	5.036 ± 0.889	5.516 ± 0.122	5.386 ± 0.242	3.023 ± 0.522	3.574 ± 0.625	3.543 ± 0.618
Rizósfera <sup>c</sup>	2.417 ± 1.211	4.600 ± 1.006	4.803 ± 0.282	3.325 ± 0.391	3.954 ± 0.526	2.751 ± 0.558
Filósfera <sup>d</sup>	2.716 ± 1.610	4.389 ± 1.039	4.952 ± 0.820	3.052 ± 0.424	2.374 ± 0.528	3.619 ± 0.410
Endósfera raíz	2.534 ± 1.146	3.316 ± 0.761	2.872 ± 0.644	1.728 ± 0.499	2.139 ± 0.538	1.942 ± 0.448
Endósfera hoja	3.035 ± 0.815	2.051 ± 1.010	2.936 ± 0.763	2.721 ± 0.681	2.225 ± 0.442	3.260

Todos los valores del índice de Shannon se presentan como la media ± la desviación estándar, excepto para la comunidad fúngica de la endósfera de hoja de *A. deserti*, la cual representa sólo una muestra.

a. Diferente significativamente entre especies, Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{2,41} = 6.880$ ,  $P = 0.0321$ .

b. Diferente significativamente entre especies, Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{2,41} = 9.458$ ,  $P = 0.0088$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{2,42} = 7.507$ ,  $P = 0.0234$ .

c. Diferente significativamente entre especies, Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{2,42} = 19.090$ ,  $P = 0.00007$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{2,41} = 20.501$ ,  $P = 3.12e^{-05}$ .

d. Diferente significativamente entre especies, Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{2,41} = 16.587$ ,  $P = 0.0002$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{2,40} = 25.370$ ,  $P = 3.71e^{-06}$ .

e. Diferente significativamente entre los tipos de muestra asociados con *A. tequilana* Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{5,71} = 42.525$ ,  $P = 4.611e^{-08}$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{5,68} = 29.535$ ,  $P = 1.82e^{-05}$ .

f. Diferente significativamente entre los tipos de muestra asociados con *A. salmiana* Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{5,66} = 42.751$ ,  $P = 4.15e^{-08}$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{5,70} = 46.389$ ,  $P = 7.568e^{-09}$ .

g. Diferente significativamente entre los tipos de muestra asociados con *A. deserti* Archaea-Bacteria: Kruskal-Wallis  $H_{5,98} = 71.298$ ,  $P = 5.499e^{-14}$ , Fungi: Kruskal-Wallis  $H_{5,86} = 46.242$ ,  $P = 2.193e^{-09}$ .

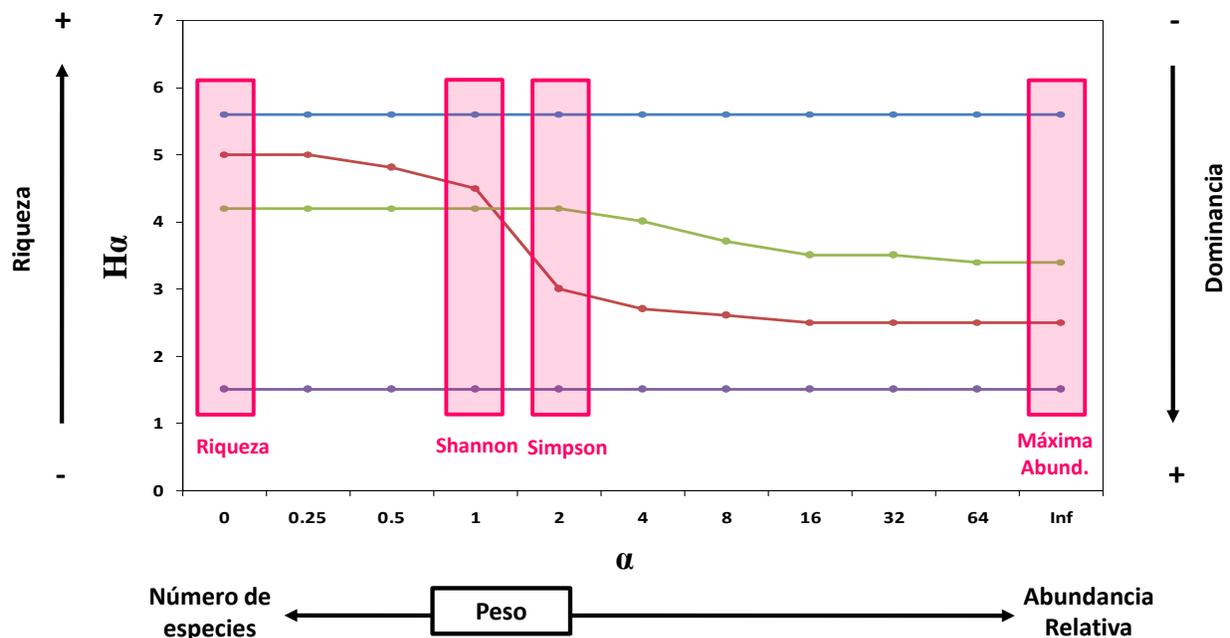
Índice de Shannon ( $H'$ ) para las comunidades microbianas detectadas con DGGE.

Tipo de muestra	Bacteria	
	<i>A. tequilana</i>	<i>A. salmiana</i>
Suelo	3.526 ± 0.344	3.555 ± 0.326
Suelo Asociado Raíz	3.401 ± 0.263	3.714 ± 0.335
Rizósfera	3.332 ± 0.523	3.135 ± 0.396
Filósfera	3.296 ± 0.646	3.296 ± 0.484
Endósfera raíz	3.434 ± 0.375	3.555 ± 0.315
Endósfera hoja	2.773 ± 0.261	3.526 ± 0.529

Todos los valores del índice de Shannon se presentan como la media ± la desviación estándar.

Perfiles de Renyi

El perfil de Renyi se entiende como una escala de estimaciones de diversidad en la cual se otorga de forma creciente un mayor peso a la abundancia relativa de las especies y un peso decreciente al número de especies en la comunidad (riqueza). Los índices de diversidad que se calculan comúnmente son secciones particulares de este perfil. De este modo tenemos que cuando el parámetro  $\alpha = 0$  estamos hablando de la riqueza de especies en la comunidad, el índice de Shannon se da cuando  $\alpha = 1$ , el índice de Simpson se da cuando  $\alpha = 2$  y la abundancia relativa de la especie más abundante se da cuando  $\alpha$  tiende a infinito (Bonilla-Rosso *et al.*, 2012).



En las gráficas de los perfiles de Renyi, una comunidad puede ser denominada como más diversa que otra si cada uno de los puntos a lo largo de línea que representa el perfil se encuentran arriba de los puntos de otra comunidad (perfil azul en la parte alta de la figura). La comunidad será menos diversa si todos los puntos de su perfil se

encuentran debajo de otro (perfil morado en la parte baja de la figura). Finalmente, cuando alguno(s) de los puntos de un perfil se sobreponen con otro (perfiles verde y rojo en la parte media de la figura), no pueden determinarse como más o menos diversos ya que aquel con puntos más altos en el lado izquierdo (perfil rojo) tiene más especies pero estará más dominado por pocas especies en comparación con el perfil con el que se sobreponen (perfil verde). Este último tendrá menos especies ya que cuenta con puntos más bajos del lado izquierdo pero el número de sus individuos estará distribuido más equitativamente entre las diferentes especies (Bonilla-Rosso *et al.*, 2012).

### *Referencias*

Bonilla-Rosso G, Peimbert M, Alcaraz LD, Hernández I, Eguiarte LE, Olmedo-Álvarez G & Souza Valeria (2012) Comparative metagenomics of two microbial mats at Cuatro Ciénegas Basin II: community structure and composition in oligotrophic environments. *Astrobiology* 12: 659-673.

En las figuras siguientes:

Especies de *Agave*

At= *A. tequilana*

As= *A. salmiana*

Ad= *A. deserti*

Tipos de comunidad

s= suelo

rz= suelo asociado a raíz

rh= rizósfera

p= filósfera

re= endósfera hoja

le= endósfera raíz

Sitios

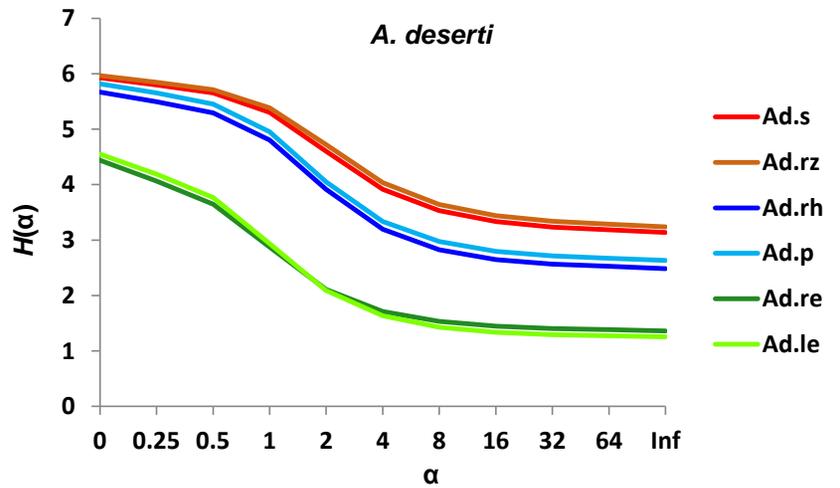
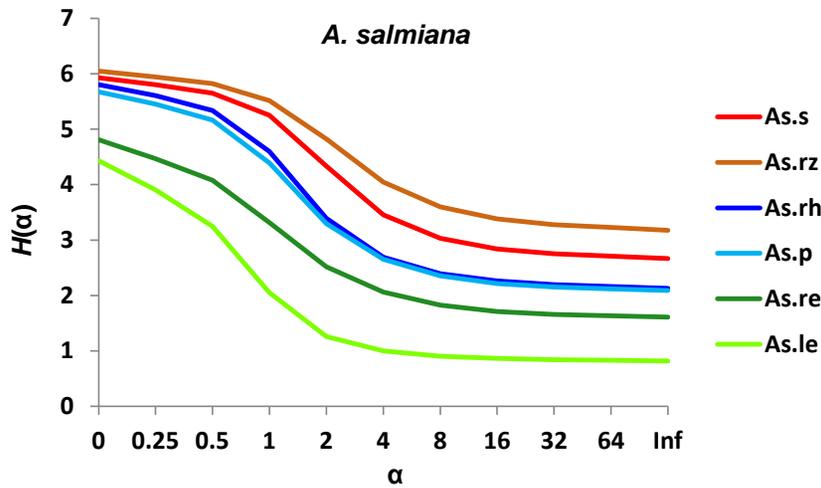
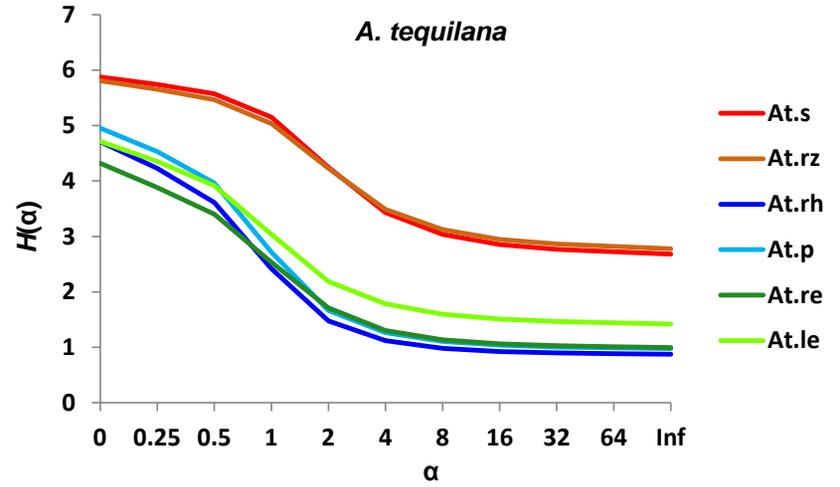
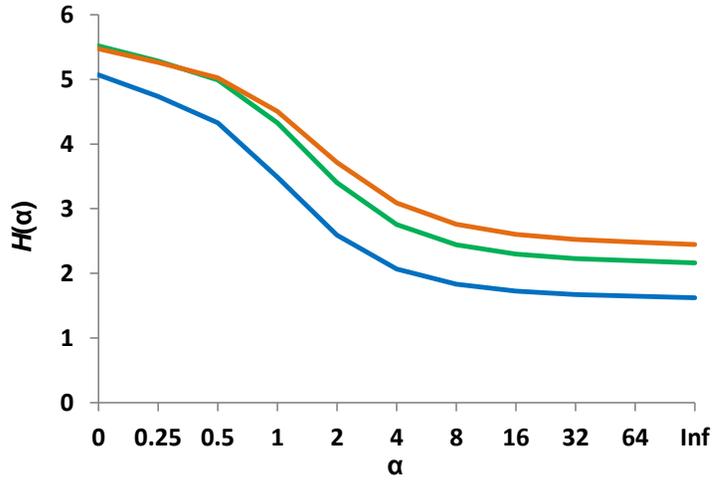
Ma= El Magueyal

SF= San Felipe

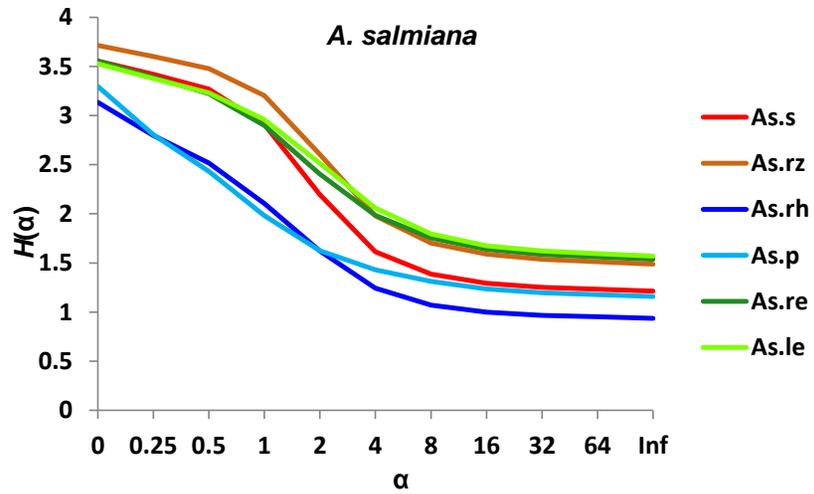
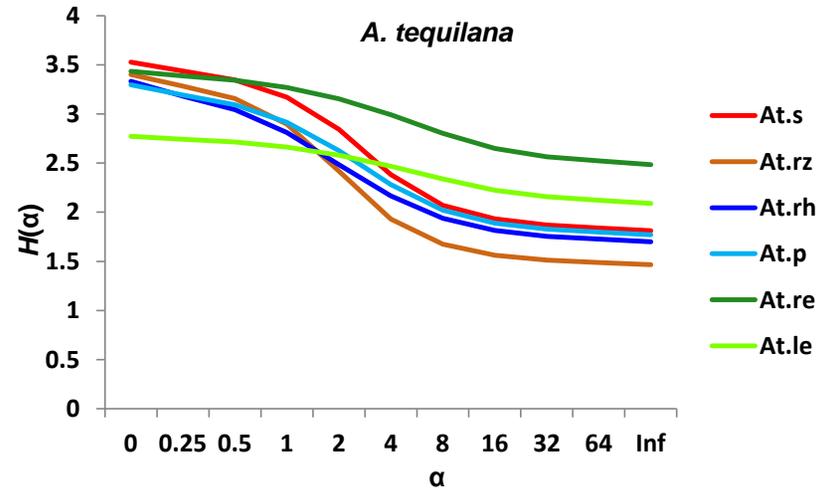
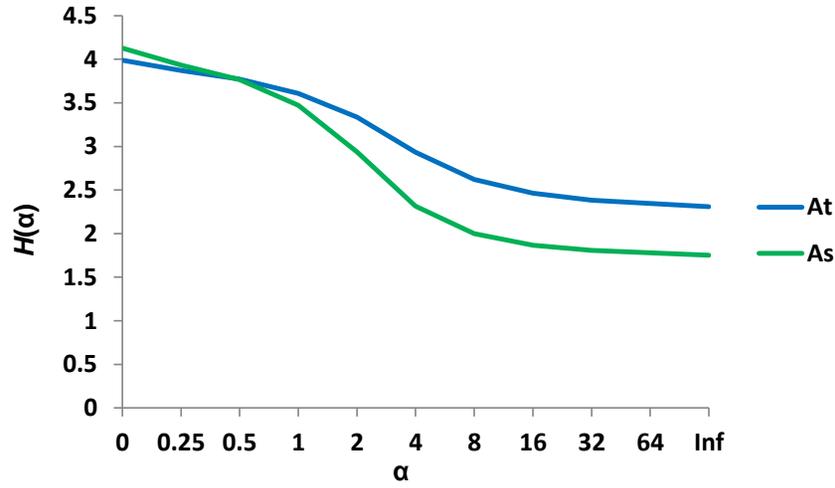
Am= Amatitán

Pe= Pénjamo

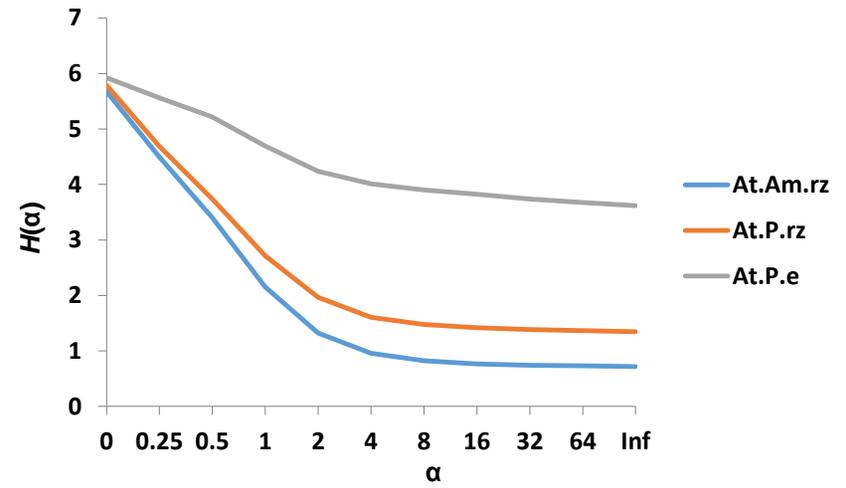
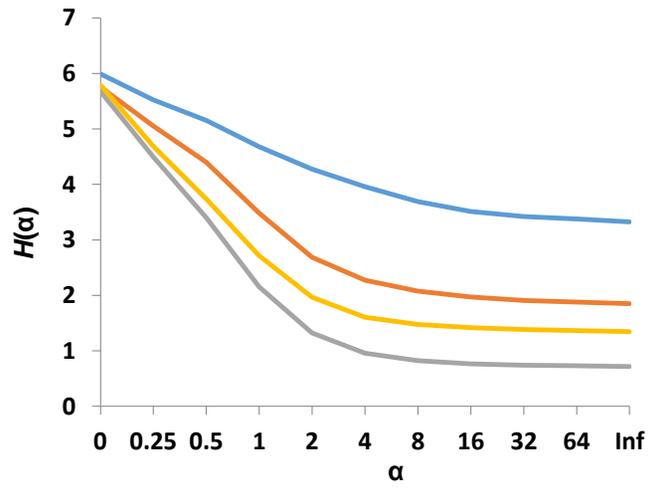
### iTags 16S - Bacteria/Archaea



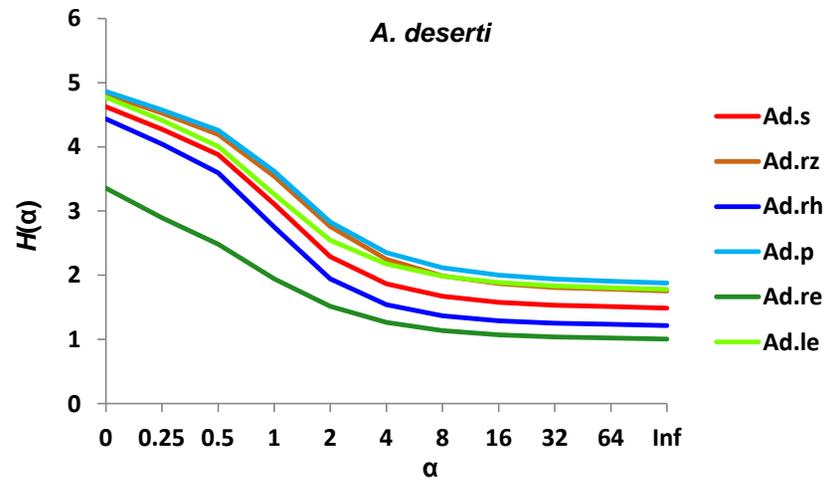
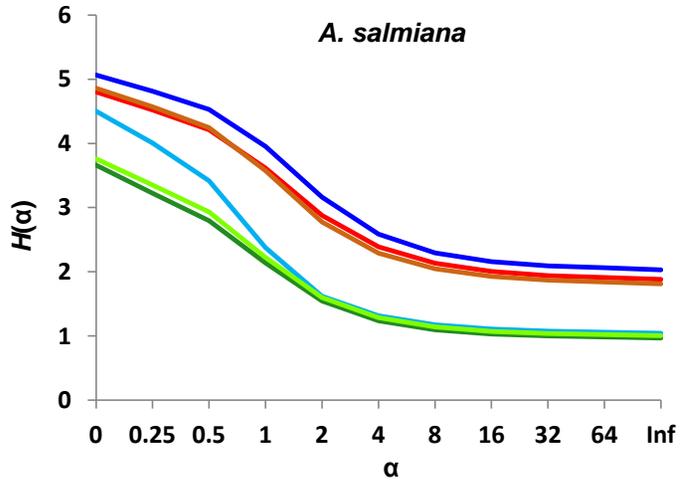
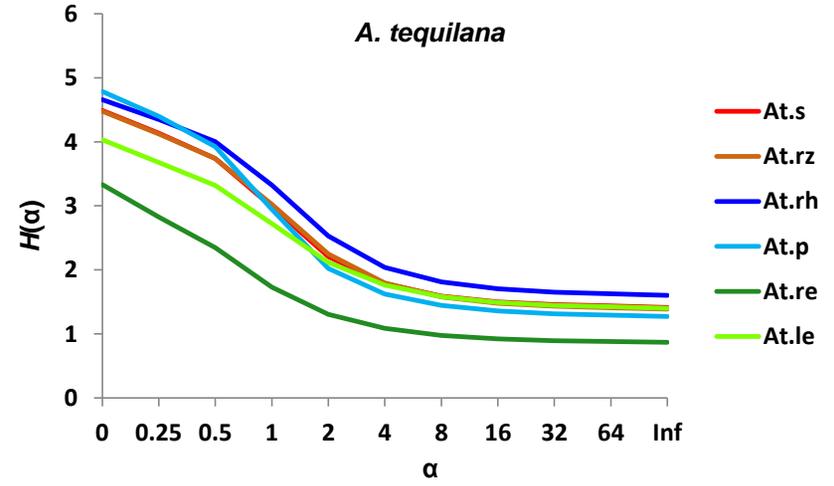
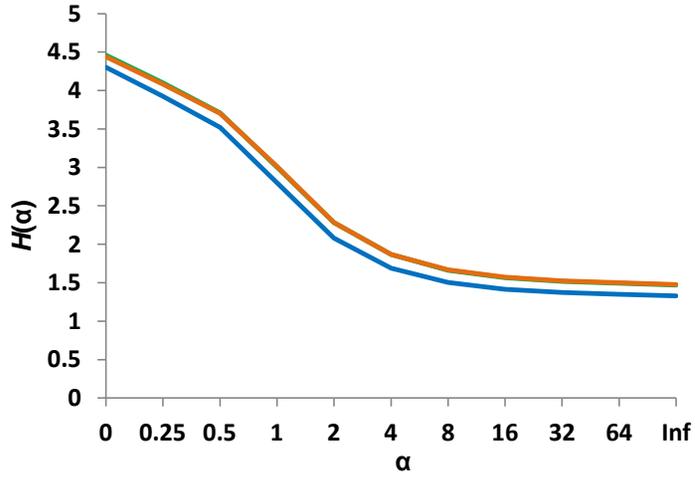
### DGGE 16S - Bacteria



### METAGENOMAS- Bacteria/Archaea



### iTags ITS2 - Fungi



## Apéndice F

### Cepas aisladas de *Agave* tolerantes a sequía y con características promotoras del crecimiento vegetal

ID	Cepa	Origen	Tolerancia a sequía				Indirectos			Directos	
			Aw reducida <sup>a</sup>			EPS <sup>b</sup>	NH <sub>3</sub> <sup>c</sup>	HCN <sup>d</sup>	Hidrólisis de celulosa <sup>e</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>f</sup> (µg/mL)	IAA <sup>g</sup> (µg/mL)
			25%	50%	100%						
MJ04	<i>Citrobacter murlinae</i>	<i>A. tequilana</i> endo raíz	++++	+++	+	+	+	-	+	1060.10	76.19
MJ05	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>A. tequilana</i> endo raíz	++++	++++	+	+	+	-	+	1083.02	84.15
MJ08	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	<i>A. tequilana</i> rizósfera	++++	++++	-	+	+	-	+	535.85	63.72
MJ09	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>A. tequilana</i> rizósfera	++++	++++	+	+	+	-	+	1053.30	90.30
MJ11	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	++++	+++	+	+	+	-	+	81.81	117.52
MJ12	<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	++++	++++	++++	+	+	-	+	167.00	30.23
MJ14	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>A. salmiana</i> rizósfera	++++	+	-	-	+	-	+	644.41	30.39
MJ17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	++++	++++	-	+	+	-	+	497.90	106.98
MJ18	<i>Enterobacter sacchari</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	++++	++++	-	+	+	-	+	594.78	41.71
MJ19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>A. salmiana</i> endo raíz	++++	++++	-	+	+	-	+	474.82	103.57
MJ22	<i>Belnapia rosea</i>	<i>A. salmiana</i> filósfera	++	-	-	-	+	-	-	-	14.73

<sup>a</sup>Coeficiente de disponibilidad agua reducido por acción del gradiente de sorbitol. El crecimiento (+) se indica en una escala de 1 a 4, indicando el número de repeticiones donde se observó crecimiento para cada condición del gradiente.

<sup>b</sup>Producción de exopolisacáridos.

<sup>c</sup>Producción de amonio (NH<sub>3</sub>).

<sup>d</sup>Producción de cianuro de hidrógeno (HCN).

<sup>e</sup>Las cepas fueron capaces de crecer (+) pero no presentaron halo de hidrólisis.

<sup>f</sup>Solubilización de fosfatos.

<sup>g</sup>Producción de ácido indolacético.

## Publicaciones derivadas del proyecto y presentaciones en congresos

### *Publicaciones*

1. Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriales JJ & Partida-Martínez LP (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857.

2. Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-García C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, North G, Visel A, Partida-Martínez LP & Tringe SG (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist* 209: 798-811.

### *Presentaciones en congresos*

1. Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriales JJ & Partida-Martínez LP. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with agaves. XXX Congreso Nacional de Bioquímica, Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB). Guadalajara, Jalisco, 2-8 de noviembre de 2014.

2. Desgarenes D, Fonseca-García D, Coleman-Derr D, Visel A, Tringe S & Partida-Martínez LP. Biogeography and cultivation influence diversity and composition of the fungal communities associated with *Agave* species. International Symposium on Molecular Biology and Biotechnology of Fungi. Irapuato, Guanajuato, 12-14 de mayo de 2015.

3. Desgarenes D, Fonseca-García D, Coleman-Derr D, Visel A, Tringe S & Partida-Martínez LP. The *Agave* microbiome: from fundamental knowledge to biotech potential. American Society for Microbiology (ASM) General Meeting. Nueva Orleans, Louisiana, EUA, 30 de mayo-02 de junio de 2015.

## Curriculum Vitae

<b>NOMBRE COMPLETO</b> Damaris del Carmen Desgarenes Valido	<b>EDAD</b> 32 años (Fecha de Nacimiento: 21.02.1984)
--	--

### A. Educación/Entrenamiento

INSTITUCIÓN Y LUGAR	GRADO	MM/AA	ÁREA DE ESTUDIO
CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato	Dr. en C.	04/16	Biotecnología de Plantas
Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México	M. en C.	10/08	Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales
Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz	Ing.	07/05	Ingeniería en Agronomía

### B. Experiencia profesional

- 09.11- a la fecha      Doctorado en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV Unidad Irapuato, Depto. de Ingeniería Genética, Laboratorio de Interacciones Microbianas, Irapuato, Guanajuato.
- 02.09-08.11          Profesora, Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Agrícolas, Xalapa, Veracruz.
- 01.10-12.10          Técnico de Laboratorio, Instituto de Ecología, Laboratorio de Biodiversidad y Sistemática, Xalapa, Veracruz.
- 02.09-07.10          Profesora, Escuela de Bachilleres Enrique Laubscher, Coatepec, Veracruz.

### C. Área de investigación

Conocer el microbioma asociado con plantas adaptadas a condiciones áridas y semiáridas (principalmente agaves), evaluar el efecto de los factores bióticos y abióticos en la composición de dicho microbioma y analizar la funcionalidad de las interacciones planta-microorganismos en la adecuación de las plantas a su ambiente. Así como caracterizar y evaluar el potencial de promoción del crecimiento vegetal en el microbioma asociado con estas plantas.

### D. Publicaciones

1. Coleman-Derr D, Desgarenes D, Fonseca-Garcia C, Gross S, Clingenpeel S, Woyke T, De Angelis K, North G, Partida-Martinez LP, Visel A & Tringe S. (2016) Biogeography and cultivation affect microbiome composition in drought-adapted plants. *New Phytologist* 209: 798-811.
2. Desgarenes D, Garrido E, Gomez-Torres MJ, Peña-Cabriales JJ, Partida-Martinez LP. (2014) Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated agaves. *FEMS Microbiology Ecology* 90: 844-857. DOI: 10.1111/1574-6941.12438.

3. Carrión G, Desgarenes D. (2012) Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nematodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30: 86-90.
4. Desgarenes D., Carrión G, Núñez-Sánchez AE, Zulueta R, Zárate-Contreras JA. (2011) Nematofauna asociada a la rizósfera de *Saccharum officinarum* en la región Costa-Centro de Veracruz, México. *Agrociencia* 45: 785-795.
5. Desgarenes D., Sánchez-Nava P, Peña-Santiago R, Carrión G. (2009) Nematofauna asociada a la rizósfera de papas cultivadas (*Solanum tuberosum* L.) en la zona productora del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 611-614.
6. Desgarenes D., Carrión G, Núñez-Sánchez AE, Núñez- Camargo MC. (2006) Distribution of stages and in vitro larval hatching in *Globodera rostochiensis* cysts. *Nematropica* 36:251-260.

#### **E. Actividad docente y formación de recursos humanos**

Docencia:

1. Cursos en nivel licenciatura, Ingeniería en Agronomía, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana (UV), Xalapa, Veracruz: Fertilidad y nutrición de suelos
2. Cursos en nivel medio superior, Escuela de Bachilleres Enrique Laubscher, Coatepec, Veracruz: Química, Química orgánica, Biología y Ecología

Asesoría de tesis:

1. Tesis de licenciatura: 4 tesis de licenciatura como asesora directa.

#### **F. Estancias académicas y de investigación**

1. Estancia académica: Técnicas de extracción, preparación e identificación de nematodos fitoparásitos y de vida libre, Abril-Mayo 2005. Bajo la supervisión de: M. Sc. Alejandro Esquivel, Profesor Titular, Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica.
2. Estancia de investigación: Morfología y taxonomía de diversos grupos de nematodos edáficos (Determinación de Nematodos en Cultivo de Papa y Suelo de Bosque), Mayo-Junio 2008. Bajo la supervisión de: Dr. Reyes Peña Santiago, Profesor Titular, Universidad de Jaén, España. Beneficiada con la Beca Mixta para Estancias en el Extranjero (CVU/Becario: 210173/201926) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## G. Cursos y talleres

Como asistente:

1. Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta en Plantación de Mango. Campo Experimental "La Bandera", Universidad Veracruzana. Comité Estatal de Sanidad Vegetal (CESVER). Mayo 9, 2003. Actopan, Veracruz.
2. Microscopía básica y Análisis de la Imagen. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Noviembre 24-25, 2003. Xalapa, Veracruz.
3. Formación de Instructores Maestros en el Manejo seguro de Agroquímicos. Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria, A. C. (AMIFAC); Sociedad Mexicana de Fitopatología y Universidad veracruzana. Julio 24-26, 2004. Boca del Río, Veracruz.
4. Management of plant-parasitic nematodes. Colegio de Posgraduados Campus Montecillos, Rothamsted Research UK. Febrero 20-24, 2006. Texcoco, Estado de México.

Como ponente:

1. Desgarenes, D. Índice de eclosión de larvas de *Globodera rostochiensis* in vitro. Manejo integrado de plagas, Unidad de Capacitación para el Desarrollo Rural (UNCADER). Noviembre 8-12, 2004. Coatepec, Veracruz.

## H. Congresos

Como ponente:

1. Desgarenes, D. The *Agave* microbiome: from fundamental knowledge to biotech potential. 115<sup>th</sup> General Meeting of the American Society of Microbiology. Mayo 30-Junio 2, 2015. New Orleans, Louisiana.
2. Desgarenes D, Fonseca-García D, Coleman-Derr D, Visel A, Tringe S & Partida-Martínez LP. Biogeography and cultivation influence diversity and composition of the fungal communities associated with *Agave* species. International Symposium on Molecular Biology and Biotechnology of Fungi. Irapuato, Guanajuato, 12-14 de mayo de 2015.
3. Desgarenes D, Garrido E, Torres-Gómez MJ, Peña-Cabriales JJ & Partida-Martínez LP. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with agaves. XXX Congreso Nacional de Bioquímica, Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB). Guadalajara, Jalisco, 2-8 de noviembre de 2014.
4. Desgarenes, D. El Ingeniero Agrónomo en la investigación científica. 1<sup>er</sup> Foro de Estudiantes y Egresados para definir el Perfil del Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Mayo 31-Junio 2, 2005. Xalapa, Veracruz.

5. Desgarenes, D. Análisis de la Comunidad de Nematodos Asociados a la Rizósfera de Papas Cultivadas en la Región del Cofre de Perote, Veracruz, México. XXXIV Reunión Internacional de la Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos (ONTA). Octubre 29-Noviembre 2, 2007. Córdoba, Argentina.

Como asistente:

1. XXXI Congreso Nacional de Fitopatología y VI Internacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Julio 25-28, 2004. Veracruz, Veracruz.
2. XXII Congreso Internacional de la Papa. Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP) y Confederación Nacional de Productores de Papa (CONPAPA). Julio 30-Agosto 4, 2006. Toluca, Estado de México.

#### **I. Conferencias**

1. Desgarenes, D. El microbioma de los Agaves: del conocimiento básico al potencial biotecnológico. Seminario Institucional, Universidad Autónoma de Querétaro, Licenciatura en Microbiología. Febrero 19, 2016. Santiago de Querétaro, Querétaro.
2. Desgarenes, D. El microbioma de los Agaves. Seminario Institucional, UNAM, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Licenciatura en Ciencias Agrogenómicas. León, Guanajuato.

#### **J. Idiomas**

1. Idioma Inglés, Certificada con Nivel de Traducción de la Lengua Inglesa por el Centro de Enseñanza de Lenguas Extranjeras, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
2. Certificación TOEFL Institutional Testing Program (ITP), con 563 puntos en presentación de examen escrito.

#### **K. Habilidades computacionales**

R, Image Lab, Image J, Microsoft Office, manejo de shell en Linux y programación básica en Pearl y Python

Por este medio declaro que yo he preparado este trabajo de tesis de forma independiente y sin ayuda externa. Especialmente declaro que he citado de forma correcta y explícita a los autores y trabajos en los que esta tesis se apoya, así como las contribuciones de las personas que coadyuvaron en su desarrollo.

Irapuato, Guanajuato a... de 2016.

Damaris del Carmen Desgarenes Valido