

Informe final* del Proyecto IE001

Estudio de la microflora de los suelos de la zona de preservación ecológica 'La Uva' (Sinaloa) con vegetación de selva baja caducifolia empleando taxonomía molecular

Responsable: Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza
Institución: Instituto Politécnico Nacional
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Sinaloa
Dirección: Blvd Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, Guasave, Sin, 81101 , México
Correo electrónico: imaldona@ipn.mx
Teléfono, fax (687) 87 29626 y 29625
Fecha de inicio: Enero 29, 2010
Fecha de término: Marzo 18, 2014
Principales resultados: Base de datos, Informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Maldonado Mendoza, I. E., López Rivera, R. y J. D. Cordero Ramírez. 2014. Estudio de la microflora de los suelos de la zona de preservación ecológica 'La Uva' (Sinaloa) con vegetación de selva baja caducifolia empleando taxonomía molecular. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Sinaloa. **Informe final, SNIB-CONABIO, proyecto No. IE001.** México D.F.

Resumen:

La diversidad microbiana es un recurso poco estudiado en México. En zonas como Sinaloa en donde la agricultura es un importante motor socioeconómico, la mayor parte de la superficie es empleada para cultivos agrícolas. Este es el caso del municipio de Guasave, en donde la zona de preservación ecológica de centro de población La Uva constituye el único relicto de vegetación original preservada. Es de vital importancia iniciar esfuerzos a nivel local y nacional para conocer y conservar la diversidad microbiana presente en los suelos de esta región y del país en general. Una de las dificultades en el estudio de la diversidad microbiana es que se calcula que sólo se pueden cultivar en el laboratorio del 1 al 5% de la diversidad total de microorganismos. Por lo tanto, la utilización de técnicas moleculares de identificación en las que no se involucre el aislamiento de microorganismos resulta una estrategia que permite describir de manera más real la diversidad de los microorganismos presentes en un ecosistema tan diverso como lo es el suelo. En nuestro grupo iniciamos un primer esfuerzo a partir del 2006 a través de la generación de un banco de germoplasma vivo de microorganismos de suelo asociados a la rizosfera de plantas de tomate en un campo agrícola de la región, el cual consiste de cerca de 750 aislados de microorganismos preservados en ultracongelación a -70°C. Del mismo modo se generó información de la diversidad microbiana total a través del aislamiento de ADN genómico de suelo, y la posterior generación y secuenciación de bibliotecas de ADNr. Mediante esta estrategia se identificaron 500 fragmentos de ADN de origen procariote y 500 de origen eucariote. En el presente proyecto primeramente se propone concluir la identificación de los microorganismos existentes en el banco de tomate para posteriormente utilizar la misma estrategia de generación de un banco de microorganismos vivos y un banco de DNA de suelo a partir de muestras de rizosfera de *Datura stramonium*, la cual es una planta solanácea silvestre común en la zona de reserva. Posteriormente esta información será utilizada para realizar estudios comparativos entre tipo de organismos presentes en la rizosfera de solanáceas en zonas de cultivo, tal como el tomate, y solanáceas en zonas preservadas. El objetivo del trabajo en la zona de reserva incluirá el análisis de la diversidad de microorganismos asociados a la rizosfera de *D. stramonium* a través de la secuenciación masiva de 1,000 fragmentos de ADN ribosomal de una biblioteca generada a partir de ADN genómico de suelo y la generación de un banco de germoplasma vivo de 750 especímenes criopreservados a -70°C. Finalmente se propone elaborar una base de datos compatible con el sistema Biótica con los datos recabados para cada espécimen del banco, el cual incluirá los datos de colecta, georeferencias, características físicas y químicas de los suelos, fotografías que muestren la morfología colonial y microscópica de cada aislado, los datos del procedimiento de identificación molecular y análisis de secuencias. Además se pondrán a disposición los datos de las listas de las especies identificadas en

los dos bancos de germoplasma vivos y en los bancos generados a partir de los datos de secuenciación masiva de ADN ribosomal tanto de los suelos de la zona de cultivo como los de la zona de reserva.

- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
- ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.



Instituto Politécnico Nacional



CIIDIR-Sinaloa

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Informe Final del Proyecto CONABIO IE001

Estudio de la microflora de los suelos de la zona de preservación ecológica “La Uva” (Sinaloa) con vegetación de selva baja caducifolia empleando taxonomía molecular

Elaborado por:

Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Colaboración Técnica y Taxonómica: Nadia Rubí Douriet Gámez

Asistente Informático y Taxonómico: Rosario del Carmen Pérez Caraveo

Guasave, Sinaloa, México. Noviembre 29 del 2013

ÍNDICE

Sección	Página
Resumen y palabras clave	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	5
2.1. El suelo	5
2.2. La rizósfera	5
2.3. Interacciones microbianas en la rizósfera	6
2.4. Ecosistema, hábitat y formas de organización de los microorganismos	8
2.5. Técnicas moleculares para el análisis de la diversidad de microorganismos del suelo	10
2.6. Estudio de las comunidades de la microbiota del suelo	11
2.7. Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	13
2.8. Toloache (<i>Datura stramonium</i> , L.)	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. MÉTODOS	17
4.1. Muestreo de tomate y toloache	17
4.1.1. Toma de muestras de rizósfera de tomate	17
4.1.2. Toma de muestras de rizósfera de toloache	18
4.2. Tamizado de las muestras de suelo	20
4.3. Análisis físicoquímicos del suelo	21
4.4. Creación del banco de germoplasma	21
4.5. Prueba de viabilidad del banco de germoplasma	22
4.6. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate y toloache	23
4.6.1. Extracción de ADN genómico	23
4.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa	23
4.6.3. Visualización de los productos de PCR	24
4.6.4. Purificación de los productos de PCR, cuantificación y secuenciación del ADN	25
4.6.5. Análisis de las secuencias	25
4.7. Obtención del banco de clonas de ADN ribosomal que incluye organismos cultivables y no cultivables	25
4.7.1. Extracción del ADN genómico de suelo	25
4.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa	26
4.7.3. Electroforesis del producto de PCR	27
4.7.4. Precipitación del producto de PCR	28
4.7.5. Clonación de los productos de PCR	28
4.7.6. Transformación de los productos de PCR	28
4.7.7. Purificación del ADN plasmídico	29
4.7.8. Digestión del ADN plasmídico	29
4.7.9. Secuenciación y análisis de las secuencias	30
4.7.10. Análisis de los datos obtenidos y comparación de la microbiota de la rizósfera de <i>Datura stramonium</i> L. y de la rizósfera de tomate.	30
4.8. Incorporación de la información obtenida en una base de datos	31
5. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	32
5.1. Zona de preservación ecológica del centro de población “La Uva”	32
6. RESULTADOS	35
6.1. RIZÓSFERA DE TOMATE	35
6.1.1. Análisis físicoquímico de los suelos recolectados en agrícola del Rancho (rizósfera de tomate)	35
6.1.2. Obtención de las bibliotecas de cDNA de origen procaríótico y eucariótico de la rizósfera de tomate	35
6.1.3. Biblioteca de clonas de 16 S RDNA de origen procaríótico de tomate	36
6.1.3.1. Abundancia absoluta de los phyla en la biblioteca de clonas de 16S rDNA de origen procaríótico de la rizósfera de tomate	39
6.1.3.2. Abundancia de las especies encontradas en la biblioteca de origen procaríótico	39
6.1.3.3. Análisis filogenético de las secuencias de origen procaríótico	40
6.1.4. Biblioteca de origen eucariótico de la rizósfera de tomate	42
6.1.4.1. Abundancia de los phyla encontrados en la biblioteca de origen eucariótico	42
6.1.4.2. Abundancia de las especies encontradas en la biblioteca de origen eucariótico	42

6.1.4.3. Análisis filogenético de las secuencias de origen eucariótico de la rizósfera de tomate	46
6.1.5. Creación del banco de germoplasma vivo de rizósfera de tomate	48
6.1.5.1 Banco de tomate	48
6.2. RIZÓSFERA DE TOLOACHE	51
6.2.1. Análisis físico-químico del suelo	51
6.2.2. Creación del banco de germoplasma vivo de rizósfera de toloache	51
6.2.2.1. Identificación molecular de los especímenes vivos del banco de toloache	52
6.2.3. Obtención del banco de clonas de 16S ADNr de la rizósfera de <i>Datura stramonium</i> L.	55
6.2.3.1. Análisis de la microbiota del banco de clonas de origen procariota de la rizósfera de toloache	57
6.2.2.2. Análisis de la microbiota del banco de clonas de origen eucariota de la rizósfera de toloache	64
6.3. Análisis comparativo de la diversidad de la rizósfera de toloache y tomate	71
6.4. Incorporación de los datos de la rizósfera de tomate y toloache en la base de datos	78
7. DISCUSIÓN	81
7.1. Las colecciones científicas CIIDIR-001 y CIIDIR-004 son una herramienta adecuada para la conservación de microorganismos del suelo a largo plazo.	81
7.2. TOMATE	83
7.2.1. Identificación de las especies en la biblioteca de ADN ribosomal de origen procariótico de la rizósfera de tomate.	83
7.2.2. Identificación de las especies de ADN ribosomal en la biblioteca de origen eucariótico de rizósfera de tomate.	85
7.2.3. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate	87
7.3. TOLOACHE	88
7.3.1. Identificación de las especies en la biblioteca de ADN ribosomal de origen procariótico de la rizósfera de toloache.	88
7.3.2. Identificación de las especies de ADN ribosomal en la biblioteca de origen eucariótico de rizósfera de toloache.	90
7.3.3. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate y toloache.	92
7.4. Análisis comparativo de la diversidad de las rizósferas de toloache y tomate	94
7.5. Incorporación de los datos de la rizósfera de tomate y toloache en la base de datos	98
8. CONCLUSIONES	100
9. REFERENCIAS	102
9.1. Páginas electrónicas consultadas	108
10. ANEXOS	109

RESUMEN

La microbiota del suelo es un recurso muy importante debido a su alta diversidad. Los microorganismos participan en la mayoría de las transformaciones de nutrientes, y en otros procesos importantes para las plantas, siendo la rizósfera la zona donde la actividad microbiana suele ser más intensa. En Sinaloa la vegetación natural es escasa, debido a que la mayor parte del suelo es utilizado para labores agrícolas, lo que ha llevado a una pérdida de la diversidad de especies nativas y en particular en el municipio de Guasave, solo se cuenta con un área de protección ecológica de vegetación natural que comprende 17.88 hectáreas la cual corresponde a la Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población “La Uva”, en donde los estudios sobre las comunidades microbianas del suelo son muy escasos. En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado la diversidad de la microbiota de la rizósfera de tomate en un terreno de cultivo agrícola en Guasave, Sinaloa, y en “La Uva” la rizósfera de la especie *Datura stramonium*, la cual es una planta anual y ambas especies vegetales pertenecen a la familia Solanaceae. Los objetivos de nuestro trabajo fueron: 1) construir y mantener una colección de microorganismos asociados a la rizósfera de estas dos solanáceas: tomate (*Solanum lycopersicum*) y toloache (*Datura stramonium*), 2) analizar en suelos conservados de “La Uva” empleando una estrategia metagenómica (encuesta de DNA ribosomal) la diversidad de la microbiota y 3) contrastarla con la diversidad de otra especie de solanácea (tomate) crecida en una zona de cultivo (ya reportada). Los resultados muestran que en el banco de tomate y toloache el phylum más abundante fue el de Firmicutes y en segundo lugar el de Proteobacteria. El análisis de la diversidad de procariotas de la rizósfera de tomate y toloache permitió ver que existen diferencias entre los organismos más abundantes entre ambas rizósferas y que el phylum eucariota más abundante fue el mismo en la rizósfera de toloache y tomate: Ascomycota y que los organismos procariotas de rizósfera de toloache de una zona de suelo preservada es más diversa que los organismos procariotas de la rizósfera de tomate en una zona de suelo agrícola, mientras que la diversidad de eucariotas de ambas rizósferas resultaron ser menos diversas y más parecidas entre sí. El presente proyecto ha generado una base de datos que consta de 2862 ejemplares (organismos criopreservados y clonas de 16S rADN). 1442 accesiones corresponden a organismos cultivados de la rizósfera y 1420 a organismos no cultivados de la rizósfera (clonas de 16S rADN). Se presenta en esta base de datos un total de 188 especies y una infraespecie, 153 géneros y 96 familias. De acuerdo a nuestro conocimiento, éste constituye el esfuerzo más grande a la fecha del análisis de la diversidad de la microbiota asociada a la rizósfera de dos solanáceas, una cultivada y otra silvestre en el municipio de Guasave, Sinaloa, México.

Palabras clave

1. Colecciones de microorganismos; 2. ADN ribosomal; 3. Secuenciación masiva; 4. Microorganismos del suelo; 5. La Uva; 6. Guasave; 7. Sinaloa; 8. Diversidad microbiana; 9. Rizósfera.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad microbiana es un recurso poco estudiado en México. Este es el caso del municipio de Guasave, en donde la zona de preservación ecológica de centro de población La Uva constituye el único relicto de vegetación original preservada.

La principal actividad económica de Sinaloa es la agricultura. El Estado de Sinaloa en el 2012 obtuvo una derrama económica en la agricultura de 35,566.6 millones de pesos en una superficie agrícola de 1, 180,590 ha (SIAP, 2013). De ésta ~800,000 ha son de riego, en las que se desarrolla una agricultura tecnificada, con el uso de gran cantidad de agroquímicos, principalmente fertilizantes y plaguicidas que incluyen herbicidas, insecticidas y fungicidas (Cifuentes, 2002). Entre los principales productos hortícolas que se cultivan en el estado de Sinaloa, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es el más importante. La tecnificación, el hectareaje sembrado (18,623.05 ha) y la elevada producción alcanzada (56.34 Ton/Ha), han colocado a Sinaloa como el productor número uno de esta hortaliza a nivel nacional (SIAP, 2013). La producción es para consumo nacional, pero principalmente para exportación al extranjero. En 2012, la producción total estimada a nivel nacional fue de \$13,146.38 millones de pesos, de los cuales el estado de Sinaloa obtuvo un monto de \$3,070.43 millones de pesos, lo que representó cerca del 23.3% del valor de la producción total nacional (SIAP, 2013).

En una zona agrícola como el Norte de Sinaloa con un elevado potencial en la producción de cultivos de interés comercial, incluyendo al tomate, resulta importante conocer a los microorganismos presentes en la rizósfera para tratar de aprovecharlos en el control de enfermedades. Por esto, es de vital importancia iniciar esfuerzos a nivel local y nacional para conocer y conservar la diversidad microbiana presente en los suelos de esta región y del país en general.

Una de las dificultades en el estudio de la diversidad microbiana es que se calcula que sólo se pueden cultivar en el laboratorio del 1 al 5% de la diversidad total de microorganismos. Por lo tanto, la utilización de técnicas moleculares de identificación en las que no se involucre el aislamiento de microorganismos resulta una estrategia que permite describir de manera más real la diversidad de los microorganismos presentes en un ecosistema tan diverso como lo es el suelo.

Los microorganismos del suelo son un esencial componente de la comunidad biótica de las áreas naturales y las cuales son altamente responsables del funcionamiento de ecosistemas porque ellas participan en la mayoría de las transformaciones de nutrientes. Por lo tanto, la principal diversidad de un ecosistema son las comunidades de microorganismos. La gran mayoría de las bacterias y hongos del suelo de origen natural aún se desconocen debido a que solamente un porcentaje reducido de los microorganismos del medio natural pueden ser cultivados (Pace, 1997; Hackl *et al.*, 2004).

La producción de tomate se ha reducido por diferentes tipos de problemas, pero entre éstos por la presencia de diversos patógenos como bacterias, dentro de las que destacan el género *Xanthomonas* (Rivera-Soto, 2007), virus como el TYLCV (Brown *et al.*, 2006; Álvarez-Ruíz *et al.*, 2007), y diversos hongos (Martínez-Álvarez, 1998). Dentro de los hongos del suelo que inciden negativamente en la productividad del tomate en Sinaloa, podemos destacar por su potencial destructivo, la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), y la pudrición de la corona y de la raíz del tomate (PCRT), cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *radicis-lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker (Forl) (Apodaca-Sánchez *et al.*, 2004).

La mayoría de las estrategias para el combate de este patógeno se basan en el uso de pesticidas químicos, los cuales además de demostrar que no son eficientes en el control de esta enfermedad (Benhamou *et al.*, 1994), ocasionan dispersión inadecuada de desechos sólidos y efectos residuales que desequilibran el ecosistema, degradan el suelo y su capacidad productiva e incrementan los costos de producción. Ante esta problemática, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas de producción que impliquen bajos costos y que garanticen la preservación de los ecosistemas. La producción de agrobiológicos microbianos, pudieran ofrecer una solución, aunque para ello se requiere trabajo preferentemente con microorganismos nativos, los cuales ya han co-evolucionado con las plantas y otros microorganismos; además están adaptados a las condiciones medio ambientales propias de la región, lo cual les confiere ventajas y mayores posibilidades de éxito (Martínez-Álvarez, 1998).

Datura stramonium L. es una planta anual perteneciente a la familia de las solanáceas (Hawkes *et al.*, 1979), la cual está presente en la Zona de Preservación Ecológica de

Centro de Población “La Uva” y reportada con altos niveles de colonización por hongos micorrízicos arbusculares (Orduño-Vega, 2008) pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos del phyla Glomeromycota (Pérez-Arellanes, 2010). La razón por la que se propone estudiar a esta especie silvestre de la familia de las solanáceas es por la importancia que esta familia representa para la región, ya que diversos cultivos agrícolas, como lo son el tomate, la papa y el chile forman parte de ésta por lo que los organismos asociados a la rizósfera de toloache pudieran ser de importancia biotecnológica para el manejo de los cultivos de importancia comercial en el futuro.

Para estudiar las características las comunidades microbianas de la rizósfera de *Datura stramonium* L. se muestreó la rizósfera de esta especie en la Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población “La Uva”, la cual es una zona preservada en donde las alteraciones que ha sufrido este ecosistema, y por lo tanto el suelo han sido mínimas.

En el presente trabajo se combina el análisis de las poblaciones de microorganismos asociados a la rizósfera de las dos solanáceas: tomate (en una zona de cultivo agrícola) y toloache (creciendo de forma silvestre en una zona de reserva municipal) en 1) colecciones de microorganismos vivos de suelo asociados a la rizósfera de estas dos especies los cuales consistieron en cerca de ~750 aislados de microorganismos preservados en ultracongelación a -70°C por rizósfera y 2) análisis de la diversidad microbiana total a través del aislamiento de ADN genómico de suelo, y la posterior generación y secuenciación de bibliotecas de ADNr. Mediante esta estrategia se analizaron 500 fragmentos de ADN de origen procariote y 500 de origen eucariote por rizósfera. Esta información nos permitió realizar estudios comparativos entre tipo de organismos presentes en la rizósfera de solanáceas en zonas de cultivo, tal como el tomate, y solanáceas en zonas preservadas. Se preparó una base de datos con los datos recabados para cada espécimen del banco, la cual incluye los datos de colecta, características físicas y químicas de los suelos, taxonomía del espécimen, fotografías que muestren la morfología colonial y microscópica de cada aislado, los datos del procedimiento de identificación molecular y el análisis de secuencias. Además de que se pone a través de CONABIO la base de datos a disposición pública incluyendo los datos de las especies identificadas en los dos bancos de germoplasma vivos y en los bancos generados a partir de los datos de secuenciación masiva de ADN ribosomal tanto de los suelos de la zona de cultivo como los de la zona de reserva.

2. ANTECEDENTES

2.1. El suelo

El suelo es un sistema complejo muy importante en los ecosistemas, ya que en él se lleva a cabo una gran actividad de macro y microorganismos que contribuyen a procesos importantes para la vida de plantas y animales terrestres, tales como los ciclos de los nutrientes. El suelo es el producto de la acción del clima y de los organismos, se compone de un material parental, del sustrato geológico o mineral subyacente y de un aumento en el componente orgánico en el que los organismos y sus productos están entremezclados con las partículas finamente divididas del material en cuestión, conteniendo gases y agua entre los espacios porosos de las partículas (Odum, 2001). El crecimiento microbiano más importante en el suelo tiene lugar en la superficie de las partículas del suelo, normalmente en la rizósfera (Madigan *et al.*, 2006). La textura y porosidad del suelo es una característica importante y determina en gran parte la disponibilidad de nutrientes para los organismos (Odum, 2001). Los microorganismos del suelo modifican también la estructura del suelo mediante la producción de exudados con propiedades adhesivas, que permiten la agregación de minerales y compuestos orgánicos (Kibblewhite *et al.*, 2008).

2.2. La rizósfera

La rizósfera es la zona biológicamente activa del suelo alrededor de la raíz en donde se llevan a cabo la interacción de las plantas con muchos microorganismos entre los que se incluyen bacterias y hongos (Singh *et al.*, 2004). Son tres componentes separados los reconocidos en la rizósfera pero que interaccionan entre sí. Estos son la rizósfera (suelo), el rizoplano, y la endorizósfera o raíz. La rizósfera es la zona del suelo influenciada por las raíces mediante la liberación de sustratos que afectan la actividad microbiana; el rizoplano es la superficie de la raíz, incluyendo las partículas del suelo adheridas fuertemente; la raíz es una parte del sistema, porque ciertos microorganismos, los endófitos, son capaces de colonizar el tejido de la raíz. La colonización microbiana del rizoplano y/o tejido de la raíz es conocida como colonización de la raíz, mientras

que la colonización del volumen adyacente del suelo bajo la influencia de la raíz es conocida como colonización de la rizósfera (Barea *et al.*, 2005).

Los microorganismos en la rizósfera están sujetos a un ambiente en el cual la suplementación del agua, oxígeno y nutrientes es altamente influenciada por la actividad de las plantas (Cardon, 2007). La rizósfera es la zona en donde la actividad microbiana suele ser mayor, siendo el recuento de bacterias en la mayoría de los casos superior en la rizósfera/rizoplano que en las regiones del suelo en donde no hay raíces; pudiendo ser muchas veces superior (Madigan *et al.*, 2006). Esto se debe a que las raíces de las plantas exudan una gran cantidad y gama de compuestos orgánicos entre el suelo más cercano a la raíz (Cardon, 2007). El carbono exudado, es un sustrato y es una entrada químicamente activa en el ambiente del suelo, es un determinante crítico de la composición de las comunidades ya que resulta en la interacción de la raíz con las comunidades del suelo existentes. Por esto, los exudados de la raíz pueden influenciar las interacciones bióticas en base a la atracción de organismos benéficos o patogénicos (Nehl *et al.*, 1997; Tesfaye *et al.*, 2003). Esto resulta en una densidad de población bacteriana que es de uno a dos órdenes de magnitud más alta en la rizósfera/rizoplano que en otras partes del suelo (Molina *et al.*, 2000 y Morgan *et al.*, 2005). Sin embargo, la diversidad de especies de bacterias que colonizan este hábitat es significativamente menor que la encontrada en otras regiones de suelos, lo que indica que existe una fuerte presión de selección en la rizósfera (Marilley *et al.*, 1999).

A pesar del importante papel desempeñado por la diversidad de bacterias en las comunidades de la rizósfera de las plantas, se conoce poco sobre la distribución y la abundancia de los microorganismos asociadas a la rizósfera de las plantas (Soo *et al.*, 2005).

2.3. Interacciones microbianas en la rizósfera

Una gran cantidad de microorganismos se encuentran interaccionando activamente junto con los demás componentes del ecosistema de la rizósfera. Las bacterias y los hongos, tienen muchos diferentes niveles tróficos y hábitos de vida y una variedad de relaciones saprófitas y simbióticas, incluyendo relaciones que pueden ser perjudiciales

como lo son los patógenos y benéficas como el mutualismo (Barea *et al.*, 2005). Los microorganismos perjudiciales incluyen tanto las bacterias y hongos patógenos de las plantas, los parásitos y no parásitos de la rizósfera (Barea *et al.*, 2004). Los saprófitos benéficos, de una diversidad de grupos microbianos, son capaces de promover el crecimiento vegetal y la salud de las plantas, estos incluyen: descomponedores de detritus orgánico, las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), y los antagonistas de hongos y bacterias patógenos de raíz. Algunos de estos microorganismos, los hongos endófitos, colonizan los tejidos radicales y pueden promover el crecimiento vegetal y la salud de las plantas. Los simbioses benéficos, mutualistas de plantas incluyen las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrízicos arbusculares (Barea *et al.*, 2005).

Las plantas viven en asociación con una rica diversidad de microorganismos desde el momento en que las semillas son plantadas en el suelo (Smith *et al.*, 1999). Las especies de plantas pueden ser importantes en determinar la estructura de las comunidades de bacterias y hongos de la rizósfera, con efectos tanto positivos y negativos sobre diferentes grupos microbianos (Cardon, 2007). Las interacciones más importantes que se desarrollan en la rizósfera se pueden clasificar en tres grupos principales:

(1) Interacciones planta-planta: causadas por el contacto y solapamiento de los sistemas radicales, lo cual puede resultar en la competencia por nutrientes e intercambio de señales de importancia a nivel poblacional en un ecosistema.

(2) Interacciones planta-microorganismo: determinadas por las actividades de las plantas que estimulan el crecimiento de los microorganismos alrededor de las raíces (efecto rizósfera) y por las actividades microbianas que afectan el desarrollo de las plantas ya sea en beneficio de éstas o induciéndoles enfermedades.

(3) Interacciones microorganismo-microorganismo: las cuales incluyen actividades de sinergismo y antagonismo (Martínez-Álvarez, 2003).

A su vez las interacciones planta-microorganismo pueden clasificarse en tres grupos básicos:

(i) Interacciones negativas (patogénicas).

(ii) Interacciones positivas, en las cuales ambas partes (planta y microorganismo) obtienen beneficios de esta asociación (simbiosis) o sólo una de las partes sale beneficiada pero sin dañar a la otra.

(iii) Interacciones neutras, en donde ninguna de las partes derivan en un beneficio directo de la interacción y en donde ninguno de los organismos es dañado (Singh et al., 2004).

Los microorganismos, a su vez, desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis (Wright et al., 1998); en los ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, el nitrógeno, oxígeno, el fósforo y el azufre (Madigan *et al.*, 2006); además de causar la degradación de compuestos xenobióticos (Claus et al., 1988); influir en la fertilidad de las plantas (O'Donnell et al., 2000) y promover la protección frente a patógenos (Whipps, 2001).

2.4. Ecosistema, hábitat y formas de organización de los microorganismos

En los sistemas microbianos, el crecimiento celular forma poblaciones. Las poblaciones que se relacionan en una simbiosis íntima se denominan consorcios, y los conjuntos de agrupaciones interaccionan formando comunidades microbianas, que interaccionan con comunidades de macroorganismos y con el ambiente, todo lo anterior engloba y define el ecosistema (Madigan *et al.*, 2006).

Para explicar con detalle estos términos, se incluye a continuación una breve discusión de los componentes del ecosistema de la rizósfera. Las poblaciones se componen de grupos de células relacionadas, que generalmente derivan de una única célula parental por divisiones celulares sucesivas. El lugar donde vive una población microbiana en un determinado ambiente se denomina hábitat. Las poblaciones de células en la mayoría de los casos se relacionan con otras formando las comunidades microbianas. Las poblaciones en las comunidades microbianas se relacionan de diferentes modos y tales interacciones pueden ser perjudiciales o beneficiosas, en muchos casos las poblaciones

interaccionan y cooperan en sus funciones nutricionales con los productos de desecho derivados de las actividades metabólicas de algunas células sirviendo como nutrientes para otras. Los organismos de un hábitat también se relacionan con su ambiente físico y químico, por lo que la composición de una comunidad microbiana en un hábitat concreto está determinada en gran parte por las características físicas y químicas de ese medio. En conjunto, se denomina ecosistema a los organismos y a los componentes físicos y químicos de su medio (Madigan *et al.*, 2006).

En la naturaleza el crecimiento de los microorganismos depende de los recursos (nutrientes) disponibles y de las condiciones de crecimiento. Las diferencias en el tipo y cantidad de los diferentes recursos y las condiciones fisicoquímicas de un hábitat define el nicho de cada organismo en particular (Madigan *et al.*, 2006). Proteobacteria y Acidobacteria han sido sugeridos como indicadores del estado trófico en suelos terrestres (Smit *et al.*, 2001). Las comunidades bacterianas están altamente correlacionadas con el pH del suelo, así como con su diversidad (Hartman *et al.*, 2008). Se ha demostrado que el cambio en el uso del suelo influye en la composición de las comunidades microbianas a través de gradientes de perturbación (McCraig *et al.*, 2001; Buckley *et al.*, 2003).

La composición de las comunidades bacterianas que habitan en los suelos de bosques naturales están relacionados con las condiciones ambientales específicas que acompañan a los distintos tipos de vegetación de los bosques naturales (Hackl *et al.*, 2004). En el planeta Tierra existen incontables nichos microbianos y de ellos depende, en parte, la gran diversidad metabólica de los microorganismos y la diversidad microbiana. El microambiente es el lugar exacto del hábitat en el que un microorganismo vive y lleva a cabo su metabolismo. En una partícula de suelo, pueden existir diversos tipos de microorganismos, con características físicas y químicas muy diferentes, la densidad de cada población dependerá del grado de semejanza del hábitat a su nicho principal. Los microambientes, son por lo tanto heterogéneos, y las condiciones de un determinado microambiente pueden cambiar muy de prisa. Por esta razón, los microambientes contribuyen al aumento de la diversidad microbiana en un espacio físico muy pequeño (Madigan *et al.*, 2006).

Las comunidades microbianas pueden mediar los ciclos del carbono y nitrógeno en ecosistemas críticos y pueden responder a cambios en vegetación y clima (Waldrop et al., 2006). Los cambios en el uso del suelo alteran el ecosistema de los suelos, provocando una pérdida en la biodiversidad y el agotamiento de carbono en el suelo y de la diversidad microbiana (Doran *et al.*, 2000).

2.5. Técnicas moleculares para el análisis de la diversidad de microorganismos del suelo

Las bacterias cultivables del suelo comprenden una fracción menor de las bacterias totales del suelo, se estima que al menos el 1% de los procariontes en la mayoría de los ambientes pueden ser cultivables de forma aislada (Patrick *et al.*, 2005). La utilización de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana del suelo ha permitido un conocimiento más profundo sobre la diversidad de las comunidades bacterianas del suelo.

El uso de técnicas basadas en la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal ha permitido un estudio profundo de la diversidad, estructura y dinámica de las comunidades bacterianas del suelo (Rappé *et al.*, 2003). El ARNr 16S es un polirribonucleótido, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Debido a que proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el término ARNr SSU (por sus siglas en inglés, small sub-unit) se utiliza para nombrarlo. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos ha revelado la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos huella (Woese, 1985). Éstas son secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca o sólo raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos huella pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Rodicio et al., 2004).

La secuencia del gen 16S del ADNr es extensamente usado para el análisis y evaluación de la relación filogenética de bacterias y establecer su estatus taxonómico (Woese,

1987; Neefs, 1990; Olsen *et al.*, 1986; Vandamme *et al.*, 1996; revisado en Maldonado-Mendoza *et al.*, 2009). Los ARN ribosomales son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. El grado de semejanza de las secuencias del ARN ribosomal de dos organismos indica su parentesco evolutivo relativo (Madigan *et al.*, 2006). De igual manera se ha reportado que la variabilidad de la secuencia dentro de la región ITS del ADNr de eucariotes, puede ser muy útil para el diagnóstico taxonómico en organismos eucarióticos, los cuales han sido utilizados, por ejemplo, para la identificación taxonómica de hongos (Visentin *et al.*, 2009).

2.6. Estudio de las comunidades de la microbiota del suelo

Del número total de especies en una comunidad conjunta, un porcentaje relativamente pequeño suele ser abundante y un porcentaje grande es raro. Al paso que las pocas especies corrientes o dominantes explican en gran parte la corriente de energía en cada grupo trófico, es el gran número de especies raras el que condiciona, en gran parte, la diversidad de las especies de los grupos tróficos y de las comunidades enteras. La diversidad de las especies suele ser baja en los ecosistemas controlados físicamente y elevados en los ecosistemas controlados biológicamente (Odum, 2001). Una diversidad más alta significa cadenas de alimentaciones más largas y más casos de simbiosis, así como mayores oportunidades de control de la retroalimentación negativa, que reduce oscilaciones y, por consiguiente, aumenta la estabilidad. Las comunidades de medios estables, tienen una diversidad de especies más alta que las comunidades sujetas a perturbaciones estacionales o periódicas, ya sea por parte del hombre o de la naturaleza (Odum, 2001).

En el presente trabajo se analiza la biodiversidad, abundancia y frecuencia de las especies de las comunidades microbianas de la rizósfera de toloache y tomate en condiciones de conservación contrastantes, por lo que a continuación se describen estos términos:

- La biodiversidad o diversidad biológica se ha definido como “la variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes, incluyendo, entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como los

complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies, entre especies y de ecosistemas” (Moreno, 2001).

- La abundancia de especies de una comunidad es el número de individuos de las especies que conforman a la comunidad. Una alta abundancia relativa de un grupo en una comunidad microbiana puede indicar que el grupo es numéricamente dominante o que está creciendo rápidamente dentro de esa comunidad (Buckley *et al.*, 2003).
- Frecuencia, es el número de veces que aparece en la muestra dicho valor de la variable.
- La composición de la comunidad microbiana puede ser correlacionada con una serie de factores ambientales, sin embargo, estudios realizados sugieren que, a diferencia de la abundancia bacteriana, la riqueza y la diversidad bacteriana no se ven afectadas por la precipitación en suelos con bajos insumos de carbono a nivel continental (Bachar *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha determinado que el pH del suelo es un mejor parámetro para predecir la diversidad de bacterias del suelo y la riqueza; con los niveles más bajos de diversidad y riqueza observados en los suelos ácidos. En consecuencia, los factores ambientales con frecuencia citados como buenos parámetros para predecir la diversidad vegetal y animal a escala, tienen poco efecto sobre la diversidad bacteriana del suelo. El pH también sirve como un buen parámetro para predecir la composición de las comunidades microbianas en general (Fierer *et al.*, 2006).

Las diferentes prácticas agrícolas pueden afectar a la diversidad microbiana del suelo y por lo tanto el nivel de supresividad de enfermedades de las plantas. Los efectos de las prácticas agrícolas en las comunidades de *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido estudiadas y se han observado correlaciones entre los niveles de supresividad de enfermedades y la diversidad de estos grupos de bacterias (Garbeva *et al.*, 2006).

2.7. Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las hortalizas más importantes a nivel mundial, tanto por la superficie que se cultiva, como por la producción obtenida;

ocupa el segundo lugar después de la papa. Además, el cultivo de esta especie produce una alta tasa de remuneración económica, es importante desde el punto de vista de la generación de empleos en el campo, y posee buenas propiedades nutricionales (Ramírez-Villapudua, 2006). Actualmente, el tomate se cultiva en más de 160 países.

México ocupa el décimo lugar en cuanto a producción con una aportación del 1.53% (FAO, 2011). En México el tomate se cultiva prácticamente en todos los estados, destacándose Sinaloa como el principal productor; dentro de éste sobresalen los Valles de Culiacán (Municipios de Culiacán y Navolato) y el valle del Fuerte (Municipios de Ahome, El Fuerte y Guasave). El tomate es un cultivo que sobresale por su importancia económica y social. Genera cerca de 500 mil empleos; en actividades que van desde labores de cultivo y cosecha, hasta selección, empaque y venta del producto (Ramírez-Villapudua, 2006).

El tomate es un miembro de la familia de las solanáceas, la cual comprende alrededor de 1,500 especies tropicales y subtropicales; y es originario de América Central o Sudamérica. El centro de origen del género *Lycopersicon* es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, zona en la que *L. esculentum* muestra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres (Macías, 2003). Sin embargo, la evidencia histórica favorece a México como el centro más importante de domesticación del tomate, ya que existe evidencia ancestral de la utilización de formas domésticas en nuestro país. Sus frutos eran bien conocidos y empleados como alimento por las culturas indígenas que habitaban la parte centro y Sur de México, quienes la llamaban en lengua náhuatl “tomatl”; en 1554 fue llevado a Europa, comercializándose en Estados Unidos hasta el año 1835 (Ramírez-Villapudua, 2006).

Los tomates son bajos en calorías y son una buena fuente de vitamina C y antioxidantes. Se pueden consumir tanto de manera fresca como industrializado (Agroinformación, 2008). Puede desarrollarse de forma rastrera, semi-recta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas) (Ramírez-Villapudua, 2006).

El género *Lycopersicon*, comprende diferentes especies comúnmente divididas en dos subgéneros: 1) *Eulycopersicon* que incluye especies de frutos rojos y 2) *Eriopersicon*

que son, en su mayor parte, frutos verdes. Todas las especies que pertenecen al género *Lycopersicon* son diploides, $2N = 24$ cromosomas (Ramírez-Villapudua, 2006; Agroinformación, 2008).

2.8. Toloache (*Datura stramonium*, L.)

Datura stramonium L.; también conocida como toloache, es una planta anual, perteneciente a la familia de las solanáceas. Es una planta robusta, de 30 a 100 cm de altura, que desprende un olor fétido, posee un solo tallo y pocas ramas, de hojas ovales, dentadas lobuladas de 5 a 15 cm de largo y de 4 a 10 cm de ancho; presentan vellosidades en ambas superficies y con pecíolos de 2 a 5 cm de largo. Poseen flores solitarias en las bifurcaciones del tallo, son erectas y con pedicelos de 5 a 7 cm de largo en la flor, y de 7 a 15 mm de largo en el fruto. El cáliz es tubular, de 2.5 a 3.5 cm de largo, con los 5 lóbulos triangular-acuminados de 5 a 7 mm de largo; la corola es blanca o púrpura-azul pálida, con forma de embudo, de 6 a 10 cm de diámetro (Figura 1). El fruto es una cápsula erecta, ovoide, de 2.5 a 3.5 cm de diámetro, glabra, seca y subleñosa en la madurez, dehiscente de 4 valvas, armada con numerosas espinas fuertes, agudas, hasta de 1 cm de largo; semillas negras, de 3 a 3.5 cm de largo (Figura 1) (Nee, 1986).

Se le encuentra en terreno ruderal, en sitios cultivados, terraplenes, escombros y en una gran variedad de tipos de vegetación. Está ampliamente distribuida como maleza en áreas templadas y tropicales por todo el mundo. Su localización va desde el nivel del mar hasta los 2,300 m. sobre el nivel del mar y florece todo el año (Martínez y Matuda, 1979; Nee, 1986; Schauenberg y Paris, 1979).



Figura 1. Fotografías de *Datura Stramonium* L, en donde se observan la forma de su flor y su fruto (foto a la derecha). Fotografía tomada de López-Rivera, 2011.

La mayor parte de los estudios que se realizan en esta planta son con fines farmacéuticos o industriales debido a que el género *Datura* representa el grupo más importante de plantas halucinógenas entre las solanáceas, al menos en cuanto al uso conocido y produce una amplia gama de metabolitos secundarios, tales como alcaloides derivados del tropano que son empleados farmacológicamente en formulaciones comerciales, tales como la hiosciamina y la escopolamina (revisado en Maldonado-Mendoza et al., 1992). La hiosciamina es un alcaloide derivado del tropano que se encuentra en plantas de la familia Solanácea, actúa como anticolinérgico. Ha sido utilizado para el alivio de los síntomas de trastornos gastrointestinales, ciertas cardiopatías y los síntomas de la enfermedad de Parkinson. Por otra parte, la escopolamina es un alcaloide tropánico que se encuentra como metabolito secundario en plantas de la familia Solanácea. Este compuesto actúa como depresor de las terminaciones nerviosas y del cerebro y su efecto es anticolinérgico, bloqueando los receptores musculares del sistema nervioso central, corazón, intestino y otros tejidos. A pesar de que estos metabolitos secundarios producidos por el toloache contienen propiedades narcóticas, halucinantes y tóxicas, también se les ha dado un uso medicinal en diferentes estados de México, algunas de sus aplicaciones son: como analgésico, para aliviar la tosferina, como antiinflamatorio, en el tratamiento del asma y como tranquilizante (www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Describir y preservar la biodiversidad de microorganismos de los suelos de la zona de preservación ecológica de centro de población “La Uva” en Sinaloa con vegetación de selva baja caducifolia y compararla con la biodiversidad de microorganismos de un suelo agrícola.

3.2. Objetivos específicos

1. Preservar la diversidad de los microorganismos cultivables de la rizósfera de especies solanáceas mediante la creación de bancos de germoplasma vivo empleando criopreservación para su mantenimiento por largos períodos de tiempo.
2. Elaborar inventarios de la microbiota cultivable y no cultivable presente en los suelos de la zona de preservación ecológica de centro de población “La Uva” en Sinaloa empleando como herramienta la taxonomía molecular.
3. Describir la biodiversidad de microorganismos rizosféricos de una planta solanácea desarrollada en una zona preservada.
4. Realizar un análisis comparativo de diversidad, abundancia y frecuencia de los microorganismos asociados a la rizósfera de dos solanáceas: tomate y toloache.

4. MÉTODOS

En la Figura 2 se muestra un esquema general de la metodología a seguir para lograr alcanzar los objetivos del proyecto.

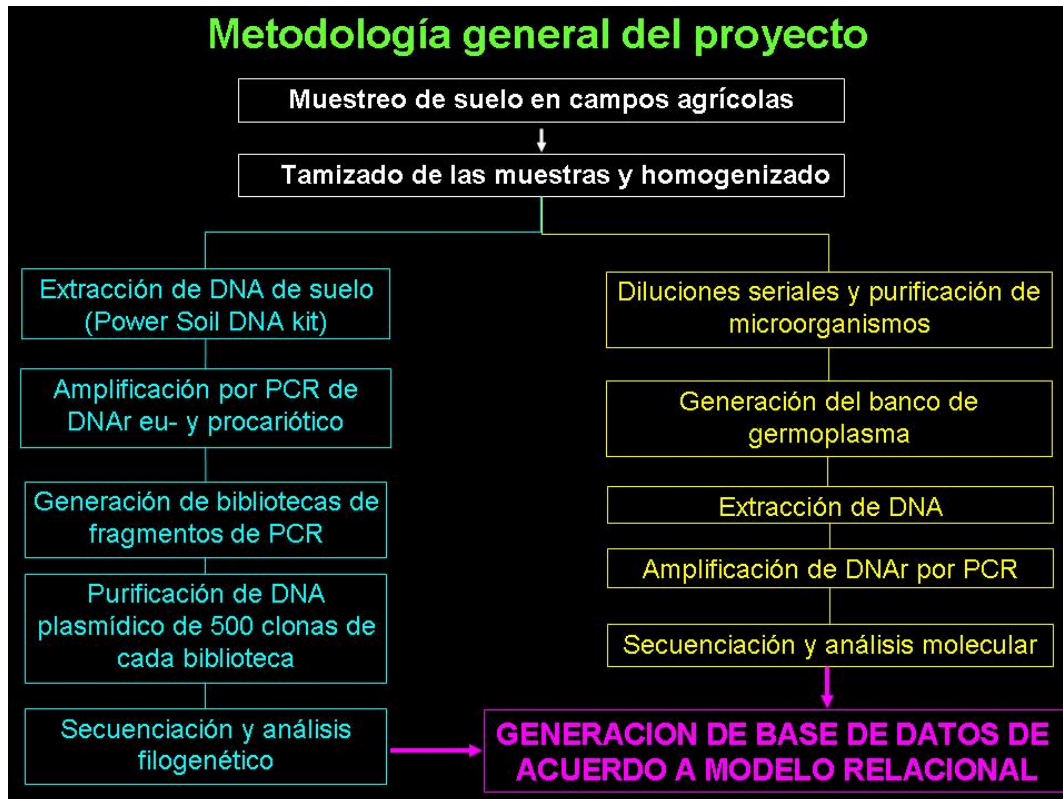


Figura 2. Esquema general del proyecto.

4.1. Muestreo de tomate y toloache

4.1.1. Toma de muestras de rizósfera de tomate

Las muestras de suelo se tomaron de un lote comercial de tomate cv. Gabriela, perteneciente a la Agrícola del Rancho ubicada en Campo Díaz, municipio de Guasave, Sinaloa, México. Para ello se realizó un muestreo de cinco de oros, el cual consistió en trazar un cuadrante, y tomar 5 muestras equidistantes. En cada punta del cuadrante se tomó una muestra de suelo y una más del centro para tener un total de 5 muestras, la distancia entre cada punto de muestra fue de 5 surcos de siembra (1.8 m de distancia entre cada surco), cada punto de muestreo se georeferenció (Cuadro 1). Se tomaron columnas de suelo de aproximadamente 50 cm. de profundidad y 10 cm. de diámetro

con un nucleador de acero inoxidable, lo más cercano posible al tallo principal de la planta de tomate (Figura 3).

Punto de muestreo	Coordenadas
1	25° 30' 926" N, 108° 29' 957" W
2	25° 30' 941" N, 108° 29' 957" W
3	25° 30' 919" N, 108° 29' 968" W
4	25° 30' 933" N, 108° 29' 978" W
5	25° 30' 944" N, 108° 29' 963" W

Cuadro 1. Ubicación de los puntos de muestreo de suelo en la Agrícola del Rancho S.A de C.V.



Figura 3. Procedimiento de toma de muestras de suelo en el campo experimental. (A) selección del punto de la toma de muestra; (B) muestra extraída de la rizósfera; (C) marcaje y almacenaje para transporte de la muestra.

4.1.2. Toma de muestras de rizósfera de toloache

Se tomaron 25 muestras de suelo de la rizósfera de plantas de la especie *Datura stramonium* L. en la Zona de Preservación Ecológica del Centro de Población “La Uva” (Cuadro 2), las muestras se tomaron haciendo cinco cuadrantes aproximados (Figura 4), ya que las poblaciones de *Datura stramonium* L. fueron escasas en el área de muestreo, se colectaron cinco muestras en cada cuadrante (Figura 5).

Se tomó la parte del suelo más cercana a la raíz de cada una de las muestras, las cuales se secaron a temperatura ambiente, se tamizaron utilizando un tamiz de 2 mm, se homogeneizaron y se mantuvieron a 4°C. Posteriormente, se obtuvo una muestra compuesta mezclando cantidades iguales de las cinco muestras de rizósfera tomadas en

cada uno de los cuadrantes por separado obteniendo en total cinco muestras compuestas una por cada cuadrante en la zona de preservación. Finalmente se mezclaron cantidades iguales de las cinco muestras compuestas y se obtuvo una única muestra compuesta la cual se utilizó para la realización de las diluciones seriales para el aislamiento de los microorganismos. De la muestra compuesta se tomaron dos alícuotas de 2.5 gr y se mantuvieron conservadas a -70°C, para la extracción de ADN de suelo y la obtención del banco de clonas. Se tomó además una segunda submuestra de 100 gr de las 25 muestras individuales para hacer el análisis del suelo (NPK, pH, MOD).

Cuadro 2. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población “La Uva”.

Cuadrantes-puntos muestreados	Coordenadas geográficas
1	N25° 29.095', W108° 28.106'
2	N25°29.089', W108°28.115'
3	N25°29.080', W108°28.125'
4	N25°29.073', W108°28.130'
5	N25°29.073', W108°28.130'
6	N25° 28.991', W108° 28.143'
7	N25°29.122, W108°28.052'
8	N25°29.122', W108°28.052'
9	N25°29.210', W108°28.010'
10	N25°29.221', W108°27.976'
11	N25° 29.175', W108° 28.015'
12	N25°28.979', W108°28.142'
13	N25°28.979', W108°28.142'
14	N25°29.182', W108°28.005'
15	N25°29.104', W108°27.999'
16	N25°29.175', W108°28.015'
17	N25° 29.333', W108° 27.871'
18	N25° 29.333', W108° 27.871'
19	N25°29.331, W108°27.871'
20	N25°29.331, W108°27.871'
21	N25° 29.070', W108° 28.066'
22	N25° 29.066', W108° 28.063'
23	N25° 29.062', W108° 28.062'
24	N25° 29.020', W108° 28.059'
25	N25° 29.090', W108° 28.059'



Figura 4. Imagen satelital en la que se ubican los puntos muestreados en la Zona de Preservación Ecológica del Centro de Población “La Uva”.



Figura 5. Toma de las muestras de suelo de la rizósfera de *Datura stramonium* L. en la zona de preservación “La Uva”.

4.2. Tamizado de las muestras de suelo

Los suelos fueron marcados con el número del punto de donde se tomaron y se trasladaron al laboratorio, en donde se dejaron secar por una semana. Una vez secas las muestras, se pulverizaron las partículas gruesas del suelo con un martillo, para posteriormente pasarlas por los siguientes tamices: 2 mm (No. 10), 1 mm (No. 18) y por último por el de 125 μ m (No. 120). Una vez tamizadas se tomó el total del tamizado de todas las muestras del lote (o localidad) y se homogenizaron para constituir una muestra compuesta (O'Brien et al., 2005).

4.3. Análisis físicoquímicos del suelo

Se tomó una submuestra de 100 g de cada una de las muestras colectadas (cinco de tomate y 25 de toloache) y se entregó al laboratorio de Nutrición Vegetal del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa, para el análisis de los parámetros del suelo NPK, pH y materia orgánica disponible (MOD).

4.4. Creación del banco de germoplasma

Una submuestra de 5 g fue tomada de la muestra compuesta para realizar una dilución serial y purificar los microorganismos cultivables presentes en el suelo. El protocolo consistió en disolver 5 g de muestra en 45 ml de agua destilada estéril, en un tubo Falcon estéril de 50 ml. Para una mejor homogenización se utilizó un agitador magnético por 10 min. Una vez que se homogenizó, se tomaron 100 μ l de esta dilución (1×10^{-1}) y se agregó a un tubo Falcon estéril de 15 ml con 9.9 ml de agua destilada estéril; posteriormente se tomó 1 ml de esta segunda dilución (1×10^{-3}) y se agregó a otro tubo Falcon de 15 ml que contenía 9 ml de agua destilada estéril (1×10^{-4}). Este paso se repitió 3 veces más hasta llegar a la dilución de 1×10^{-7} . Se tomaron 100 μ l de cada una de las diluciones y se sembraron por triplicado en cajas de PDA y LB con el fin de seleccionar preferentemente a los hongos o bacterias, respectivamente. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente (25-30 °C). Las colonias crecidas en las placas a las 24 y 48 h fueron tomadas con ayuda de un pistilo estéril y se resembraron de nuevo en placas de PDA o LB. Cada placa se dividió de manera proporcional en ocho secciones (Figura 5); en cada una de las divisiones se resembraba una cepa, esto se realizó con cada una de las cepas hasta que se observó el aislado creciendo totalmente puro.

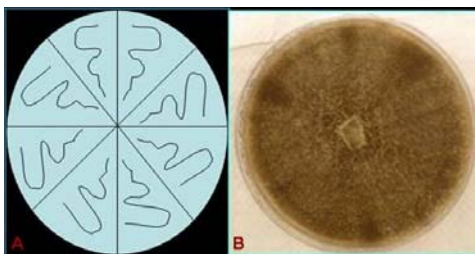


Figura 5. Purificación de los microorganismos cultivables del suelo de rizósfera de tomate. A) Resembrado de ocho cepas obtenidas de la siembra de las diluciones seriales. B) Ejemplo de una cepa de un hongo puro.

Una vez obtenido el aislado puro, se tomó una asada de éste y se depositó en tubos de criopreservación los cuales contenían 1 ml de LB líquido con glicerol al 15%, los tubos se etiquetaron y se almacenaron en un ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 6) (Pasarell *et al.*, 1992). Cada muestra se colocó por duplicado en dos ultracongeladores en edificios distintos de las instalaciones del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa (Colección de tomate CIIDIR-001).

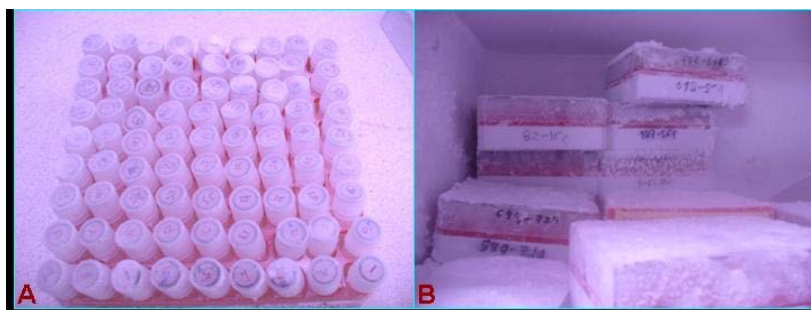


Figura 6. Colección de microorganismos criopreservados. A) Tubos de criopreservación con muestras individuales del banco de germoplasma; B) Banco de germoplasma almacenado en ultracongelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para el banco de toloache (CIIDIR-004) se colocaron los organismos aislados en placas Falcon de 96 pozos con $98\text{ }\mu\text{l}$ del cultivo de los microorganismos, un aislado en cada pozo y $42\text{ }\mu\text{l}$ de glicerol al 50%, para obtener el cultivo en glicerol a una concentración de 15 %. Se mezcló bien, se taparon las placas perfectamente con tapas de aluminio adhesivas con ayuda de un rodillo y se colocaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su criopreservación.

4.5. Prueba de viabilidad del banco de germoplasma

Se descongeló la totalidad de especímenes de los bancos de germoplasma de tomate y toloache y se plaquearon en cajas de LB ó PDA; cada caja contenía ocho especímenes (Figura 6). Se dejaron incubando a temperatura ambiente toda la noche. Se midió la capacidad de crecimiento de los organismos después de haber sido congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelados de nuevo.



Figura 6. Esquema de las placas de LB y el procedimiento de estriado, con ocho muestras de las bacterias descongeladas del banco de germoplasma.

4.6. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate y toloache

4.6.1. Extracción de ADN genómico

Se crecieron cada uno de los microorganismos del banco, en 1.5 ml de medio LB líquido y se pasó el cultivo en tubos de muestra RB de 2 ml, se centrifugaron a máxima velocidad por 3 min para empastillar los microorganismos. Para la identificación molecular se extrajo el ADN genómico de cada uno de los microorganismos del banco utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, EUA, Cat. No. 69506). La extracción se realizó utilizando el equipo QIAcube (Qiagen, EUA, Cat. No. 9001293).

4.6.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Del ADN genómico se amplificó una región conservada del ADN ribosomal entre diversas especies mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para los organismos aislados se amplificó la secuencia parcial de la región 16S del DNA ribosomal utilizando los oligonucleótidos F2C (5'-AGAGTTTGATCATGGCTC-3') y C (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') los cuales amplifican una región de aproximadamente 1600 pb (Figura 7) (Cordero-Ramírez, 2008).

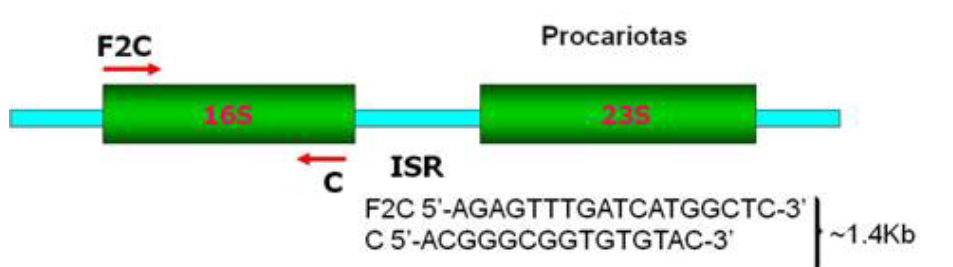


Figura 7. Representación de la secuencia que amplifica los oligonucleótidos F2C/C.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 3) para las PCR tanto para los pares de oligonucleótidos F2C/C como para ITS1/ITS4 en un volumen de 25 µl de reacción.

Cuadro 3. Volúmenes utilizados para la mezcla de reacción de PCR para la identificación de los especímenes del banco de microorganismos.

Reactivo	Volumen por muestra	Concentración final
Agua ultrapura	17.25 µl	
Mg 10X Buffer	2.50 µl	1X
50 µM MgCl ₂	0.75 µl	1.5 µM
10 µM Primer 1	1 µl	0.2 µM
10 µM Primer 2	1 µl	0.2 µM
10 µM dNTP's	1.25 µl	0.2 µM
ADN templado	1 µl	
Taq DNA polymerase	0.25 µl	1 U

Las condiciones del programa de PCR para amplificar el ADNr de los organismos procariontes son las siguientes: desnaturalización 4 min a 95 °C, 1 min a 95 °C; anillamiento 1 min a 60 °C; elongación 2 min a 72 °C, por 32 ciclos; y un paso final de elongación de 5 min a 72 °C. Las condiciones del programa de PCR para amplificar el ADNr de los organismos eucariotes son las siguientes: desnaturalización 4 min a 95 °C, 1 min a 95 °C; anillamiento 1 min a 60 °C; elongación 2 min a 72 °C, por 29 ciclos; y un paso final de elongación de 5 min a 72 °C. Se utilizó un termociclador Multigene (Labnet International, Inc., EUA, Cat. No. LA-TC9600-G-230).

4.6.3. Visualización de los productos de PCR

La visualización de los productos de PCR se hizo corriendo los productos de la amplificación en geles de agarosa, se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb plus, se prepararon los geles de agarosa al 1%, para esto la agarosa se disolvió en buffer TAE 0.5X (40 mM Tris-HCl, ácido acético pH 8.0, 1 mM EDTA) por medio de la aplicación de calor en un horno de microondas. Se usó bromuro de etidio adicionado a la agarosa para poder visualización de las bandas, aplicando luz ultravioleta, se corrieron las muestras en el gel en una cámara de electroforesis y finalmente se

visualizaron las bandas mediante la aplicación de luz ultravioleta en un fotodocumentador (CHEMIDOC Universal Hood II de Biorad, CA, EUA, Cat. No. 765/07032).

4.6.4. Purificación de los productos de PCR, cuantificación y secuenciación del ADN

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, EUA, Cat. No. 28106). El ADN se cuantificó empleando un lector multimodal para placas de 96 pozos (Beckman, Cat. No. DTX-880) por fluorometría siguiendo las recomendaciones del proveedor del Quant-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, EUA, Cat. No. Q32854). Las muestras de ADN amplificado se secaron en un horno a 45°C durante toda la noche y se enviaron a secuenciar de manera unidireccional al Cinvestav, Irapuato, para su secuenciación empleando un equipo ABI Prism 3100.

4.6.5. Análisis de las secuencias

Se compararon las secuencias obtenidas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.gov/>) utilizando el programa BLAST-N y el algoritmo Megablast y una plataforma automatizada desarrollada en nuestro departamento (Bueno *et al.*, 2010; en preparación). Para determinar a cual organismo presentan una mayor homología las secuencias obtenidas, se determinará la identidad del organismo con el que tenga una homología mayor del 90% como criterio de identificación.

4.7. Obtención del banco de clonas de ADN ribosomal que incluye organismos cultivables y no cultivables

4.7.1. Extracción del ADN genómico de suelo

Se mezcló 1 gr de cada una de las 5 muestras compuestas de suelo y de ésta muestra se tomaron dos alícuotas de 0.25 gr de suelo y se mantuvieron a -70°C hasta su utilización, se extrajo el ADN genómico de las dos muestras siguiendo las instrucciones del fabricante del Power Soil®DNA Isolation Kit de Mobio Cat. No. 12888-50 (Carlsbold, CA. USA). Posteriormente el ADN genómico obtenido se eluyó empleando el buffer C6 del kit en un volumen de 100 µl.

4.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa

El ADN obtenido se utilizó para amplificar algunas regiones hipervariables del ADNr mediante la técnica de PCR. Para esto se utilizaron dos pares de oligonucleótidos dirigidos a amplificar una región de ADNr. Para procariotas se utilizaron los oligonucleótidos universales (U1: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' y 1: 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3') los cuales amplifican una región de aproximadamente 1600 pb, para la amplificación de la secuencia parcial de la región 16S del ADNr, la región de secuencia intergénica (ISR) entre la región 16S-23S del ADNr y la secuencia parcial de la región 23S del ADNr. Para los eucariotas se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') que amplifican un fragmento de aproximadamente 600 pb, que incluye las dos regiones ITS del ADNr (Figura 8) (Cordero-Ramírez, 2008).

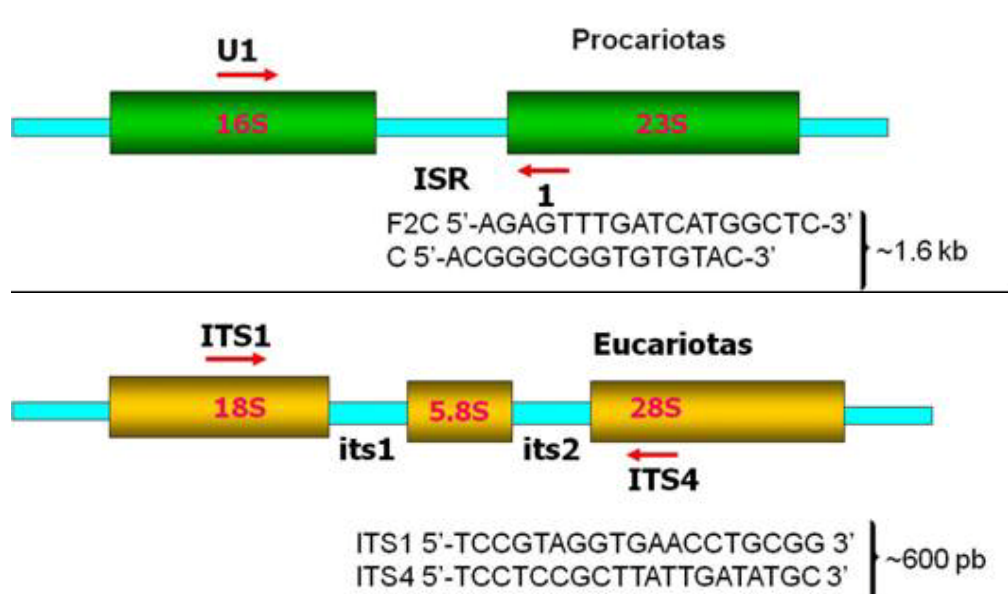


Figura 8. Representación de las secuencias que amplifican los oligonucleótidos U1/1 e ITS1/ITS4 de ADNr de origen procariótico y eucariótico respectivamente.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción para las PCR tanto para los pares de primers U1/1 como para ITS1/ITS4 para un volumen de 25 µl de reacción (Cuadro 4). Las condiciones del programa de PCR para amplificar el ADNr de los organismos procariotas fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización 4 min a 95 °C,

desnaturalización 1 min a 95 °C; anillamiento 1 min a 55 °C; elongación 2 min a 72 °C, por 29 ciclos; y un paso final de elongación de 5 min a 72 °C. Las condiciones del programa de PCR para amplificar el ADN_r de los organismos eucariotas fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización 4 min a 95 °C, desnaturalización 1 min a 95 °C; anillamiento 1 min a 60 °C; elongación 2 min a 72 °C, por 29 ciclos; y un paso final de elongación de 5 min a 72 °C. Para estas amplificaciones, se empleó la Platinum Taq ADN polimerasa, enzima que ha sido modificada para que los posibles errores en el proceso de polimerización del ADN sean mucho menores que las enzimas Taq polimerasas convencionales.

Cuadro 4. Volúmenes utilizados para la mezcla de reacción de PCR para la identificación de las clonas.

Reactivo	Volumen por muestra	Concentración final
Agua ultrapura	15 µl	
Mg 10X Buffer	2.5 µl	1X
10 µM dNTP's	0.5 µl	0.2 µM
50 µM MgCl ₂	0.75 µl	1.5 µM
10 µM Primer 1	0.5 µl	0.2 µM
10 µM Primer 2	0.5 µl	0.2 µM
ADN templado	1 µl	
Platinum® Taq DNA polymerase	0.2 µl	1 U

4.7.3. Electroforesis del producto de PCR

Para verificar que los fragmentos de los productos de PCR fueran del tamaño esperado, los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1%, en una cámara de electroforesis usando un marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen). Los geles de agarosa se prepararon disolviendo la agarosa en buffer TAE al 0.5X (40 mM Tris-HCl, ácido acético pH 8.0, 1 mM EDTA) y se tiñeron las bandas usando bromuro de etidio. Los geles de agarosa se visualizaron aplicando luz ultravioleta en un fotodocumentador (Chemidoc Universal Hood II de Biorad, Cat. No. 765/07032, CA, EUA).

4.7.4. Precipitación del producto de PCR

El producto de PCR se precipitó para concentrar el ADN amplificado, se le adicionó 1 μ l de acetato de amonio y 60 μ l de etanol absoluto, se almacenó a una temperatura de -20°C por 2 horas y se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, posteriormente se lavó la pastilla con etanol al 75% disuelto en agua ultrapura estéril y se centrifugó brevemente para eliminar todo el líquido; se dejó secar la pastilla durante 10 min a temperatura ambiente y por último se resuspendió la pastilla en 4 μ l de agua ultrapura.

4.7.5. Clonación de los productos de PCR

Los productos obtenidos del PCR se clonaron en el vector pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Cat. No. 157348, EUA) (Figura 9), se llevó a cabo para esto la siguiente reacción de ligación: se colocó en un tubo Eppendorf 5 μ l de buffer de ligación 2X, 1 μ l de vector pGEM®-T Easy (50 ng), 3 μ l del producto de PCR (100 ng) y 1 μ l T4 ADN ligasa, teniendo un volumen final de 10 μ l de ligación, la reacción de ligación se incubó 1 hora a temperatura ambiente y a 4°C toda la noche.

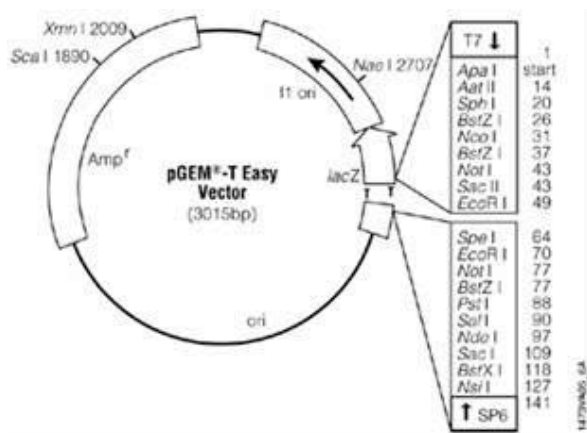


Figura 9. Esquema del vector de clonación pGEM®-T Easy vector utilizado para la ligación de los productos de PCR.

4.7.6. Transformación de los productos de PCR

La ligación de los productos de PCR se transformaron en células competentes de *E. coli* JM-109. Para esto se mezclaron en un tubo Eppendorf 50 μ l de células competentes de

E. coli y 2.5 μ l del producto de la ligación y se incubó la mezcla por 20 min en hielo. Posteriormente, se calentó la mezcla a 42°C por 45 segundos en una placa de calentamiento para provocar un choque térmico y permitir la entrada del plásmido ligado al interior de las células de *E. coli*; se pasó inmediatamente la mezcla al hielo y se incubó dentro de éste por 2 min. Después se agregó al tubo con la mezcla de la transformación 950 μ l de medio SOC precalentado a 37°C y se incubó a 37°C por una hora y media con agitación a 150 rpm. Posteriormente se plaquearon 200 μ l de la suspensión celular en placas con medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) para seleccionar las clonas transformadas. Para esto a cada placa de LB se le agregó 20 μ l de X- Gal (20 mg/ml) e IPTG (0.1 M). Estos reactivos se utilizan como método de selección de las clonas transformadas que contienen el inserto de nuestro ADN de interés mediante el escrutinio azul-blanco del gen lacZ insertado en el plásmido pGEM-T Easy. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche (16 horas). Una vez obtenidas las colonias se seleccionaron las colonias blancas ya que éstas son las que contienen el vector con el inserto, el cual interrumpe la región codificante del gen LacZ evitando que éste gen, el cual es activado por el IPTG produzca una proteína funcional evitando la reacción colorida azul con el X-Gal. Se seleccionaron 500 clonas de origen procariótico y 500 clonas de origen eucariótico.

4.7.7. Purificación del ADN plasmídico

Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37°C y 150 rpm por 16 horas. Después de que se obtuvo el cultivo celular se centrifugó a 13000 rpm por 3 min, se retiró el sobrenadante y se almacenaron las pastillas a -20°C para posteriormente llevar a cabo la purificación del ADN plasmídico. El ADN plasmídico de *E. coli* (pGEM-T Easy + inserto) se extrajo empleando el kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, EUA, Cat. No. 27106).

4.7.8. Digestión del ADN plasmídico

Se digirió el ADN plasmídico con la enzima EcoRI la cual permite la liberación del inserto al encontrarse flanqueando la región donde se ha introducido el fragmento de PCR, ver mapa del vector, Figura 14). Esto permitió confirmar la presencia del inserto del producto de PCR dentro de las clonas. Se realizó la siguiente reacción de digestión: Se colocó en un tubo 7.5 μ l de agua ultrapura, 1 μ l de buffer 10X REact 3, 0.5 μ l de la enzima EcoRI y 1 μ l de producto de miniprep, teniendo un volumen final de 10 μ l, la

reacción de digestión se incubó por 2 hora a 37°C y se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, las bandas se tiñeron con bromuro de etidio y se empleó un marcador de peso molecular de 1Kb. La visualización del DNA se realizará mediante la exposición del gel a luz ultravioleta.

4.7.9. Secuenciación y análisis de las secuencias

Los fragmentos amplificados y clonados se enviaron a secuenciar a LANGEBIO (Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad), en Cinvestav, Irapuato. Se emplearon para la secuenciación el método de secuenciación de dideoxi-fluorescencia con un equipo secuenciador de la marca ABI Prism Modelo 3100. Se usó el oligonucleótido interno U2 (5'-ACATTTTACAACACGAGCTG-3'), se usó este oligonucleótido ya que amplifica una región interna del la región 16S del ADN ribosomal, lo que permite que la secuenciación sea en una sola dirección y puedan ser alineadas en los posteriores análisis. Las secuencias obtenidas se analizaron en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando el programa BLAST-N, y el algoritmo Megablast y una plataforma automatizada desarrollada en nuestro departamento (Bueno *et al.*, 2010; en preparación). Para determinar a cual organismo presentan una mayor homología las secuencias obtenidas, se determinó la identidad del organismo empleando como criterio aquel que tenga una homología mayor del 90 %.

Se eliminaron las secuencias de mala calidad y las que contenían un número menor de 200 nucleótidos, así como las secuencias que no dieron homología a ningún organismo reportado la base de datos del GenBank y las secuencias que correspondían a vectores. Se usó además el programa Chimera slayer del BROAD Institute, para la detección y eliminación de secuencias quimeras que pudieron haberse formado durante la reacción de PCR. Y se realizó un análisis de rarefacción para una muestra en el software Mothur versión 1.20.1 disponible en <http://www.mothur.org> (Schloss *et al.*, 2009), para esto se alinearon las secuencias con el programa Clustal-W (Higgins *et al.*, 1994). La matriz de distancia fue calculada con el programa Dnadist de Phylip versión 3.69 (Felsenstein, 2004) usando el modelo de sustitución Juker-Cantor. Las secuencias se agruparon en OTUs con el programa Cluster, usando el algoritmo average neighbor (NJ).

4.7.10. Análisis de los datos obtenidos y comparación de la microbiota de la rizósfera de *Datura stramonium* L. y de la rizósfera de tomate.

Se analizó la presencia, diversidad y abundancia de los microorganismos presentes en la rizósfera de *Datura stramonium* L. en la zona de preservación ecológica de centro de población “La Uva”. Una vez obtenidos estos datos se hizo una comparación de los datos obtenidos en este trabajo con los datos obtenidos por Cordero-Ramírez en el 2012, sobre la presencia, diversidad y abundancia de los microorganismos de la rizósfera de tomate de un área dedicada a prácticas agrícolas.

Se hizo un análisis de la abundancia a nivel de phyla de los organismos identificados mediante estadística cualitativa usando gráficas de pastel. Se analizó la frecuencia de las clonas de la biblioteca de clona a nivel de género utilizando gráficas de barras y se determinó el índice de diversidad alfa de los organismos identificados mediante el índice de Shannon-Wiener:

$$H' = \sum (ni/N) \ln(ni/N)$$

Donde:

ni = valor de importancia para cada especie.

N = número de especies.

4.8. Incorporación de la información obtenida en una base de datos

Los datos obtenidos en este trabajo fueron incorporados en una base de datos denominada “Colección Científica de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Molecular de la Rizósfera del CIIDIR-Sinaloa” de manera local. Se incorporaron primero todos los datos de los especímenes aislados y los de los bancos de clonas de tomate y posteriormente los de toloache en los catálogos con los que cuenta la base de datos los cuales incluyen: nombre de la colección; institución a la que pertenece la colección; información geográfica, región donde se colectaron las muestras; personas colectoras y determinadoras, tipo de vegetación, tipo de rizósfera e información taxonómica. La mayoría de los organismos vivos fueron fotodocumentados en cuanto a su morfología colonial y microscópica (tinción de Gram). Estos datos se ligarán con la información de los catálogos y se incluirán las secuencias de cada uno de los especímenes identificados obtenidos, así como las gráficas y demás información obtenida del análisis de los datos. Toda la información que se ha incorporado a la base de datos se enviará a la CONABIO para que ésta sea incorporada a su sistema de bases de datos y se haga disponible de manera pública.

5. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

5.1. Zona de preservación ecológica del centro de población “La Uva”

La zona de preservación ecológica de centro de población “la Uva”, decretada en el año de 1998, es una zona relictual de vegetación natural, se localiza en el municipio de Guasave, en la Cofradía de Tamazula de la sindicatura de Tamazula a 26 Km al suroeste de la ciudad de Guasave, Sinaloa. Esta zona comprende una superficie de 17.88 hectáreas, ubicadas a orillas de la margen izquierda del Río Sinaloa, con las coordenadas 25°29'42" de latitud norte y 108°27'12" de longitud Oeste (Figura 10). Los asentamientos circundantes tienen una población aproximada de 1,700 habitantes (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

El clima de esta región es seco y estepario, muy cálido con una temperatura media anual de 24.3°C, extremoso con oscilación de temperatura entre los 7 y 44°C presentando un régimen de lluvias de verano con un 50% de precipitación invernal y una precipitación total anual de 403 mm (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).



Figura 10. Fotografía satelital de La zona de preservación ecológica de centro de población “La Uva”, en el municipio de Guasave.

El suelo es aluvial, compuesto por arena principalmente, permeable con materiales no consolidados, el manto se localiza a 3 metros de profundidad. En esta zona se presentan dos tipos de suelo: el fluvisol eutrico y el feozem háplico (Figura 11) (según la

clasificación de la FAO-UNESCO adaptado por la comisión de estudios del Territorio Nacional a los suelos de México). El fluvisol eutríco se localiza a ambos márgenes del Río Sinaloa, se caracteriza por estar formado por material acarreado por el agua, está constituido por materiales disgregados que no presentan estructuras de terrones, es decir son suelos muy poco desarrollados, presenta alta permeabilidad ya que en su mayor parte se constituye de arena y capas de grava no existiendo en el área materiales consolidados que obstruyan dicha permeabilidad, presentan alta fertilidad. Mientras que los Feozem háplico, son suelos que se distribuyen en la mayor parte del municipio de Guasave, en esta área se presentan como suelos pardos de textura media, rica en materia orgánica y nutrientes (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

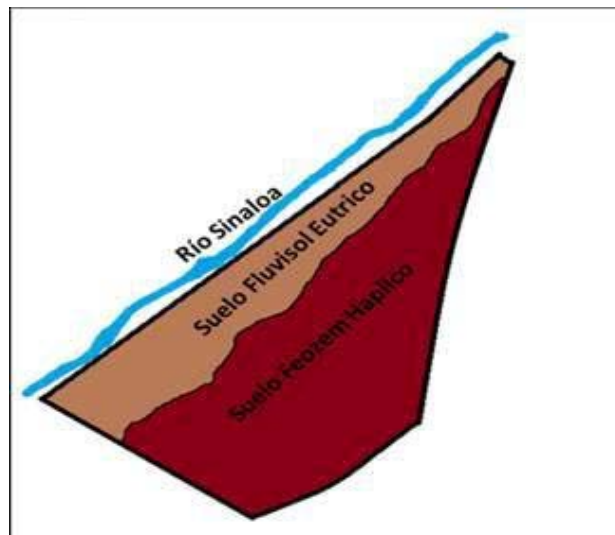


Figura 11. Representación de las características edafológicas de La zona de preservación ecológica “La Uva”.

En el sitio se desarrolla una vegetación riparia junto al río y una vegetación natural secundaria con representantes de la selva baja caducifolia. La vegetación riparia o de galería se desarrolla paralela al Río Sinaloa con álamos de denso follaje y de 30 m de alto ocupando una superficie aproximada de 20% con respecto al área (Figura 12A). En el área adyacente se localizan los representantes de la selva baja caducifolia (Figura 12B) con un amplio desarrollo de especies arbustivas propias de una vegetación secundaria como: el papache, la cacachila y el bainoro, que son las especies dominantes y se distribuyen ampliamente (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).



Figura 12. Vegetación natural de “La Uva”, vegetación riparia (A), vegetación de selva baja caducifolia (B).

La selva baja caducifolia es una comunidad vegetal con árboles cuya altura está comprendida entre los 4 y 15 metros, que se caracteriza porque más del 75% de sus árboles dominantes pierde totalmente el follaje durante la época seca del año. Se desarrolla en climas cálidos y subhúmedos, semisecos ó subsecos (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

La zona de La Uva, presenta características de un área relictual de vegetación natural, ya que en sus alrededores la vegetación original ha sido sustituida por terrenos agrícolas, el área sirve de refugio y hábitat de diversas especies de fauna silvestre (H. Ayuntamiento de Guasave, 1998).

6. RESULTADOS

6.1. RIZÓSFERA DE TOMATE

6.1.1. Análisis fisicoquímico de los suelos recolectados en agrícola del Rancho (rizósfera de tomate).

De acuerdo al triángulo de textura aprobado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) se indica que el suelo tiene una textura franco-limo-arcillosa. Éste suelo es moderadamente ácido, es bajo en materia orgánica, con una concentración de Ca^{2+} y Mg^{2+} media, y una concentración elevada de K^+ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos extraídos de la Agrícola del Rancho, en el Campo Díaz.

Tipo de análisis	1	2	3	4	5	Promedio	D E	Referencia
pH	6.8	5.9	5.7	5.3	5.7	5.88		5.1-6.5 (mod. ácido), 6.6-7.3 (neutro)
CE (mS/cm)	0.19	2.38	1.97	0.17	2.36	1.414	1	<0.2 (no-salino), >4 salino
% materia orgánica	1.52	1.39	1.39	1.27	1.27	1.368	0.1	0.6-1.5 (bajo), 1.5-3.5 (medio)
P (mg/kg)	43.67	43.58	64.63	64.61	64.75	56.248	10	>11 (alto)
Textura								
% de arena	15.62	17.62	.7	17.62	17.62	17.436	1	
% de arcilla	38.34	36.34	38.34	38.03	36.71	37.552	0.9	
% de limo	46.04	46.04	42.96	44.04	45.67	44.95	1.2	
K (Cmol/kg)	3.06	2.92	3.06	3.65	3.21	3.18	0.3	>2.8 (muy alto)
Ca (Cmol/kg)	8.85	9.94	3.39	12.22	8.42	8.564	2.9	2-5 (bajo), 5-10 (mediano), >10 (alto)
Mg (Cmol/kg)	3.48	1.54	1.99	0.85	1.34	1.84	0.9	0.5-1.3 (bajo), 1.3-3 (mediano), >3.0 alto)
N total (mg/kg)	4.99	4.99	9.99	19.99	9.99	9.99	5.5	0-10 (muy bajo), 10-20 (bajo)

6.1.2. Obtención de las bibliotecas de cDNA de origen procariótico y eucariótico de la rizósfera de tomate

Empleando ADN genómico aislado a partir de suelo proveniente de rizósfera de tomate se logró la amplificación de productos de PCR empleando cuatro pares de oligonucleotidos (F2C/1; U1/1; ITS1/ITS2 y LSU0061/0805). La pareja de oligonucleotidos NS1/NS8 fue la única sin la amplificación esperada (Figura 13). Se decidió emplear los productos de PCR obtenidos de las parejas de oligonucleotidos U1/1 e ITS1/ITS4, los cuales fueron precipitados y clonados en el vector pGEM-T Easy, para generar las bibliotecas de clonas de productos de PCR, de origen procariótico

y eucariótico. De estas bibliotecas se recogieron 500 clonas, a las cuales se les extrajo el ADN plasmídico y se secuenciaron.

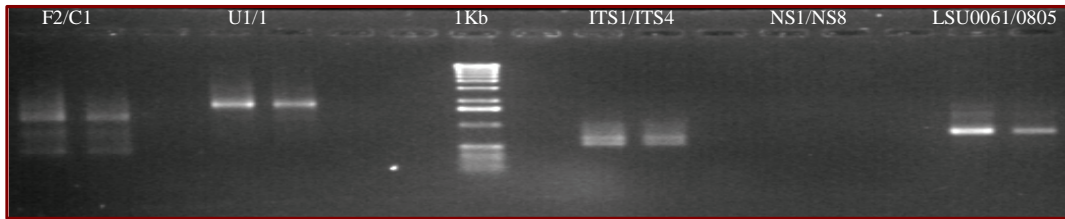


Figura 13. Amplificación del ADN ribosomal a partir de ADN genómico de suelo con las distintas parejas de oligonucleótidos utilizadas.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de las clonas pertenecientes a ambas bibliotecas nos permitió la identificación de los phyla eucariotes y procariotes más representativos del suelo muestreado.

6.1.3. Biblioteca de clonas de 16 S RDNA de origen procariótico de tomate

De un total de 476 clonas enviadas a secuenciar: 31 clonas no contenían inserto, por lo que se consideraron como clonas vacías (93.5% de eficiencia de clonación).

Del análisis de las secuencias de las 445 clonas que contenían inserto, se encontró que 63 no mostraron homología con los organismos registrados en el Genbank; 11 pertenecían a organismos eucariotes: *Kluyveromyces lactis* 1, *Trichoderma atroviridae* 2, fotobionte no cultivado del género *Trebouxia* 4, diatomea no cultivada 2, *Beta nana* 1 y *Zostera marina* 1. 103 tuvieron homología a organismos no cultivables (datos no mostrados) y 268 clonas tuvieron homología a secuencias de organismos previamente publicadas. Sólo estos últimos fueron considerados en el análisis de la diversidad de procariotes en la rizósfera de tomate.

Del total de los organismos identificados (268 clonas) se encontró que éstas pertenecen a un total de ocho diferentes phyla: acidobacteria, actinobacteria, bacteroidetes, chloroflexi, cianobacteria, firmicutes, gemmatimonadetes y proteobacteria. Dentro de estos phyla se encontraron nueve diferentes clases, dos subclases, 16 órdenes, cuatro sub-órdenes, 20 familias, 30 géneros y un total de 56 especies. Éstos resultados se reportan en el Cuadro 6.

Phylum	Clase	Subclase	Orden	Suborden	Familia	Género	Especie
Acidobacteria							<i>Uncultured Acidobacteria bacterium</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora echinospora</i>
				Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium gordonae</i> <i>Mycobacterium interjectum</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
		Rubrobacteridae	Rubrobacterales	Rubrobacterineae	Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>	<i>Patulibacter minatonensis</i>
					Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>	<i>Solirubrobacter sp.</i>
Bacteroidetes	Flavobacteria		Flavobacteriales		Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium sp.</i>
Chloroflexi	Chloroflexi						<i>Uncultured Chloroflexi sp.</i>
Cyanobacteria						<i>Cyanobacterium</i>	<i>Uncultured Cyanobacterium sp.</i>
			Oscillatoriales			<i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya sp.</i>
			Nostocales		Nostocaceae	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc sp.</i>
			Oscillatoriales			<i>Oscillatoria</i>	<i>Oscillatoria sp.</i>
Firmicutes	Bacilli		Bacillales		Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Uncultured Bacillus sp.</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus azotoformans</i> <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
						<i>Halobacillus</i>	<i>Halobacillus kuroshimensis</i>
						<i>Lentibacillus</i>	<i>Lentibacillus salinarum</i>
					Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus sp.</i>
						<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus sp.</i> <i>Paenibacillus alginolyticus</i> <i>Paenibacillus chondroitinus</i>

Cuadro 6. Ubicación taxonómica de las especies de organismos procariotes identificadas en la biblioteca de clonas de ADN ribosomal de origen procariótico de rizósfera de tomate

					<i>Paenibacillus larvae</i>
					<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
					<i>Paenibacillus polymyxa</i>
					<i>Paenibacillus popilliae</i>
				<i>Virgibacillus</i>	<i>Virgibacillus marismortui</i>
					<i>Virgibacillus sp.</i>
		Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium sp.</i>
			Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus avium</i>
	Mollicutes	Acholeplasmatales	Acholeplasmataceae	<i>Candidatus Phytoplasma</i>	<i>Sugarcane grassy shoot phytoplasma</i>
	Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	<i>Uncultured Eubacterium sp.</i>
Gemmatimonadetes					<i>Uncultured Gemmatimonadetes</i>
Proteobacteria					<i>Uncultured proteobacterium</i>
	Alphaproteobacteria				<i>Uncultured alpha proteobacterium</i>
		Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium vitis</i>
			Brucellaceae	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Ochrobactrum cytisi</i>
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	<i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingosinicella</i>	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i>
				<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas sp.</i>
	Deltaproteobacteria				<i>Uncultured delta proteobacterium</i>
		Myxococcales			<i>Uncultured Myxococcales</i>
			Cystobacterineae	Myxococcaceae	<i>Anaeromyxobacter</i>
				Cystobacteraceae	<i>Archangium</i>
					<i>Hyalangium</i>
					<i>Stigmatella</i>
	Gammaproteobacteria				<i>Stigmatella aurantiaca</i>
					<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>
		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		Vibrionales	Vibrionaceae	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio splendidus</i>

Continuación del cuadro 6. Ubicación taxonómica de las especies de organismos procariotes identificadas en la biblioteca de clonas de ADN ribosomal de origen.

6.1.3.1. Abundancia absoluta de los phyla en la biblioteca de clonas de 16S rDNA de origen procariótico de la rizósfera de tomate

El orden de abundancia relativa de los phyla encontrados de esta biblioteca fue el siguiente: Firmicutes 117 clonas, Acidobacteria 46 clonas, Proteobacteria 31 clonas, Actinobacteria 24 clonas, Gemmatimonadetes 23 clonas, Bacteroidetes 16 clonas, Cyanobacteria 9 clonas y Chloroflexi 2 clonas (Figura 14).

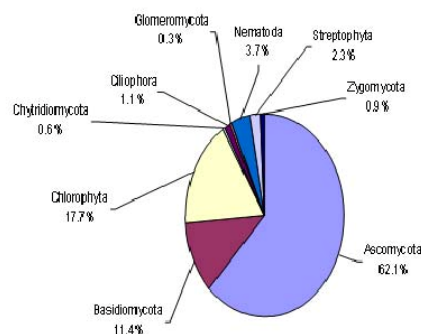


Figura 14. Abundancia absoluta de los phyla de origen procariótico en rizósfera de tomate. Gráfica de pastel mostrando el porcentaje de las clonas de los phyla identificados.

6.1.3.2. Abundancia de las especies encontradas en la biblioteca de origen procarótico

La abundancia relativa de las especies de esta biblioteca, se realizó a partir de las 268 muestras que si mostraron homología en el GenBank. Esto permitió la identificación de las especies más abundantes a nivel rizósfera, encontrando que las cinco especies más abundantes fueron: una acidobacteria no cultivable con 42 clonas, *Paenibacillus* sp. con 33 clonas, Gemmatimonadales no cultivables con 23 clonas, Bacteroidetes no cultivables con 15 clonas y delta proteobacterias no cultivables con 10 clonas. El resto de las especies se muestran en el Anexo 1.

6.1.3.3. Análisis filogenético de las secuencias de origen procariótico

El análisis filogenético de algunas secuencias seleccionadas entre aquellas que mostraron homología en el Genbank, fue realizado elaborando dos árboles filogenéticos considerando secciones de DNA de 100 pb. La razón de esto es que la secuenciación del total de 1000 clonas de ambas bibliotecas por razones de costo fue realizado unidireccionalmente. Cuando el producto de la amplificación del ADN ribosomal es ligado dentro del vector la posibilidad de ligarse en cualquier dirección es de aproximadamente el 50%. Debido a esto se realizó un árbol para cada grupo de secuencias que fueron obtenidas a partir de la región 16S, y otro para las secuencias que se ubicaron en la región 23S del ADN ribosomal. En un principio se pensó realizar un único árbol incluyendo la región ISR donde las secuencias se sobrelapanan. Sin embargo, esto no fue posible debido a la elevada divergencia en longitud y secuencia de esta región, por lo que se decidió sólo usar las regiones 16S y 23S que están altamente conservadas entre diferentes especies. En la comparación se excluyó la región ISR ya que considerarlo ocasiona el desalineamiento de las secuencias y una aplicación inadecuada del programa computacional utilizado (Figura 15).

Ambos árboles filogenéticos muestran el agrupamiento de diferentes especies y géneros pertenecientes al phylum Firmicutes agrupándose en un subgrupo relacionado. En ambos árboles se incluyeron algunas especies lejanamente relacionadas (outgroups) a los grupos procarióticos observados en este trabajo, tales como *Nostoc* y *Oscillatoria*. En ambos casos, estas especies lejanas segregan filogenéticamente en una rama del árbol muy aparte a grupos como Firmicutes lo cual es esperado que suceda. La formación de subgrupos dentro de los árboles nos permite observar *a grosso modo* la cercanía filogenética entre los diversos organismos que se evaluaron. Por ejemplo, el phylum Acidobacteria tanto en el árbol de la figura 15a como en el de la figura 15b se separa claramente de los miembros del grupo Firmicutes. Este análisis nos muestra la diversidad poblacional que encontramos en la rizósfera de tomate de una manera que permite observar algunas agrupaciones de organismos procariotes dentro de este ecosistema.

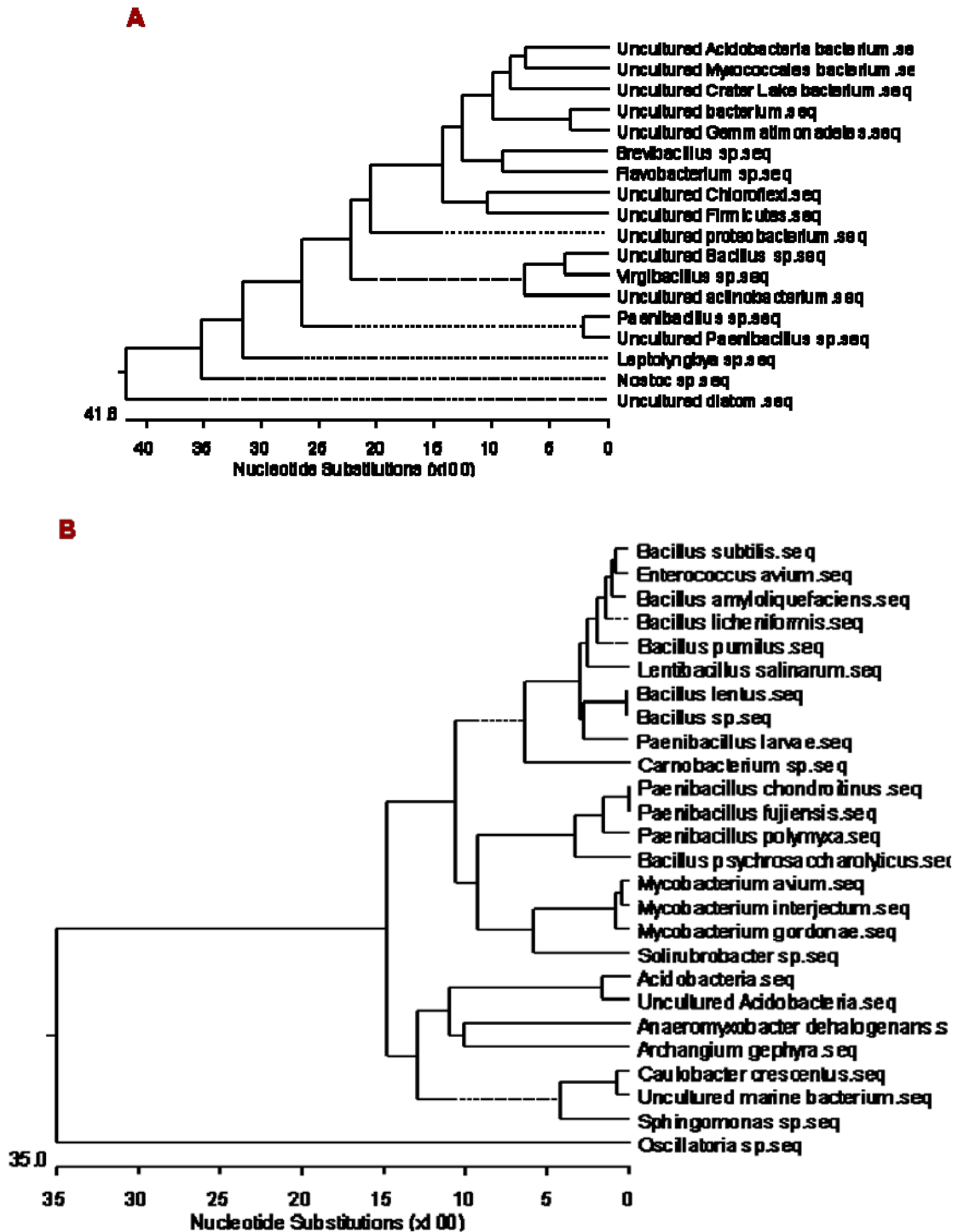


Figura 15. Árboles filogenéticos construidos a partir de una región parcial del 16S y 23S del DNAr. A) Secuencias de la region 16S; B) Secuencias de la region 23S. Las secuencias fueron alineadas en el programa CLUSTAL X y analizadas con el algoritmo Neighbor-Joining; posteriormente, los árboles se construyeron empleando el programa Treeview.

6.1.4. Biblioteca de origen eucariótico de la rizósfera de tomate

De un total de 441 clonas que se enviaron a secuenciar de esta biblioteca 36 fueron clonas vacías (91.8% de eficiencia de clonación), y cuatro más pertenecían a secuencias que al momento de comparar en el NCBI no nos dieron homología con ninguna de las secuencias que se encontraban en el Genbank. De esta biblioteca, 401 clonas contenían inserto con homología en el NCBI y de éstas se identificaron en total nueve phyla, cinco sub-phylum, 14 clases, 10 subclases, 25 órdenes, 28 familias, 51 géneros y 83 especies. Estos resultados se reportan en el Cuadro 7.

6.1.4.1. Abundancia de los phyla encontrados en la biblioteca de origen eucariótico

El orden de abundancia absoluta de los phyla encontrados en esta biblioteca fue: Ascomycota con 218 clonas, Chlorophyta con 62 clonas, Basidiomycota con 40 clonas, Nematoda con 13 clonas, Streptophyta con ocho clonas, Ciliophora con cuatro clonas, Zygomycota con tres clonas, Chytridiomycota con dos clonas y Glomeromycota con una clona (Figura 16).

6.1.4.2. Abundancia de las especies encontradas en la biblioteca de origen eucariótico

La abundancia relativa de las especies de esta biblioteca se realizó a partir de las 352 muestras que sí mostraron homología con secuencias reportadas en el Genbak. Las cinco especies más abundantes a nivel rizósfera fueron las siguientes: *Scenedesmus* sp. con 52 clonas, *Emmonsia parva* con 33 clonas, *Alternaria* sp. con 28 clonas, *Alternaria alternata* con 22 clonas y *Cladosporium oxysporum* con 21 clonas. El número de clonas del resto de las especies se muestra en el anexo 2.

Phylum	Subphylum	Clase	Subclase	Orden	Familia	Género	Especie
Ascomycota							Ascomycete sp.
							Berkleasium sp.
							Uncultured ascomycete
						Aporospora	Aporospora terricola
						Humicola	Humicola fuscoatra
						Phoma	Phoma medicaginis
	Pezizomycotina						Uncultured Pezizomycotina
		Dothideomycetes	Dothideomycetidae	Capnodiales	Davidiellaceae	Cladosporium	Cladosporium cladosporioides
							Cladosporium oxysporum
							Uncultured Cladosporium
			Pleosporomycetidae	Pleosporales	Pleosporaceae	Alternaria	Alternaria sp.
							Alternaria alternata
							Alternaria arborescens
							Alternaria gaisen
							Alternaria longipes
							Alternaria longissima
							Alternaria mali
							Alternaria tenuissima
						Cochliobolus	Cochliobolus lunatus
					Leptosphaeriaceae		Uncultured Lophiostomataceae
						Leptosphaeria	Leptosphaeria senegalensis
		Eurotiomycetes	Eurotiomycetidae	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	Aspergillus tamarisii
						Emericella	Emericella corrugata
							Emericella dentata
							Emericella nidulans
						Eurotium	Eurotium chevalieri
				Onygenales		Chrysosporium	Chrysosporium lobatum

Cuadro 7. Ubicación taxonómica de las especies de organismos eucariotes identificadas en la biblioteca de clonas de ADN ribosomal de origen eucariótico de rizósfera de tomate.

Continuación del Cuadro 7. Ubicación taxonómica de las especies de organismos eucariotes identificadas en la biblioteca de clonas de ADN ribosomal de origen eucariótico de rizósfera de tomate.

						Emmonsia	Chrysosporium pilosum Emmonsia crescens Emmonsia parva
						Paracoccidioides	Paracoccidioides brasiliensis
	Pezizomycetes		Pezizales		Pyronemataceae	Cheilymenia	Cheilymenia stercorea
	Sordariomycetes	Hypocreomycetidae	Hypocreales			Acremonium	Acremonium strictum
						Fusarium	Fusarium sp. Fusarium oxysporum
						Cephalosporium	Cephalosporium curtipes
					Nectriaceae	Nectria	Nectria mauritiicola
					Clavicipitaceae	Paecilomyces	Paecilomyces sp.
		Sordariomycetidae	Sordariales		Chaetomiaceae	Chaetomium	Chaetomium sp. Chaetomium globosum
						Corynascus	Corynascus verrucosus
Basidiomycota							Mycorrhizal basidiomycete Uncultured basidiomycete
	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricomycetidae	Agaricales	Bolbitiaceae	Conocybe	Conocybe crispa Conocybe rickenii
						Panaeolus	Panaeolus cambodginiensis Panaeolus sphinctrinus
					Cortinariaceae	Cortinarius	Cortinarius fulvocitrinus Cortinarius olearioides
						Gymnopilus	Gymnopilus junonius
					Pleurotaceae	Hohenbuehelia	Hohenbuehelia portegna Hohenbuehelia tremula
					Psathyrellaceae	Coprinopsis	Coprinopsis cinerea
					Tricholomataceae	Gymnopus	Gymnopus sp.
		Tremellomycetes		Filobasidiales		Cryptococcus	Cryptococcus magnus

Continuación del Cuadro 7. Ubicación taxonómica de las especies de organismos eucariotes identificadas en la biblioteca de clonas de ADN ribosomal de origen eucariótico de rizósfera de tomate.

Pucciniomycotina		Microbotryomycetes		Leucosporidiales		Leucosporidium	
				Sporidiobolales		Rhodotorula	
							Leucosporidium scottii
							Rhodotorula sp.
							Rhodotorula glutinis
							Rhodotorula ingeniosa
Chlorophyta		Chlorophyceae		Chlamydomonadales	Dunaliellaceae	Dunaliella	Dunaliella sp.
				Oedogoniales		Oedogonium	Oedogonium tenerum
				Sphaeropleales	Scenedesmaceae	Scenedesmus	Scenedesmus sp.
							Scenedesmus naegelii
							Scenedesmus obliquus
		Trebouxiophyceae		Chlorellales	Chlorellaceae	Pseudochlorella	Pseudochlorella pyrenoidosa
Chytridiomycota		Chytridiomycetes		Spizellomycetales	Olpidiaceae	Olpidium	Olpidium brassicae
					Spizellomycetaceae	Rhizophlyctis	Rhizophlyctis rosea
Ciliophora	Intramacronucleata	Oligohymenophorea		Peniculida	Parameciidae	Paramecium	Paramecium tetraurelia
		Spirotrichea	Stichotrichia	Stichotrichida	Oxytrichidae	Cyrtohymena	Cyrtohymena citrina
			Oligotrichia			Oxytricha	Oxytricha longigranulosa
					Halteriidae	Halteria	Halteria grandinella
Glomeromycota		Glomeromycetes		Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Uncultured Glomus
Nematoda		Chromadorea		Rhabditida	Cephalobidae	Acrobeloides	Acrobeloides sp.
						Stegelleta	Stegelleta sp.
						Zeldia	Zeldia sp.
							Zeldia punctata
Streptophyta				Caryophyllales	Amaranthaceae	Atriplex	Atriplex centralasiatica
							Atriplex lentiformis
				Sapindales	Meliaceae	Entandrophragma	Entandrophragma cylindricum
		Liliopsida	commelinids	Poales	Poaceae	Echinochloa	Echinochloa colona
Zygomycota	Mucoromycotina			Mucorales	Mucoraceae	Absidia	Absidia corymbifera
						Rhizopus	Rhizopus oryzae
				Mortierellales	Mortierellaceae	Mortierella	Mortierella sp.

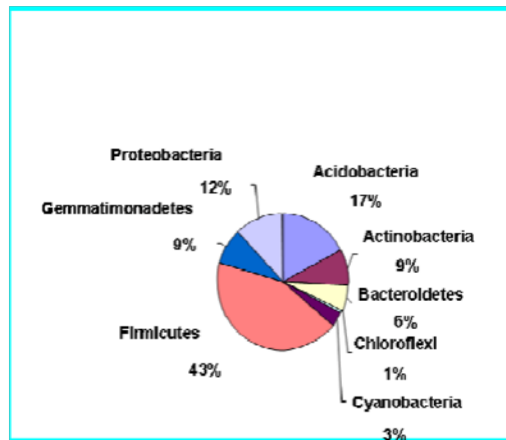


Figura 16. Abundancia absoluta de los phyla de origen eucariótico en rizósfera de tomate. Gráfica de pastel mostrando el porcentaje de las clonas de los phyla identificados.

6.1.4.3. Análisis filogenético de las secuencias de origen eucariótico de la rizósfera de tomate

El análisis filogenético de las secuencias se realizó construyendo un árbol filogenético a partir de la región codificante 5.8S del ADN ribosomal incluyendo 121 pb y empleando algunas de las secuencias seleccionadas de los aislados que mostraron homología con otros organismos en el Genbank (Figura 17). En la construcción del árbol se incluyeron algunas secuencias muy lejanas a los grupos estudiados, tales como *Oxytricha* y *Paramecium* que pertenecen a phyla diferentes a los grupos de secuencias de hongos y levaduras mayoritariamente obtenidos en este trabajo los cuales segregaron de manera adecuada en el árbol. Dos grupos altamente representados por diversas especies ó aislados, resultado de éste análisis fueron *Alternaria* y *Cladosporium*.

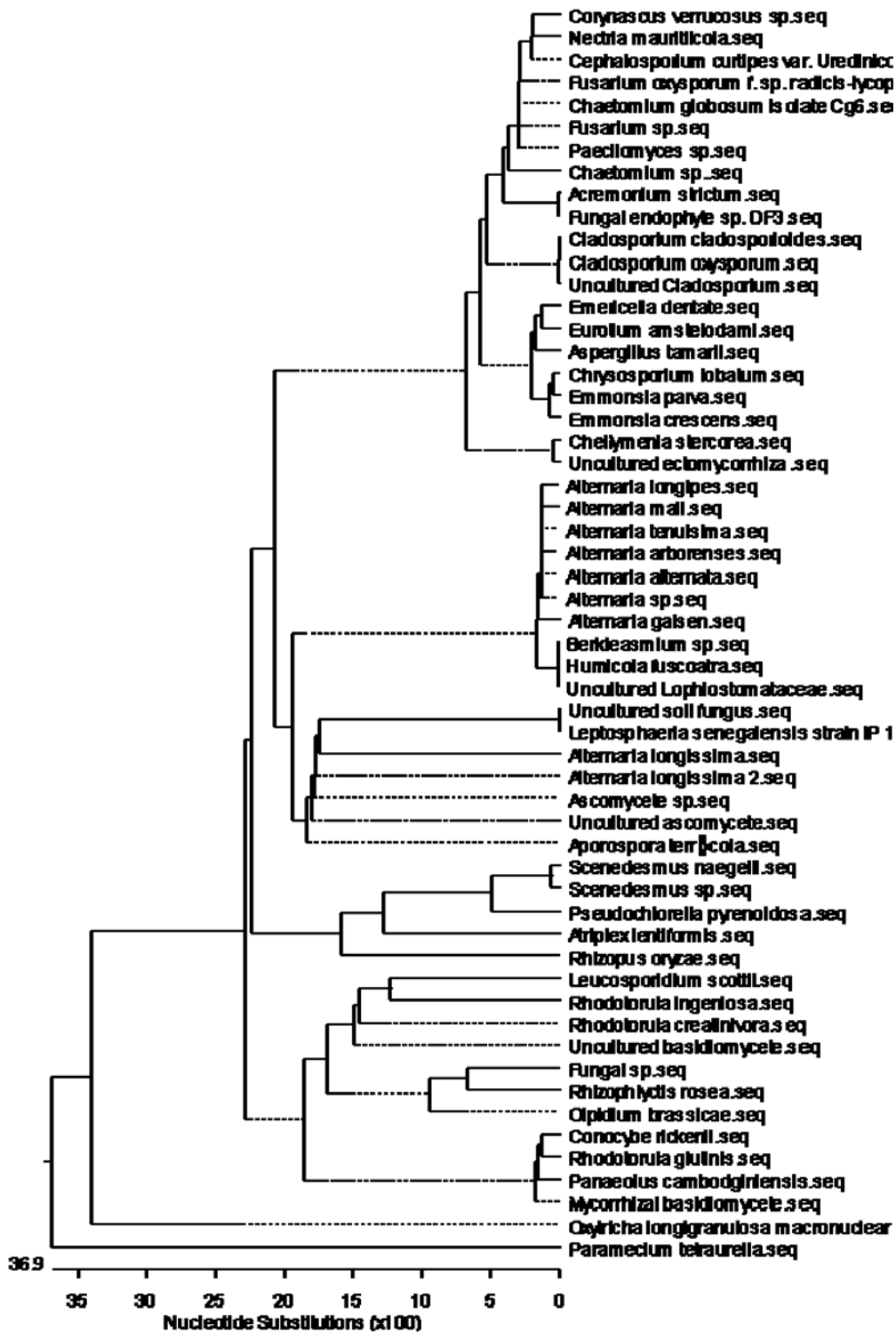


Figura 17. Árbol filogenético construido a partir de la región 5.8S del DNAr, las secuencias fueron alineadas en el programa de CLUSTAL X y analizadas con el algoritmo Neighbor-Joining, posteriormente los árboles se construyeron con el programa Treeview.

6.1.5. Creación del banco de germoplasma vivo de rizósfera de tomate

La metodología empleada para el aislamiento de los microorganismos permitió obtener 758 microorganismos criopreservados y mantenidos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, los cuales conforman el banco de germoplasma denominado como Colección Científica CIIDIR-Sinaloa No. 001. Para realizar las pruebas de viabilidad y los bioensayos *in vitro* se descongelaron 254 muestras, las cuales representan el 33.05% del total del banco de germoplasma. Del total de las muestras utilizadas, 231 muestras resultaron viables, representando el 90.94% y tan sólo 23 muestras fueron no viables (9.05%).

6.1.5.1 Banco de tomate

Se amplificó el ADN ribosomal de cada uno de los aislados del banco con los oligonucleótidos F2C y C (Figura 18).

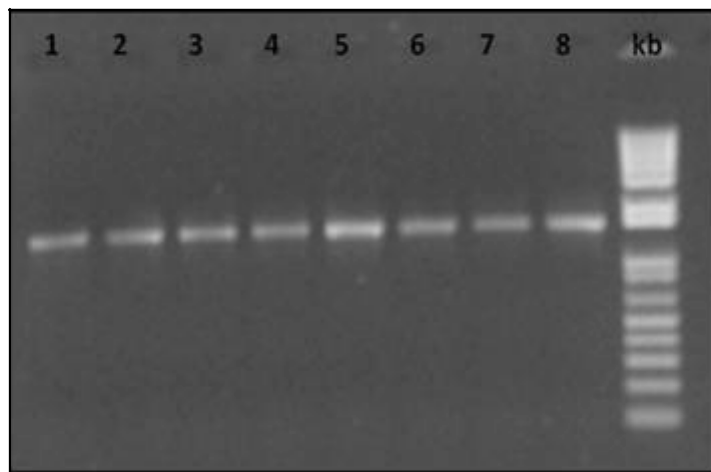


Figura 18. Amplificación con los oligonucleótidos F2C y C de 8 de los aislados del banco de microorganismos de rizósfera de tomate, los fragmentos amplificados fueron de aproximadamente 1.4 kb.

El producto de PCR obtenido fue purificado, cuantificado y secuenciado. Una vez obtenidas las secuencias éstas fueron analizadas en la base de datos del NCBI usando el

programa BLAST-N, el algoritmo Megablast y una plataforma automatizada desarrollada en nuestro departamento (Bueno *et al.*, 2010, en preparación). Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias se resumen a continuación en el Cuadro 8.

De los organismos identificados se obtuvo que el phylum más abundante fue el Firmicutes con una frecuencia del 97.95%, siendo el género *Bacillus* el más abundante dentro de este phylum representando el 87% de los organismos del banco de tomate identificados y representado por 15 especies diferentes (Cuadro 5). Los organismos restantes identificados del banco de tomate presentaron una frecuencia mucho menor y se clasificaron dentro de los phyla Proteobacteria (1.12%), Actinobacteria (0.56%) y Bacteroidetes (0.37%) (Figura 19).

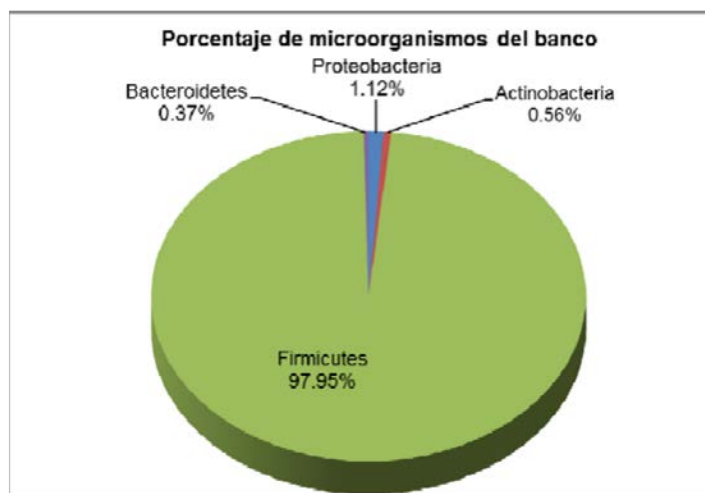


Figura 19. Porcentaje de microorganismos que conforman el banco de tomate a nivel phylum.

Cuadro 8. Resumen de los resultados del análisis de las secuencias obtenidas de los aislados del banco de tomate.

Identificación molecular de los aislados	No. de aislados
<i>Bacillus sp.</i>	236
<i>Bacillus megaterium</i>	98
<i>Bacillus subtilis</i>	84
<i>Bacterium Antarctica</i>	33
<i>Bacillus cereus</i>	25
<i>Bacillus pumilus</i>	19
Uncultured bacterium	19
<i>Bacillus flexus</i>	18
<i>Bacillus firmus</i>	14
<i>Bacillus endophyticus</i>	11
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2
<i>Bacillus aryabhattai</i>	2
<i>Paenibacillus lautus</i>	2
<i>Paenibacillus sp.</i>	2
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	2
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	2
Uncultured Firmicutes bacterium	2
<i>Acinetobacter sp.</i>	1
<i>Anoxybacillus sp.</i>	1
<i>Arthrobacter sp.</i>	1
<i>Bacillus funiculus</i>	1
<i>Bacillus korlensis</i>	1
<i>Bacillus marisflavi</i>	1
<i>Bacillus oceanisediminis</i>	1
<i>Bacillus sonorensis</i>	1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1
Bacterium WYLW2-4	1
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	1
Endophytic bacterium	1
<i>Geobacillus sp.</i>	1
<i>Microbacterium sp.</i>	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
<i>Sanguibacter sp.</i>	1
<i>Terribacillus halophilus</i>	1
Uncultured <i>Pseudomonas sp.</i>	1
<i>Virgibacillus sp.</i>	1
Total	590

6.2. RIZÓSFERA DE TOLOACHE

6.2.1. Análisis físico-químico del suelo

Los resultados de los análisis de suelo realizados a las muestras de rizósfera de toloache y su comparación con los de las muestras de tomate se muestran en el cuadro 9, donde podemos ver que existen algunas diferencias en cuanto a los niveles de pH, potasio, calcio y magnesio.

Cuadro 9. Análisis físico-químico de las muestras de suelo de la rizósfera de tomate y toloache.

Tipo de análisis	Toloache		Tomate		Referencias
	Promedio	DE	Promedio	DE	
pH	6.82	0.39	5.88	0.56	5.1-6.5 (mod. ácido), 6.6-7.3 (neutro)
CE (Mmhos/cm)	0.17	0.10	1.41	1.00	<0.2 (no-salino), 2.1-4.0 (poco salino) >4.1 salino
% M.O.	1.49	0.27	1.37	0.10	0.6-1.5 (bajo), 1.5-3.5 (medio)
P (mg/kg)	33.86	15.03	56.25	10.00	>11 (alto)
K (Cmol/kg)	2.02	0.24	3.18	0.03	0.6-2.8 (alto), >2.8 (muy alto)
Ca (Cmol/kg)	23.16	8.07	8.56	2.90	2-5 (bajo), 5-10 (mediano), >10 (alto)
Mg (Cmol/kg)	3.12	0.37	1.84	0.90	0.5-1.3 (bajo), 1.3-3 (mediano), >3.0 alto)
% Arena	59.22	19.52	17.44	1.00	
% Arcilla	10.20	3.78	37.55	0.90	
% Limo	30.58	17.88	44.95	1.20	
Textura	franco-arenoso		franco-limo-arcilloso		

6.2.2. Creación del banco de germoplasma vivo de rizósfera de toloache

Se obtuvo el banco de germoplasma de 480 organismos de rizósfera de *Datura stramonium* L. aislados en medio LB y 515 organismos aislados en medio PDA. En total se tienen 995 organismos criopreservados los cuales se mantienen a -70°C (Figura 20). El banco se construyó en placas en formato de 96 pozos, colocando un aislado en cada pozo. Se obtuvieron 11 placas con los aislados, cinco placas con aislados en LB y seis placas con aislados en PDA, se obtuvo por triplicado y se colocaron las placas en ultracongeladores diferentes, teniendo en total 33 placas.

Los aislados del banco tuvieron una eficiencia del 95% en la viabilidad teniendo que 48 de los 995 organismos del banco no pudieron ser reanimados.



Figura 20. Banco de germoplasma de los organismos aislados en LB y PDA, de la rizósfera de *Datura stramonium*, L.

6.2.2.1. Identificación molecular de los especímenes vivos del banco de toloache

En cuanto a la identificación molecular del banco de toloache se extrajo el ADN de cada uno de los especímenes del banco y se amplificó el ADN ribosomal de cada uno de ellos mediante los oligonucleótidos F2C y C (Figura 21) y se obtuvo la secuencia los productos de PCR, los cuales fueron analizados.

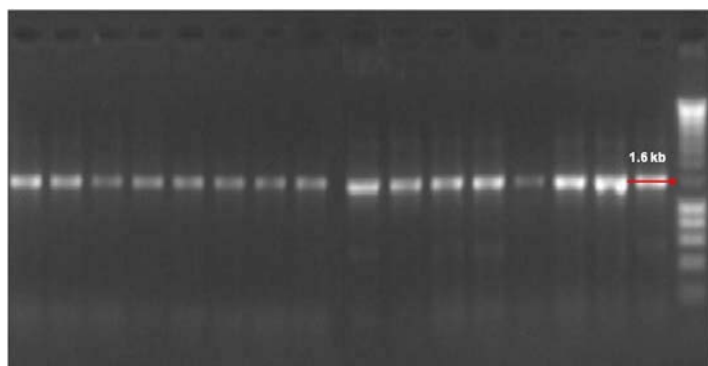


Figura 21. ADN ribosomal amplificado con los oligonucleótidos F2C y C de 16 de los organismos del banco de la rizósfera de toloache.

Los resultados del análisis molecular de los aislados del banco de rizósfera de toloache se muestran en el Cuadro 10 a los organismos identificados y el número de aislados correspondientes a cada uno en el banco de toloache.

Cuadro 10. Resumen de los resultados del análisis de las secuencias obtenidas de los aislados del banco de toloache.

Identificación molecular de los aislados	No. De aislados
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4
<i>Acinetobacter junii</i>	1
<i>Acinetobacter sp.</i>	15
<i>Arthrobacter sp.</i>	1
Bacillaceae	4
<i>Bacillus anthracis</i>	1
<i>Bacillus aryabhatai</i>	3
<i>Bacillus cereus</i>	35
<i>Bacillus circulans</i>	1
<i>Bacillus endophyticus</i>	4
<i>Bacillus flexus</i>	34
<i>Bacillus lentus</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bacillus megaterium</i>	77
<i>Bacillus niabensis</i>	1
<i>Bacillus oleronius</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	6
<i>Bacillus simplex</i>	1
<i>Bacillus sp.</i>	472
<i>Bacillus subtilis</i>	24
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Bacterium	6
Bacterium Antarctica	52
<i>Brevibacillus brevis</i>	2
<i>Burkholderia graminis</i>	4
<i>Burkholderia phenazinium</i>	1
<i>Burkholderia sp.</i>	1
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	1
<i>Enterobacter sp.</i>	23
<i>Geobacillus toebii</i>	1

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Kluyvera sp.</i>	1
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	4
<i>Lysinibacillus sp.</i>	5
<i>Massilia sp.</i>	1
<i>Methylophaga sp.</i>	1
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	2
<i>Paenibacillus sp.</i>	4
<i>Pantoea agglomerans</i>	2
<i>Pantoea ananatis</i>	2
<i>Pantoea eucrina</i>	5
<i>Pantoea sp.</i>	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
<i>Pseudomonas putida</i>	2
<i>Pseudomonas sp.</i>	2
<i>Rummeliibacillus sp.</i>	2
<i>Sphingobacterium sp.</i>	1
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	9
<i>Terribacillus goriensis</i>	1
<i>Terribacillus saccharophilus</i>	2
Uncultured Bacilli	1
Uncultured bacterium	41
Uncultured Firmicutes	2
Uncultured gamma proteobacterium	1
Uncultured Pseudomonadales	1
<i>Vibrio fluvialis</i>	1
Total	884

Se hizo el análisis de abundancia a nivel phylum de los organismos del banco de toloache identificados, y se obtuvieron los siguientes resultados (Figura 22).

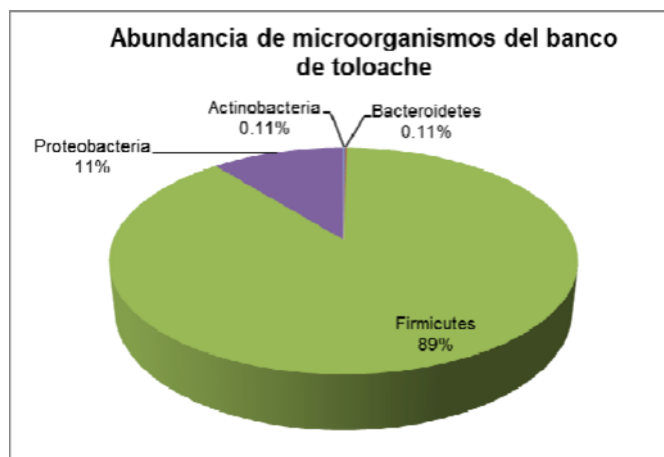


Figura 22. Análisis de abundancia de los aislados del banco de toloache identificados molecularmente.

De los aislados del banco de toloache que se encuentra criopreservado en ultracongelación a -70°C , se enviaron a secuenciar 948 productos de PCR y de estos se pudieron identificar 884 organismos los cuales presentaron homología a secuencias identificadas a nivel taxonómico en la base de datos del GenBank, dentro de estos el phylum más abundante fue Firmicutes representado por el 89% y dentro de éste el género más abundante fue *Bacillus* con el 75% de los aislados del banco de toloache, y en segundo lugar el phylum Proteobacteria representado por el 11% de los organismos del banco de toloache y dentro de éste el género más abundante es *Acinetobacter* con 16 organismos del banco de toloache, y los aislados restantes se encuentran dentro de los phyla Actinobacteria (0.11%) y Bacteroidete (0.11%).

6.2.3. Obtención del banco de clonas de 16S ADNr de la rizósfera de *Datura stramonium* L.

Para la obtención del banco de clonas de ADNr de origen procariótico y eucariótico de la rizósfera de toloache se obtuvo primeramente el ADN genómico de suelo de la rizósfera de *Datura stramonium* L. Se extrajo el ADN de dos alícuotas de suelo que se mantenían a -70°C . Éste ADN se corrió en un gel y se constató su integridad al mostrarse como una banda de alto peso molecular sin mostrar ningún barrido (Figura 23).

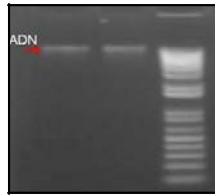


Figura 23. Extracción de ADN genómico del suelo de la rizósfera de *Datura stramonium*.

A partir del ADN genómico extraído de rizósfera de toloache se logró amplificar el ADN ribosomal de origen procariótico y eucariótico mediante la técnica de PCR usando los pares de oligonucleotidos U1/1 e ITS1/ITS4 respectivamente (Figuras 24 y 25).

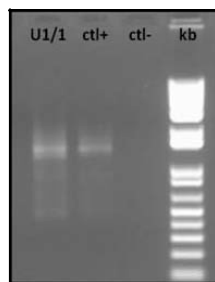


Figura 24. Amplificación del ADN ribosomal de origen procariótico a partir de ADN extraído de suelo de la rizósfera de toloache con los oligonucleótidos U1 y 1.

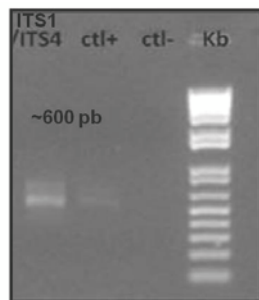


Figura 25. Amplificación del ADN ribosomal de origen eucariótico a partir de ADN extraído de suelo de la rizósfera de toloache con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4.

Con el producto de la amplificación se llevó a cabo la clonación de ADN ribosomal de origen procariótico y eucariótico con el vector pGEM-T Easy. Se obtuvieron 576 clonas de origen procariótico y 557 clonas de origen eucariótico, teniendo en total 1133 clonas las cuales fueron secuenciadas y abajo se describe el análisis completo de las mismas incluyendo el análisis filogenético, diversidad, frecuencia y abundancia de los organismos identificados.

6.2.3.1. Análisis de la microbiota del banco de clonas de origen procariota de la rizósfera de toloache

De la rizósfera de toloache se obtuvieron un total de 576 clonas de origen procariota que fueron enviadas a secuenciar, de las secuencias obtenidas se eliminaron las secuencias de mala calidad, las secuencias que contenían un número menor a 200 nucleótidos y las secuencias quimera, a partir de este primer procedimiento de curado se eliminaron 67 secuencias, se eliminaron también 130 secuencias que daban homología al vector, es decir, que eran clonas vacías y cinco secuencias que no presentaron homología alguna con la base de datos del GenBank, así como 11 secuencias que daban homología a la planta *Arabidopsis lyrata*, en total se eliminaron 212 secuencias, por lo que quedaron 363 secuencias utilizables para realizar el análisis de diversidad. Las clonas que dieron homología a organismos procariotas reportados en el GenBank se clasificaron dentro de 10 phyla diferentes: Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes, Cyanobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Bacteroidetes, Sphingobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria. Se identificaron de la misma manera 13 clases, 16 órdenes, 25 familias, 29 géneros (Cuadro 11).

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	No. De clonas
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	No aplica	Uncultured Acidobacteriaceae	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Geodermatophilaceae	<i>Blastococcus</i>	<i>Blastococcus jejuensis</i>	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Geodermatophilaceae	<i>Blastococcus</i>	<i>Blastococcus sp.</i>	2
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Geodermatophilus sp.</i>	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium sp.</i>	2
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	Uncultured <i>Mycobacterium sp.</i>	5
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiodaceae	<i>Friedmanniella</i>	<i>Friedmanniella sp.</i>	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiodaceae	<i>Kribbella</i>	<i>Kribbella sp.</i>	2
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces aculeolatus</i>	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces djakartensis</i>	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	2
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	No aplica	No aplica	Uncultured Acidobacteriales	1
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>	Uncultured <i>Patulibacter sp.</i>	3
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteraceae	<i>Conexibacter</i>	Uncultured <i>Conexibacter sp.</i>	4
Actinobacteria	Actinobacteria	Rubrobacterales	No aplica	No aplica	Uncultured Rubrobacterales	1
Actinobacteria	Actinobacteria	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Acidobacteria	4
Actinobacteria	Actinobacteria	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured actinobacterium	8
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Pontibacter</i>	<i>Pontibacter sp.</i>	1
Bacteroidetes	Bacteroidetes	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Bacteroidetes	1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	No aplica	Uncultured Flexibacteraceae	1
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	<i>Pedobacter</i>	Uncultured <i>Pedobacter sp.</i>	1
Chloroflexi	Chloroflexi	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Chloroflexi	6
Cyanobacteria	No asignado	Chroococcales	Synechococcaceae	<i>Cyanobacterium</i>	Uncultured <i>Cyanobacterium sp.</i>	3
Cyanobacteria	No asignado	Nostocales	Nostocaceae	<i>Nostoc</i>	<i>Nostoc muscorum</i>	1
Cyanobacteria	No asignado	Oscillatoriales	Phormidiaceae	<i>Arthrospira</i>	<i>Arthrospira sp.</i>	1
Cyanobacteria	No asignado	Oscillatoriales	Phormidiaceae	<i>Microcoleus</i>	<i>Microcoleus vaginatus</i>	2
Cyanobacteria	No asignado	Oscillatoriales	Pseudanabaenaceae	<i>Leptolyngbya</i>	<i>Leptolyngbya sp.</i>	1
Cyanobacteria	No asignado	Oscillatoriales	Pseudanabaenaceae	No aplica	Pseudanabaenaceae cyanobacterium	3

Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus sp.</i>	2
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Virgibacillus</i>	<i>Virgibacillus dokdonensis</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus harenae</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	2
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>	3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus telluris</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus validus</i>	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	Uncultured <i>Paenibacillus sp.</i>	3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	No aplica	No aplica	Uncultured Bacillales	5
Firmicutes	Clostridia	Thermoanaerobacteriales	Thermoanaerobacteriaceae	<i>Moorella</i>	Uncultured <i>Moorella sp.</i>	1
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	No aplica	Uncultured Gemmatimonadaceae	2
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	<i>Gemmatimonas</i>	Uncultured <i>Gemmatimonas sp.</i>	3
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	No aplica	No aplica	Uncultured Gemmatimonadales	2
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Gemmatimonadetes	19
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	No aplica	No aplica	Uncultured planctomycete	5
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Paracoccus</i>	Uncultured <i>Paracoccus sp.</i>	1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Granulibacter</i>	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	Uncultured <i>Sphingomonas sp.</i>	2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	No aplica	No aplica	No aplica	Alpha proteobacterium	1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured delta proteobacterium	9
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	<i>Archangium</i>	<i>Archangium gephyra</i>	1
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	<i>Anaeromyxobacter</i>	Uncultured <i>Anaeromyxobacter sp.</i>	1
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Myxococcaceae	<i>Myxococcus</i>	<i>Myxococcus fulvus</i>	1
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	No aplica	No aplica	Uncultured Myxococcales	3
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	No aplica	No aplica	<i>Entotheonella</i>	Uncultured <i>Entotheonella sp.</i>	2
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	No aplica	No aplica	Uncultured Pseudomonadales	4
Proteobacteria	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured proteobacterium	1

Sphingobacteria	No asignado	Sphingobacteriales	Flexibacteraceae	<i>Dyadobacter</i>	<i>Dyadobacter fermentans</i>	2
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Bacterium	1
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured bacterium	200
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured soil bacterium	8
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured organism	11

Cuadro 11. Clasificación taxonómica de los organismos identificados del banco de clonas procariotas de la rizósfera de toloache.

Se realizó un análisis de la abundancia a nivel phyla de los organismos que pudieron ser identificados a nivel phyla del banco de clonas de origen procariota, teniendo que 220 secuencias dieron homología a organismos que no pudieron ser identificados a nivel phyla: bacteria (1), bacteria no cultivable (200), bacteria del suelo no cultivable (8), organismo no cultivable (11), por lo que para este análisis se utilizaron únicamente 143 secuencias identificables a nivel phyla.

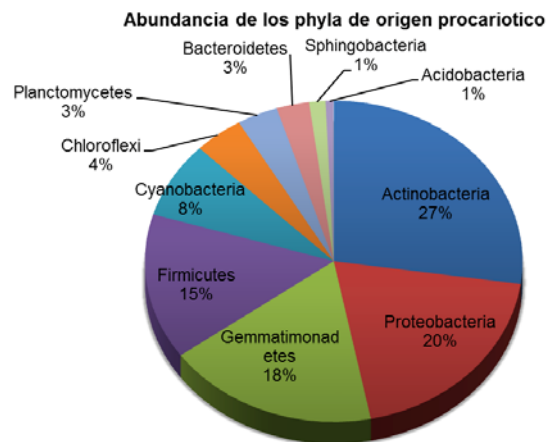


Figura 26. Análisis de abundancia a nivel phyla del banco de clonas de origen procariota.

En el análisis de abundancia a nivel phyla del banco de clonas de origen procariotico (Figura 26), se obtuvo que el phylum mas abundante fue Actinobacteria con el 27% de las clonas analizadas, los siguientes 3 phyla mas representativos fueron Proteobacteria (20%), Gemmatimonadetes (18%) y Firmicutes (15%); los phyla tambien presentes en el banco de clonas de origen procariótico pero en menos cantidad son los phyla Cyanobacteria (8%), Chloroflexi (4%), Planctomycetes (3%), Bacteroidetes (3%), Sphingobacteria (1%) y Acidobacteria (1%).

Se hizo un análisis de frecuencia a nivel género de los organismos procariotas identificados del banco de clonas, para determinar cuales géneros son los mas representativos del banco de clonas procariotas (Figura 27).

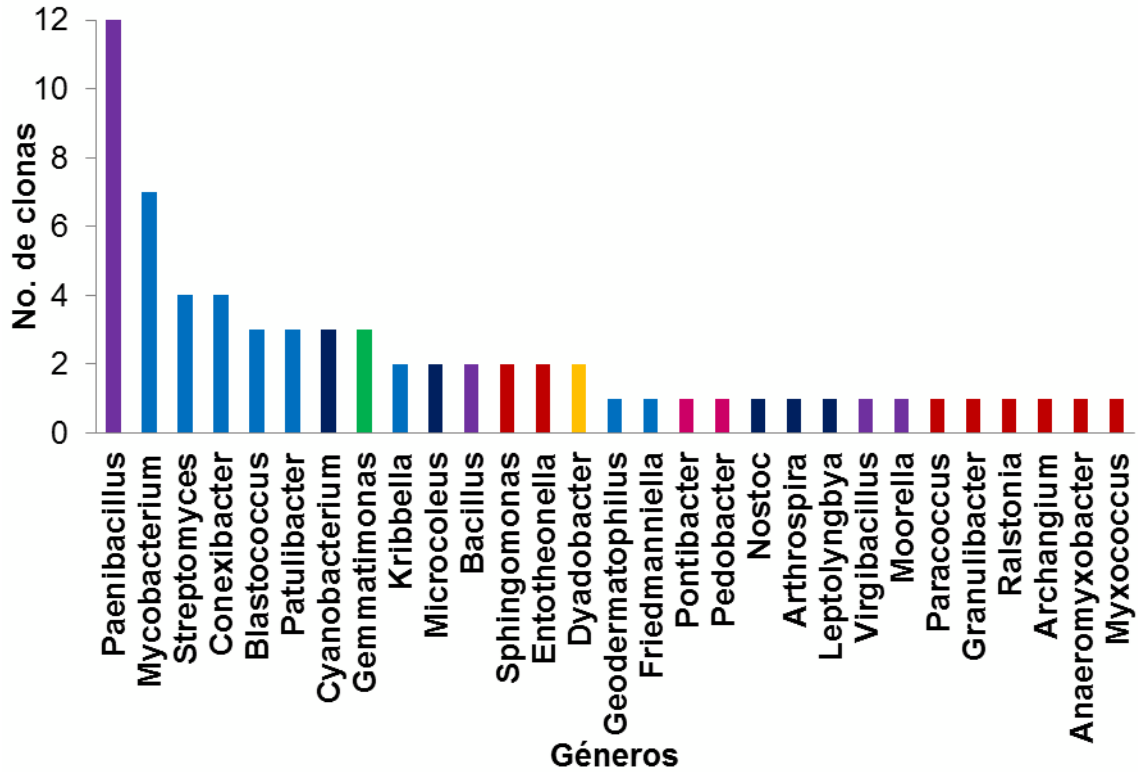


Figura 27. Análisis de frecuencia a nivel género de los organismos identificados del banco de clonas procariotas.

Del análisis de frecuencia a nivel género de las clonas procariotas, se obtuvo que el género más representativo del banco de clonas fue el género *Paenibacillus* (12 clonas), otro género también presente en mayor frecuencia en el banco de clonas procariota es el género *Mycobacterium* (siete clonas), los otros 27 géneros dentro del banco de clonas procariotas se encuentran en frecuencias similares entre si.

Con las secuencias ya filtradas y eliminadas las que no daban homología a organismos procariotas en el GenBank, se realizó un análisis de rarefacción de una sola muestra para determinar la eficiencia del muestreo para el banco de clonas procariotas (Figura 28).

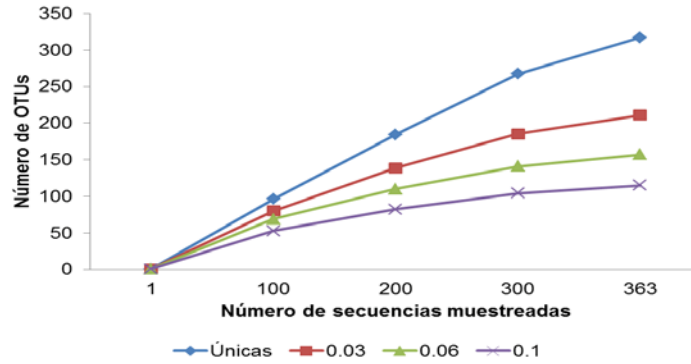


Figura 28. Análisis de rarefacción de OTUs para la muestra de secuencias procariotas realizado para secuencias únicas y a tres diferentes niveles de distancia evolutiva 0.03, 0.06 y 0.1.

Se realizó un análisis de rarefacción para las muestras de secuencias del banco de clonas procariotas para determinar la eficiencia del muestreo, la curva de rarefacción se hizo para OTUs de secuencias únicas y para secuencias con distancia evolutivas de 0.03, 0.06 y 0.1, que corresponden a similitud entre las secuencias analizadas del 97%, 94% y 90% respectivamente. Las curvas a diferentes niveles de similitud no llegan a la fase de *plateau*, lo que indica que la muestra no es completamente representativa de toda la diversidad del sitio muestreado, sin embargo podemos ver que para secuencias únicas la curva es casi lineal, lo que indica una buena toma de muestras, ya que se tiene un número alto de OTUs, es decir, que la mayoría de las secuencias tomadas corresponden a un fragmento diferente de producto de PCR y que no se tomó un número alto de copias iguales al tomar las muestras de clonas.

6.2.2.2. Análisis de la microbiota del banco de clonas de origen eucariota de la rizósfera de toloache.

De la rizósfera de toloache se obtuvieron un total de 557 clonas de origen eucariota que fueron enviadas a secuenciar, de las secuencias obtenidas se eliminaron las secuencias de mala calidad, las secuencias que contenían un número menor a 200 nucleótidos y secuencias quimera, a partir de este primer procedimiento de curado se eliminaron 24 secuencias, se eliminaron también 135 secuencias que daban homología al vector, es decir, que eran clonas vacías y 80 secuencias que daban homología a secuencias que no correspondían a regiones del ADN_r, en total se eliminaron 239 secuencias, por lo que quedaron 318 secuencias que fueron utilizadas para realizar el análisis de diversidad. Las clonas que dieron homología a organismos eucariotas reportados en el GenBank se clasificaron dentro de ocho phyla diferentes: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Nematoda, Ciliofora, Streptophyta y Protozoa. Se identificaron de la misma manera 11 clases, 20 órdenes, 23 familias, 38 géneros (Cuadro 12).

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	No. De clonas
Nematoda	Secernentea	Rhabditida	Cephalobidae	<i>Acrobeles</i>	<i>Acrobeles complexus</i>	2
Nematoda	Secernentea	Rhabditida	Cephalobidae	<i>Acrobeles</i>	<i>Acrobeles sp.</i>	1
Nematoda	Secernentea	Rhabditida	Cephalobidae	<i>Heterocephalobellus</i>	<i>Heterocephalobellus sp.</i>	2
Nematoda	Secernentea	Tylenchida	Hoplolaimidae	<i>Pratylenchus</i>	<i>Pratylenchus goodeyi</i>	5
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	4
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	Uncultured <i>Cladosporium</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	No aplica	No aplica	No aplica	<i>Dothideomycetes sp.</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	<i>Lophiostoma</i>	<i>Lophiostoma cynaroidis</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	<i>Lophiostoma</i>	<i>Lophiostoma sp.</i>	2
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Montagnulaceae	<i>Paraconiothyrium</i>	<i>Paraconiothyrium hawaiiense</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	No aplica	No aplica	Uncultured Pleosporales	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	No asignado	<i>Didymella</i>	<i>Didymella bryoniae</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	No asignado	<i>Phoma</i>	<i>Phoma sp.</i>	4
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	No asignado	<i>Pyrenochaeta</i>	<i>Pyrenochaeta sp.</i>	4
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	No asignado	<i>Stagonosporopsis*</i>	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum*</i>	1
Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Testudinaceae	<i>Lepidosphaeria</i>	<i>Lepidosphaeria nicotiae</i>	1
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	1
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>	3
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus varicolor</i>	6
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>	Uncultured <i>Aspergillus</i>	5
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Emericella</i>	<i>Emericella undulata</i>	1
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Emericella**</i>	<i>Emericella varicolor*</i>	1
Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Neosartorya**</i>	<i>Neosartorya glabra*</i>	1
Ascomycota	Eurotiomycetes	Onygenales	Ajellomycetaceae	<i>Spiromastix</i>	<i>Spiromastix warcupii</i>	1
Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Ascomycete sp. (Ascomycota)	1
Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Ascomycota sp.	7
Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured ascomycete	3

Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Ascomycota	2
Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured Pezizomycotina	1
Ascomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured stichotrichid	1
Ascomycota	No asignado	No asignado	No asignado	<i>Ochroconis</i>	<i>Ochroconis calidifluminalis</i>	1
Ascomycota	No asignado	No asignado	No asignado	<i>Pseudorobillarda</i> ***	<i>Pseudorobillarda sojae</i> *	2
Ascomycota	No asignado	No asignado	No asignado	<i>Xenobotrytis</i>	<i>Xenobotrytis acaducospora</i>	2
Ascomycota	Pezizomycetes	No aplica	No aplica	No aplica	<i>Pezizomycetes sp.</i>	2
Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Pezizaceae	No aplica	Uncultured Pezizaceae	2
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Calonectria</i>	<i>Calonectria hawksworthii</i>	5
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	2
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium lunatum</i>	2
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp.</i>	10
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Nectria</i>	<i>Nectria mauritica</i>	57
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Nectria</i>	Uncultured <i>Nectria</i>	1
Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	No aplica	No aplica	Uncultured Hypocreales	1
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	2
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Humicola</i>	<i>Humicola sp.</i>	11
Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	No aplica	No aplica	Uncultured Sordariales	2
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	<i>Agaricus</i>	<i>Agaricus xanthodermus</i>	1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	<i>Leucoagaricus</i>	<i>Leucoagaricus littoralis</i>	1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	<i>Tulostoma</i>	<i>Tulostoma melanocyclum</i>	1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Pluteaceae	<i>Chamaeota</i>	<i>Chamaeota sinica</i>	2
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Pluteaceae	<i>Chamaeota</i>	<i>Chlorophyllum molybdites</i>	1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	<i>Coprinellus</i>	<i>Coprinellus bisporus</i>	2
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Psathyrellaceae	<i>Psathyrella</i>	<i>Psathyrella candolleana</i>	2
Basidiomycota	Agaricomycetes	Geastrales	Geastraceae	<i>Geastrum</i>	<i>Geastrum coronatum</i>	1
Basidiomycota	Agaricomycetes	Thelephorales	Thelephoraceae	No aplica	Uncultured Thelephoraceae	2
Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	No asignado	<i>Rhodosporidium</i>	<i>Rhodosporidium sp.</i>	5

Basidiomycota	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	No asignado	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	1
Basidiomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured basidiomycete	3
Basidiomycota	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured soil basidiomycete	8
Basidiomycota	Tremellomycetes	Tremellales	Tremellaceae	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>	1
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Fungal endophyte sp.	7
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Fungal sp.	5
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured fungus	19
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured soil fungus	66
Zygomycota	No asignado	Basidiobolales	Basidiobolaceae	<i>Basidiobolus</i>	<i>Basidiobolus meristosporus</i>	2
Zygomycota	No asignado	Entomophthorales	Ancylistaceae	<i>Conidiobolus</i>	<i>Conidiobolus coronatus</i>	8
Zygomycota	No asignado	Mortierellales	Mortierellaceae	<i>Mortierella</i>	<i>Mortierella wolfii</i>	4
No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	No aplica	Uncultured eukaryote	1
Ciliophora	Ciliatea	Hypotrichida	Oxytrichidae	No aplica	<i>Oxytrichidae</i>	3
Protozoa	Lobosa	Amoebida	Vahlkampfiidae	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Vahlkampfia sp.</i>	1
Streptophyta	Bryopsida	Bryales	Bryaceae	<i>Imbribryum</i>	<i>Imbribryum alpinum</i>	1
Streptophyta	Bryopsida	Bryales	Bryaceae	<i>Imbribryum</i>	<i>Imbribryum blandum</i>	1

Cuadro 12. Clasificación taxonómica de los organismos identificados del banco de clonas de eucariota de la rizósfera de toloache.

Se realizó un análisis de la abundancia a nivel phyla de los organismos que pudieron ser identificados a nivel phyla del banco de clonas de origen eucariota, teniendo que 98 secuencias dieron homología a organismos que no pudieron ser identificados a nivel phyla: hongo eneolítico (7), hongo (5), hongo no cultivable (19), hongo del suelo no cultivable (66) y eucariota no cultivable (1), por lo que para este análisis se utilizaron únicamente 219 secuencias identificables a nivel phyla.

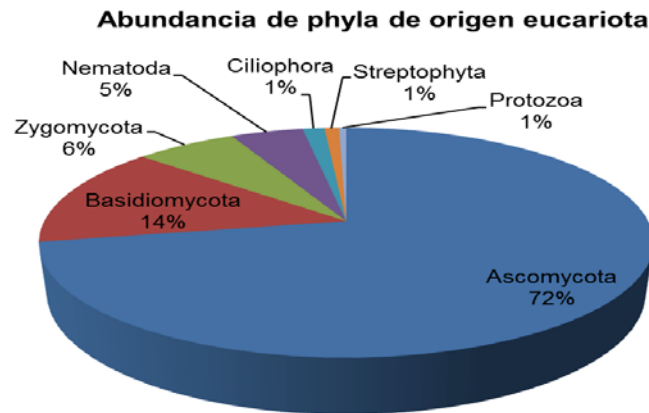


Figura 29. Análisis de abundancia a nivel phyla del banco de clonas de origen eucariota.

En el análisis de abundancia a nivel phyla del banco de clonas de origen procariontico (Figura 29), se obtuvo que el phylum mas abundante fue Ascomycota con el 72% de las clonas analizadas, el segundo phylum mas representativo fue Basidiomycota con el 14% de las clonas analizadas, y los phyla que siguen en abundancia son los siguientes: Zygomycota (6%), Nematoda (5%), Ciliophora (1%), Streptophyta (1%) y Protozoa (1%).

Se hizo un análisis de frecuencia a nivel género de los organismos eucariotas identificados del banco de clonas, para determinar cuales géneros son los mas representativos del banco de clonas eucariotas (Figura 30).

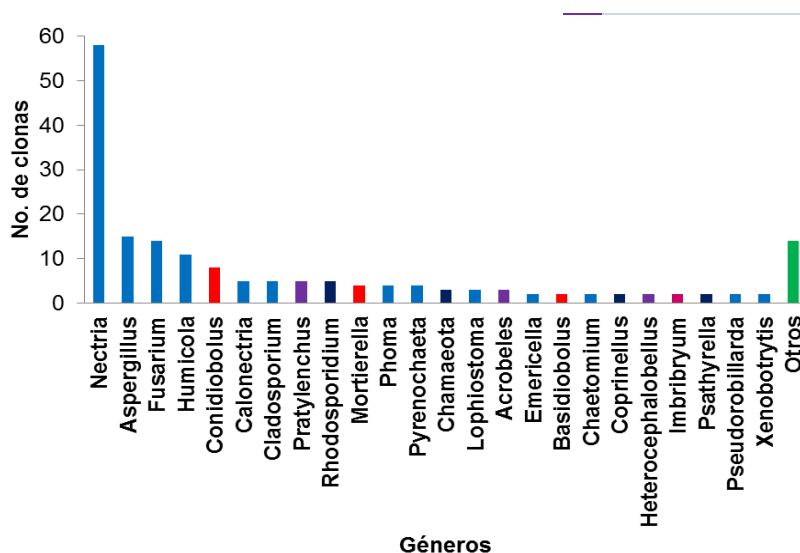


Figura 30. Análisis de frecuencia a nivel género de los organismos identificados del banco de clonas procariotas.

Del análisis de frecuencia a nivel género de las clonas procariotas, se obtuvo que el género más representativo del banco de clonas fue el género *Nectria* (clasificado dentro del phylum Ascomycota) con 59 clonas del total de clonas analizadas (27%), representando una abundancia muy elevada con respecto a los demás géneros identificados dentro del banco de clonas eucariotas. Otros géneros también presentes en mayor abundancia fueron: *Aspergillus* (15 clonas), *Fusarium* (14 clonas), *Humicola* (11 clonas), géneros clasificados dentro del mismo phylum Ascomycota. Otro género abundante fue *Conidiobolus* del phylum Zygomycota con ocho clonas. Además se identificaron los géneros *Calonectria*, *Cladosporium*, *Pratylenchus* y *Rhodosporidium* con cinco clonas; *Mortierella*, *Phoma* y *Pyrenochaeta* con cuatro clonas; *Chamaeota*, *Emericella*, *Lophiostoma* y *Oxytrichidae* con tres clonas; *Acrobeles*, *Basidiobolus*, *Chaetomium*, *Coprinellus*, *Heterocephalobellus*, *Imbricium*, *Psathyrella*, *Pseudorobillarda* y *Xenobotrytis* con dos clonas y los géneros representados con una sola clona son: *Acrobeles*, *Agaricus*, *Cryptococcus*, *Didymella*, *Geastrum*, *Lepidosphaeria*, *Leucoagaricus*, *Neosartorya*, *Ochroconis*, *Paraconiothyrium*, *Rhodotorula*, *Stagonosporopsis*, *Tulostoma* y *Vahlkampfia*.

Con las secuencias ya filtradas y eliminadas las que no daban homología a organismos eucariotas en el GenBank, se realizó un análisis de rarefacción de una sola muestra para determinar la eficiencia del muestreo para el banco de clonas eucariotas (Figura 31).

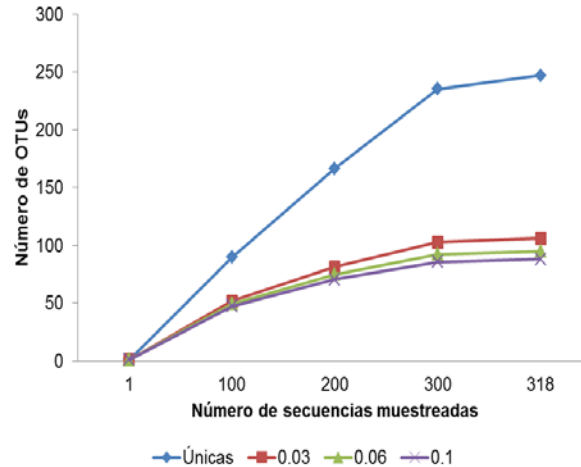


Figura 31. Análisis de rarefacción de OTUs para la muestra de secuencias eucariotas realizado para secuencias únicas y a tres diferentes niveles de distancia evolutiva 0.03, 0.06 y 0.1.

Se realizó un análisis de rarefacción para las muestras de secuencias del banco de clonas eucariotas para determinar la eficiencia del muestreo, la curva de rarefacción se hizo para OTUs de secuencias únicas y para secuencias con distancia evolutivas de 0.03, 0.06 y 0.1, que corresponden a similitud entre las secuencias analizadas del 97%, 94% y 90% respectivamente. Las curvas a diferentes niveles de similitud no llegan a la fase de *plateau* completamente sin embargo para los niveles de distancia evolutiva de 0.03, 0.06 y 0.1, las curvas casi se vuelven paralelas al eje de las x, lo que indica un buen esfuerzo de muestreo, por otra parte la curva de secuencias únicas se encuentra muy elevada indicando con un alto número de secuencias muestreadas una buena toma de las muestras de colonias transformadas.

6.3. Análisis comparativo de la diversidad de la rizósfera de toloache y tomate.

De los datos obtenidos de la diversidad procariota y eucariota de organismos cultivables identificados de la rizósfera de toloache y de tomate se hizo un análisis comparativo a nivel phyla (Figuras 32 y 33).

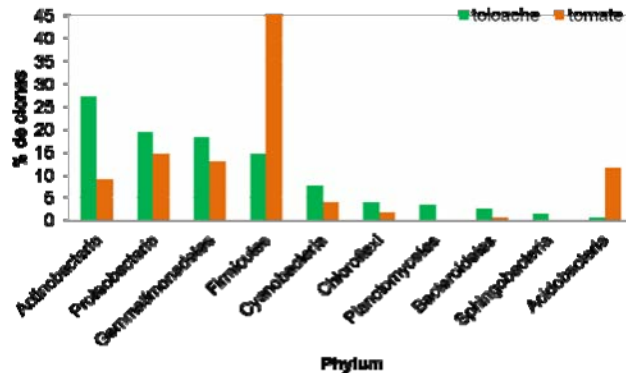


Figura 32. Análisis comparativo a nivel phyla de los organismos procariotas identificados de la rizósfera de toloache y tomate.

La Figura 32 muestra el análisis comparativo a nivel phyla del banco de clonas procariotas de la rizósfera de tomate y toloache, en el cual, se analizaron 143 secuencias para toloache y 122 para tomate. De éste análisis se obtuvo que el phylum más abundante para la muestra de rizósfera de toloache fue Actinobacteria con el 27%, mientras que para la muestra de rizósfera de tomate fue Firmicutes con el 45%. Los tres phyla que le siguen en abundancia para el banco de clonas de toloache son Proteobacteria (20%), Gemmatimonadetes (18%) y Firmicutes (15%); para el banco de clonas de tomate los phyla de mayor abundancia son también los phyla Proteobacteria (15%) y Gemmatimonadetes (13%), sin embargo, se encuentran representados en menor proporción que en el banco de clonas de toloache. Otro phylum que difiere entre las dos rizósferas es el phylum Acidobacteria, el cual es el cuarto más abundante para la muestra de tomate con el 11%, mientras que para toloache es el menos abundante con el 1%.

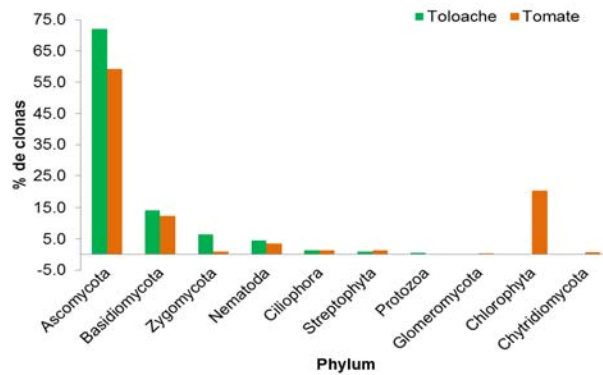


Figura 33. Análisis comparativo a nivel phyla de los organismos identificados de la rizósfera de toloache y tomate.

La Figura 33 muestra el análisis comparativo a nivel phyla del banco de clonas eucariotas de la rizósfera de tomate y toloache, en el cual, se analizaron 219 secuencias para toloache y 309 para tomate. De éste análisis se obtuvo que el phylum eucariota más abundante tanto para la rizósfera de toloache como para la de tomate fue Ascomycota con el 72.3% para la rizósfera de toloache y 59.2% para la rizósfera de tomate, en ambas rizósferas éste se presentó en un nivel muy por arriba de los demás phyla de eucariotas identificados. Otro phylum abundante en ambas rizósferas es el phylum Basidiomycota con el 14.3% para la rizósfera de toloache y el 12.3% para la rizósfera de tomate. El phylum Chlorophyta se encontró en el banco de clonas eucariotas de la rizósfera de tomate con un 20%, mientras que dentro del banco de clonas eucariotas de la rizósfera de toloache no se identificó ningún organismo perteneciente a éste. Chytridiomycota fue un phylum identificado solo en la rizósfera de tomate con el 0.6% (2 clonas). En el phylum Zygomycota se encontraron diferencias entre la abundancia de las clonas eucariotas de las rizósferas de toloache y tomate, presentándose en un 14% en la rizósfera de toloache y 3% en la de tomate. Los cuatro phyla también identificados en ambas rizósferas y los cuales se encontraron en abundancia similar en ambas rizósferas fueron: Nematoda, Ciliophora, Streptophyta y Protozoa.

Se realizó un análisis de rarefacción a una distancia evolutiva del 0.03, es decir, una similitud del 97% entre las secuencias analizadas, para las cuatro muestras: banco de clonas de procariontes de toloache y de tomate y de clonas de eucariotas de tomate y de toloache, esto se hizo para comparar la diversidad entre las cuatro muestras (Figura 34).

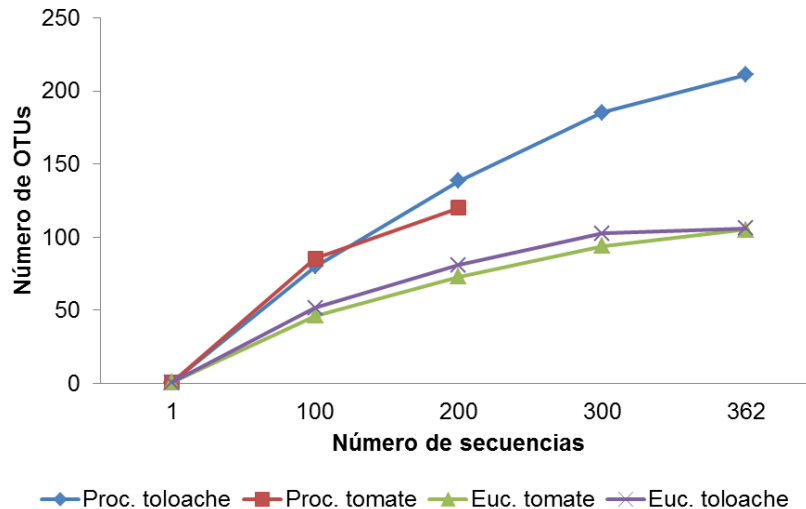


Figura 34. Análisis de rarefacción para las muestras del banco de clonas procariotas y eucariotas de tomate y toloache.

La curva de rarefacción para las cuatro muestras a una distancia evolutiva de 0.03 (97% de similitud) que la biblioteca de clonas procariotas de toloache y tomate son más abundantes que las muestras de clonas eucariotas de toloache y tomate; mientras que la tendencia de las curvas en la gráfica muestran que el banco de clonas procariotas de toloache es más diversa que la de tomate. La muestra de clonas eucariotas de toloache y tomate no muestran mucha diferencia entre ellas siendo iguales al final del muestreo en el número más alto de secuencias lo cual indica que la diversidad de eucariotas entre ambas rizósferas la de toloache en la zona de reserva ecológica de la Uva y la de tomate en la zona de cultivo son similares en cuanto a diversidad (Figura 34).

Se realizó un análisis de conjuntos a nivel de género de los organismos procariotas y eucariotas analizados mediante un diagrama de Venn (Figura 35), en los diagramas de Venn los círculos verdes representan la rizósfera de toloache y los círculos rosas la rizósfera de tomate, el área en la que se traslapan los círculos representan los géneros que se se encontraron en ambas rizósferas.

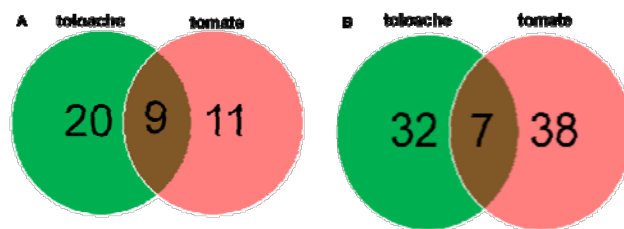


Figura 35. Diagrama de Venn de géneros del banco de clonas de la rizósfera procariota (A) y eucariota (B) de toloache (en verde) y tomate (en rosa).

Para el diagrama de Venn realizado a partir de los géneros de organismos procariotas identificados (Figura 35A), se compararon 29 géneros diferentes identificados en la rizósfera de toloache en la zona preservada y 20 en la rizósfera de tomate en la zona de cultivo. De esta comparación se obtuvo que nueve géneros fueron encontrados en ambas rizósferas, 20 géneros se encontraron únicamente en la rizósfera de toloache y 11 géneros fueron encontrados únicamente en la rizósfera de tomate, los nueve géneros procariotas que coincidieron en ambas rizósferas fueron: *Anaeromyxobacter*, *Archangium*, *Bacillus*, *Cyanobacterium*, *Nostoc*, *Patulibacter*, *Virgibacillus*, *Paenibacillus* y *Mycobacterium*.

De igual forma se hizo este análisis para los géneros eucariotas identificados de ambas rizósferas (Figura 35B), en este caso se compararon 39 géneros para la rizósfera de toloache en la zona preservada y 45 géneros para la de tomate en la zona de cultivo. Se obtuvo que siete géneros eucariotas coincidieron en ambas rizósferas, 32 géneros se encontraron únicamente en la rizósfera de toloache y 38 géneros fueron encontrados únicamente en la rizósfera de tomate, los siete géneros eucariotas encontrados en ambas rizósferas fueron: *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Mortierella*, *Nectria*, *Humicola* y *Fusarium*. En los Cuadros 13 y 14 se encuentran representados más detalladamente estos géneros, en el cual se indican con un “1” la presencia del género en la rizósfera y con un “0” la ausencia del género en la rizósfera.

Cuadro 13. Relación de presencia y ausencia de géneros procariotas de la rizósfera de toloache y tomate. 1 indica presencia del género y 0 indica ausencia del género.

Género	Rizósfera de toloache	Rizósfera de tomate
<i>Agrobacterium</i>	0	1
<i>Anaeromyxobacter</i>	1	1
<i>Archangium</i>	1	1
<i>Arthrospira</i>	1	0
<i>Bacillus</i>	1	1
<i>Blastococcus</i>	1	0
<i>Brevibacillus</i>	0	1
<i>Candidatus fitoplasma</i>	0	1
<i>Conexibacter</i>	1	0
<i>Cyanobacterium</i>	1	1
<i>Dyadobacter</i>	1	0
<i>Enterococcus</i>	0	1
<i>Entotheonella</i>	1	0
<i>Eubacterium</i>	0	1
<i>Flavobacterium</i>	0	1
<i>Friedmanniella</i>	1	0
<i>Gemmatimonas</i>	1	0
<i>Geodermatophilus</i>	1	0
<i>Granulibacter</i>	1	0
<i>Halobacillus</i>	0	1
<i>Hyalangium</i>	0	1
<i>Kribbella</i>	1	0
<i>Leptolyngbya</i>	1	0
<i>Microcoleus</i>	1	0
<i>Moorella</i>	1	0
<i>Mycobacterium</i>	1	1
<i>Myxococcus</i>	1	0
<i>Nostoc</i>	1	1
<i>Ochrobactrum</i>	0	1
<i>Oscillatoria</i>	0	1
<i>Paenibacillus</i>	1	1
<i>Paracoccus</i>	1	0
<i>Patulibacter</i>	1	1
<i>Pedobacter</i>	1	0
<i>Pontibacter</i>	1	0
<i>Ralstonia</i>	1	0
<i>Sphingomonas</i>	1	0
<i>Sphingosinicella</i>	0	1

<i>Streptomyces</i>	1	0
<i>Virgibacillus</i>	1	1

Cuadro 14. Relación de presencia y ausencia de géneros eucariotas de la rizósfera de toloache y tomate. 1 indica presencia del género y 0 indica ausencia del género.

Género	Rizósfera de toloache	Rizósfera de tomate
<i>Absidia</i>	0	1
<i>Acremonium</i>	0	1
<i>Acrobeles</i>	1	0
<i>Acroboloides</i>	0	1
<i>Agaricus</i>	1	0
<i>Alternaria</i>	0	1
<i>Aporospora</i>	0	1
<i>Aspergillus</i>	1	1
<i>Atriplex</i>	0	1
<i>Basidiobolus</i>	1	0
<i>Calonectria</i>	1	0
<i>Cephalosporium</i>	0	1
<i>Chaetomium</i>	1	1
<i>Chamaeota</i>	1	0
<i>Cheilymenia</i>	0	1
<i>Chlorosarcinopsis</i>	0	1
<i>Chrysosporium</i>	0	1
<i>Cladosporium</i>	1	1
<i>Cochliobolus</i>	0	1
<i>Conidiobolus</i>	1	0
<i>Conocybe</i>	0	1
<i>Coprinellus</i>	1	0
<i>Cortinarius</i>	0	1
<i>Corynascus</i>	0	1
<i>Cryptococcus</i>	1	0
<i>Cyrtomyces</i>	0	1
<i>Didymella</i>	1	0
<i>Dumaliella</i>	0	1
<i>Echinochloa</i>	0	1
<i>Emmonsia</i>	0	1
<i>Eurotium</i>	0	1
<i>Fusarium</i>	1	1
<i>Geastrum</i>	1	0
<i>Glomus</i>	0	1

<i>Gymnopus</i>	0	1
<i>Halteria</i>	0	1
<i>Heterocephalobellus</i>	1	0
<i>Hohenbuehelia</i>	0	1
<i>Humicola</i>	1	1
<i>Imbribryum</i>	1	0
<i>Lepidosphaeria</i>	1	0
<i>Leptosphaeria</i>	1	0
<i>Leucoagaricus</i>	0	1
<i>Leucosporidium</i>	0	1
<i>Lophiostoma</i>	1	0
<i>Mortierella</i>	1	1
<i>Nectria</i>	1	1
<i>Neosartorya</i>	1	0
<i>Ochroconis</i>	1	0
<i>Oedogonium</i>	0	1
<i>Olpidium</i>	0	1
<i>Oxytricha</i>	0	1
<i>Oxytrichidae</i>	1	0
<i>Paecilomyces</i>	0	1
<i>Panaeolus</i>	0	1
<i>Paracoccidioides</i>	0	1
<i>Paraconiothyrium</i>	1	0
<i>Paramecium</i>	0	1
<i>Phoma</i>	1	0
<i>Pratylenchus</i>	1	0
<i>Psathyrella</i>	1	0
<i>Pseudochlorella</i>	1	0
<i>Pseudorobillarda</i>	1	0
<i>Pyrenochaeta</i>	1	0
<i>Rhizophlyctis</i>	0	1
<i>Rhizopus</i>	0	1
<i>Rhodosporidium</i>	1	0
<i>Rhodotorula</i>	1	0
<i>Scenedesmus</i>	0	1
<i>Spiromastix</i>	1	0
<i>Stagonosporopsis</i>	1	0
<i>Tulostoma</i>	1	0
<i>Vahlkampfia</i>	1	0
<i>Xenobotrytis</i>	1	0
<i>Zeldia</i>	0	1

Se realizó la estimación del índice de Shannon para determinar y comparar la diversidad entre ambas rizósferas tanto para el banco de clonas de origen procariota como eucariota. El análisis se realizó a tres niveles de distancia evolutiva entre las secuencias a 3%, 6% y 10%, los resultados de este análisis se muestra en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Estimación del índice de Shannon para las cuatro muestras a niveles de distancia evolutiva de 3%, 6% y 10%.

Índice de Shannon			
	3%	6%	10%
toloache procariota	5.09	4.69	4.06
tomate procariota	4.69	4.54	4.35
toloache eucariota	3.83	3.74	3.68
tomate eucariota	3.80	3.68	3.64

Como se muestran en el Cuadro 15, el grupo de secuencias analizadas que obtuvo un valor del índice de Shannon más alto fue el de la rizósfera de toloache de clonas de origen procariota en los tres niveles de distancia evolutiva. Los índices son más altos en dos (3 y 6%) de los tres niveles de distancia evolutiva en la muestra procariota de toloache con relación a la de tomate, sugiriendo mayor diversidad en la rizósfera procariota de toloache. En relación a las clonas de origen eucariota, la segunda rizósfera más diversa fue la rizósfera de tomate. Los menos diversos fueron los bancos de clonas de origen eucariota de ambas rizósferas, siendo muy similares entre sí ambas rizósferas.

6.4. Incorporación de los datos de la rizósfera de tomate y toloache en la base de datos

Se cuenta en CIIDIR-Sinaloa con una base de datos construida por la Licda. Rosario Pérez de nuestro equipo de trabajo denominada “Colección Científica de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Molecular de la Rizósfera” para el manejo de los datos de la microbiota de la rizósfera de toloache y los ya generados anteriormente de la rizósfera de tomate. Esta base de datos contiene las clonas de origen

procariota y eucariota de la rizósfera de tomate y los del banco de microorganismos preservados de tomate y toloache. Se llenaron en primer lugar los catálogos con los datos que se tienen de las clonas de la rizósfera de tomate incluyendo: nombre de la colección; institución a la que pertenece la colección; información geográfica, región donde se colectaron las muestras; personas colectoras y determinadoras, tipo de vegetación, tipo de rizósfera e información taxonómica (Figura 36).



Figura 36. Llenado de los catálogos de la base de datos con la información de las clonas de ADN ribosomal de la rizósfera de tomate.

Posteriormente se llevó a cabo la captura de cada uno de los ejemplares, se ligó con la información de los catálogos y se incluyeron las secuencias de cada una de las clonas y de los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de las clonas (Figura 37). Se incorporaron 760 ejemplares que corresponden a las clonas de ADN ribosomal de la rizósfera de tomate y 592 que corresponden a los organismos criopreservados del banco de rizósfera de tomate, teniendo en total 1352 ejemplares capturados en la base de datos.

La información que ya se ha incorporado a la base de datos se hará disponible a través del portal de la CONABIO. La incorporación y revisión de estos datos se ha realizado con la asistencia de los becarios del proyecto CONABIO dentro de nuestro equipo de trabajo.

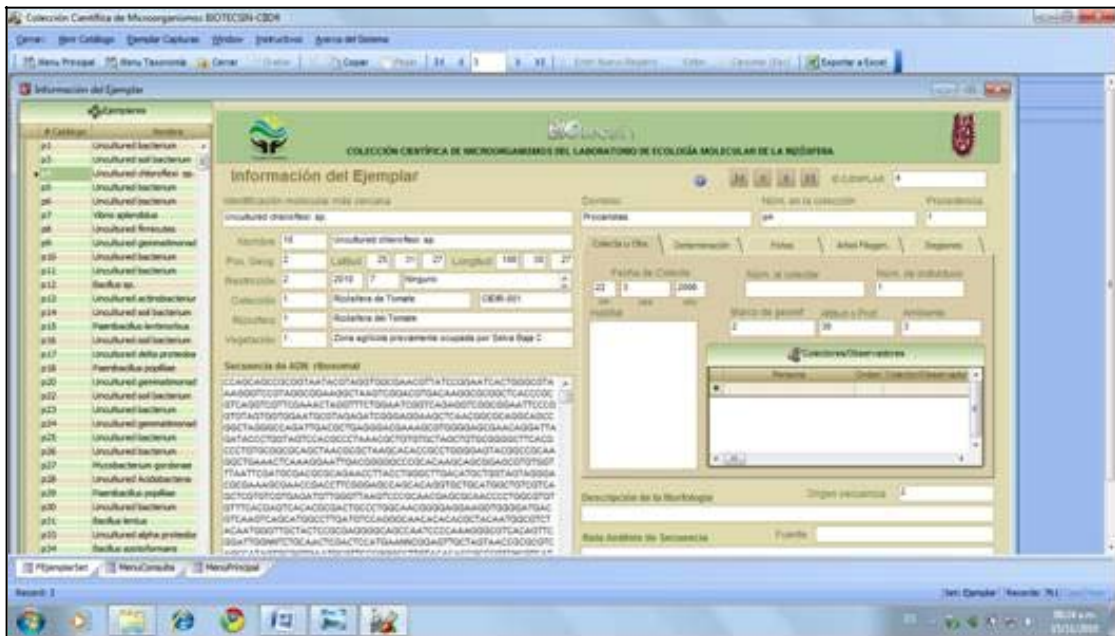


Figura 37. Captura de los ejemplares de las clonas de ADN ribosomal de la rizósfera de tomate en la base de datos.

7. DISCUSIÓN

7.1. Las colecciones científicas CIIDIR-001 y CIIDIR-004 son una herramienta adecuada para la conservación de microorganismos del suelo a largo plazo.

El presente trabajo representa la obtención de bancos de germoplasma de microorganismos aislados nativos del valle de Guasave, Sinaloa, formado en nuestro grupo de trabajo en el CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. El primero fue obtenido por Martínez-Álvarez (2003) y constaba de 234 muestras de hongos micorrízicos arbusculares (HMAs) que se tomaron a partir de un total de 75 muestras de suelos con distinto uso. Sin embargo, este banco no fue criopreservado y constaba de ejemplares vivos, los cuales fueron mantenidos en condiciones de refrigeración por lo que tuvieron un tiempo de vida corto.

Debido a lo anterior, uno de los objetivos del presente estudio consistió en la creación de un banco de germoplasma de microorganismos criopreservados para su conservación a largo plazo. El banco CIIDIR-001 fue elaborado al inicio del 2006 y consta de especímenes tanto de eucariotes como de procariotes provenientes de muestras de rizósfera de tomate (Cordero-Ramírez, 2008). En total, el banco está formado por 758 muestras, de las cuales se descongelaron a lo largo del trabajo un total de 254 (33.50%), y de éstas sólo 23 aislados (9.05%) no fueron viables. Este porcentaje es aceptable comparado a otros bancos similares reportados. Por ejemplo de un banco que estaba conformado por especímenes de importancia clínica (Pasarell *et al.*, 1992) se obtuvo de un total de 1447 muestras el 2.29% de organismos inviables. Aunque nuestro porcentaje de organismos no viables es mayor a este reporte, otros trabajos muestran niveles de inviabilidad del 7% (McGinnis *et al.*, 1974). Desafortunadamente, nuestros bancos han sufrido problemas con desperfectos en uno de los ultracongeladores donde hemos sufrido problemas de descongelación de una de sus copias y el porcentaje de su viabilidad ha bajado ligeramente (90%).

La metodología empleada en este trabajo permitió la obtención del banco de microorganismos de la rizósfera de toloache (CIIDIR-004) y del banco de clonas que permite un análisis más completo de la diversidad de la microbiota presente en la rizósfera de esta solanácea, el mantenimiento del banco de microorganismos a -70°C

con glicerol al 15%, permitirá mantener esta colección por un largo período de tiempo calculado en décadas (Díaz *et al.*, 1995). Ésta es una herramienta muy útil que nos permitirá la conservación de la microbiota nativa de suelos de la región asociada a solanáceas, la cual pudiera ser útil en futuros estudios. Las bacterias de la rizósfera pueden ser una fuente para el aislamiento de bacterias endofíticas con potencial de uso en aplicaciones biotecnológicas, teniendo muchas de estas bacterias el potencial de sintetizar compuestos químicos de importancia industrial, farmacéutica y en la agricultura seleccionando potenciales agentes de biocontrol de enfermedades de plantas de importancia económica (Marquez-Santacruz *et al.*, 2010).

En este trabajo para la rizósfera de Toloache se siguió la metodología descrita por Cordero-Ramírez (2008), tanto para la creación del banco de microorganismos, como para la creación del banco de clones de toloache López-Rivera (2011), por lo que esto permitió que el presente trabajo sea comparable con el realizado por Cordero-Ramírez, el cual se hizo con muestras de suelo de la rizósfera de una solanácea (tomate variedad Gabriela) en una zona de cultivo. Debido al manejo que se realiza en el suelo de esta zona, el suelo empleado ha sido perturbado y nosotros hipotetizamos que la diversidad de microorganismos ha sido afectada (Van Elsas *et al.*, 2002), por lo que la comparación de nuestro estudio, de la rizósfera de una solanácea de suelos conservados (toloache), con la de suelos perturbados (tomate) permitirá mostrar la diferencia en cuanto a la diversidad de microorganismos entre estas dos solanáceas en ambas zonas de conservación contrastante. Las muestras de rizósfera de toloache fueron tomadas en la misma etapa de desarrollo (fructificación/inicio de senescencia) en la que se tomaron las muestras de la rizósfera de tomate, el cual, es un determinante de la diversidad de microorganismos que se asocian a las plantas, debido a que el tipo y cantidad de exudados producidos por las plantas y los cuales permiten la asociación de los diferentes microorganismos del suelo con la raíz, está altamente determinada por la etapa fenológica de las plantas (revisado en Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009). Nuestro estudio también permitirá discernir cuáles de los microorganismos identificados se encuentran presentes en ambas zonas, así como cuales son las especies dominantes similares en ambas rizósferas, las cuales podrían jugar un papel importante en el ecosistema de la rizósfera de las solanáceas (Odum, 2001).

La metodología estandarizada en el presente estudio es útil para conservar las muestras por años y convenientemente sin necesidad de resiembras lo cual resulta muy económico. Aunado a esto, la metodología empleada pudiera ser utilizada para conservar muestras de otra naturaleza ya sean clínicas, médicas, agrícolas o industriales, pues no existe una correlación entre la falta de viabilidad y el género, especie o uso potencial del aislado.

7.2. TOMATE

7.2.1. Identificación de las especies en la biblioteca de ADN ribosomal de origen procariótico de la rizósfera de tomate.

El grupo más abundante dentro de la biblioteca de ADN ribosomal de origen procariótico fue el phylum Firmicutes, representando el 43% de todos los organismos secuenciados y analizados. La diversidad mostrada por este grupo fue también la más grande entre los phyla de origen procariótico ya que está representada por 25 diferentes especies, siendo los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* los más abundantes de este grupo en cuanto a diversidad se refiere. La identificación molecular a partir del ADN genómico extraído de los organismos purificados en el banco de germoplasma tanto de muestras seleccionadas al azar, como de las muestras que mostraron efecto antagonista a Forl sugiere que en la rizósfera de *Lycopersicon esculentum* muestreada, el género más abundante es *Bacillus*. Estos resultados difieren con los reportados por Kim *et al.* (2006) quienes reportan que en un análisis de rizósfera y raíces de tomate en Corea del Sur, el phylum más abundante fue Proteobacteria, cabe señalar que el número de clonas que ellos analizaron fue menor (68 clonas) que el analizado en este trabajo (445 clonas).

Diversos miembros del género *Bacillus* han sido reportados como antagonistas de fitopatógenos importantes (Nagórska *et al.*, 2007). Las especies identificadas en este estudio sugieren que pudieran tener gran aplicación en Sinaloa, pues ha sido probada su eficacia en el control de enfermedades de cultivos importantes para nuestro Estado como lo son el maíz, el tomate, el garbanzo y la papa, solo por mencionar algunos. Los diferentes miembros de éste género pueden promover el crecimiento vegetal (Preston *et al.*, 2004) o actuar como fitoprotectores (Nagórska *et al.*, 2007).

En este trabajo, 117 de 268 organismos identificados por homología en el Genbank pertenecen al phylum Firmicutes. Este phylum estuvo altamente representado tanto en el banco de germoplasma como en la biblioteca procariótica. Dentro del phylum Firmicutes se considera la clase Mollicutes en donde se localizan algunos organismos que causan enfermedades en plantas, como son los fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000). Se registró la presencia dentro de este phylum de una clona perteneciente al fitoplasma denominado: fitoplasma del brote de la caña de azúcar (por su nombre en inglés sugarcane grassy shoot phytoplasma). Estos fitopatógenos han cobrado una gran relevancia en nuestro Estado ya que en los últimos años se han detectado en algunos cultivos hortícolas incluyendo al tomate y constituyen un peligro para la producción de otra solanácea de importancia regional: la papa (Leyva *et al.*, 2002). Es posible pensar que su presencia en la muestra de ADN genómico obtenido del suelo pudiera estar asociada a la presencia dentro de nuestra muestra en restos de tejido vegetal infectados con este fitopatógeno.

El segundo grupo en importancia numérica es el phylum Acidobacteria, que representó el 17% de las clonas analizadas. Este grupo no mostró mucha diversidad de especies representando el grupo ya que solamente se encontraron dos especies, una acidobacteria con cuatro clonas y una acidobacteria no cultivable con 42 clonas las cuales juntas representan cerca del 18% del total de las muestras. Esta es una especie relativamente nueva y de la cual se sabe que tiene la capacidad de solubilizar ciertos nutrientes y hacerlos disponibles para las plantas, de ahí su importancia dentro de la rizósfera.

El tercer grupo más importante en cuanto a abundancia de especies (16 clonas) encontradas, fue el phylum Proteobacteria, dentro del cual destaca el orden Pseudomonadales, representado por la especie *Pseudomonas fluorescens*, la cual ya ha sido reportada con capacidad antagonica contra organismos como Forl (Kamilova *et al.*, 2006). Otras especies dentro de éste orden se comportan como fitopatógenos tales como *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas maltophilia* y también como patógenos de animales tales como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *B. pseudomallei* (Madigan *et al.*, 2006). Las especies del género *Pseudomonas* son ecológicamente muy significativas en el suelo y agua como organismos saprótrofos y probablemente son responsables de la degradación de muchos compuestos solubles que

se derivan de la ruptura monomérica de diversos compuestos poliméricos de plantas y animales en hábitats oxigenados (Madigan *et al.*, 2006).

Otro orden importante de este phylum es el de Rhizobiales dentro del cual se encuentra el género *Rhizobium*, las bacterias de éste género juegan un papel muy importante dentro de la rizósfera pues forman asociaciones con las raíces de las plantas para la fijación de nitrógeno el cual es aprovechado por las plantas (Renegel, 2002).

7.2.2. Identificación de las especies de ADN ribosomal en la biblioteca de origen eucariótico de rizósfera de tomate.

La biblioteca generada para ADN ribosomal de origen eucariótico permitió el análisis de 352 clonas con homología a otros organismos presentes en la base de datos del Genbank. Entre estos se identificaron tres grupos principales: Ascomycota, Basidiomycota y Chlorophyta, como se aprecia en el Cuadro 12.

El phylum Ascomycota además de ser el más abundante representando el 62.1% de las clonas, también fue el más diverso con 41 especies encontradas. Dentro de este phylum se encuentran dos de los géneros más abundantes encontrados en este estudio, *Alternaria* y *Emmonsia* con 87 y 31 clonas, respectivamente, los cuales se reportan en el Anexo 2.

Las enfermedades causadas por *Alternaria* se encuentran entre las más comunes de un gran número de plantas dentro de las que se incluyen el tomate. Afectan principalmente la parte aérea de las plantas incluyendo hojas, tallos, flores y frutos de plantas anuales, en particular de hortalizas. Dentro de las enfermedades más comunes ocasionadas por *Alternaria* se incluyen al tizón temprano de la papa y del tomate (Agrios, 2006).

Muchas de las especies de *Alternaria* son principalmente saprófitas, es decir, no pueden infectar a los tejidos vivos de las plantas y sólo se desarrollan sobre tejidos vegetales muertos o en proceso de descomposición y, a lo más sobre tejidos viejos o senescentes, como hojas y pétalos viejos y frutos maduros. Por lo que en muchas ocasiones surge la dificultad para decidir si un hongo del género *Alternaria* es la causa de la enfermedad o

un contaminante secundario (Agrios, 2006). Por lo anterior, la abundancia de organismos del género *Alternaria* pudo deberse a que el lote del cultivo, al momento de realizar el muestreo, estaba ya en etapa fisiológica de senescencia. Otro factor que pudo haber influido en la diversidad de las especies de *Alternaria* es que el campo muestreado había sido utilizado para la siembra de tomate de manera consecutiva por varios ciclos, por lo que no se descarta que estas especies detectadas en la rizósfera sean producto de una selección innata al monocultivo.

Otro género importante encontrado dentro de este phylum fue el de *Emmonsia*. Éste género está representado por dos especies *E. crescens* y *E. parva*. Estos hongos son los agentes causales de adiaspiromicosis, principal enfermedad respiratoria en ratones y en ocasiones en humanos (Peterson *et al.*, 1998).

Dentro de este phylum se encuentran también miembros del género *Cladosporium* el cual está representado por dos especies identificadas como *C. cladosporoides* y *C. oxysporum* con tres y 21 clonas de manera respectiva. *Cladosporium* es uno de los hongos imperfectos más comunes que producen principalmente síntomas foliares y de otro tipo en una amplia variedad de plantas hospedantes como el tomate. Una de estas enfermedades es la de la mancha foliar del tomate producida por *Cladosporium fulvum* (Agrios, 2006).

El segundo phylum de importancia en cuanto a la abundancia representando el 17.7% de las clonas, y tercero en cuanto a diversidad fue Chlorophyta, el cual estuvo representado por 62 clonas y seis especies. Éste phylum está representado por tres especies de algas pertenecientes al género *Scenedesmus*: *S. naegelii* con seis clonas, *S. obliquus* con una clona y *Scenedesmus* sp. con 52 clonas. El alto número de clonas pertenecientes a este phylum fue una sorpresa pues generalmente las poblaciones de algas son menores que las de bacterias y hongos (Pelczar, 1982).

La naturaleza fotosintética de los miembros de este género influye para que predominen en la superficie del suelo, o justamente debajo de la capa superficial, que fue la zona tomada en el muestreo el cual se realizó de 0 a 50 cm de profundidad. En un suelo pobre, la acumulación, crecimiento y actividad metabólica de las algas y bacterias iniciales facilitan el camino para el desarrollo de otras bacterias y hongos. Las algas

verde-azules juegan un papel clave en la transformación de rocas a tierra (Pelczar, 1982). El elevado número de clonas presentes en la biblioteca pudiera deberse a la proliferación de estos organismos en la superficie del suelo, el cual utilizaba un sistema de riego por goteo, asegurando una alta humedad en el suelo, lo cual, aunado a la alta irradiación solar de la región, pudo haber favorecido el crecimiento de estas poblaciones.

Basidiomycota fue el tercer phylum de importancia en cuanto a la abundancia representando el 11.4% de las clonas identificadas de la biblioteca y segundo en cuanto a diversidad con 18 especies distribuidas en 40 clonas. Dentro de este phylum la más abundante fue una ectomicorriza, ésta fue identificada como basidiomiceto micorrízico (Mycorrhizal basidiomycete) con 10 clonas.

Algunas de las clonas pertenecen a géneros que forman parte del grupo de microorganismos conocidos como ectomicorrizas, las cuales forman asociaciones simbióticas con árboles de importancia maderable. Entre éstos podemos mencionar a *Conocybe*, *Panaeolus* y *Coprinopsis*. Su presencia en la rizósfera pudiera estar relacionada con restos de tejido o estructuras de resistencia de los mismos microorganismos, aunque no podemos descartar que estas especies puedan interactuar con tomate. Cuando el Valle de Guasave presentaba vegetación endémica, estas especies probablemente estaban asociadas a otras especies de la vegetación de tipo selva baja caducifolia que era típica de nuestra región y quedar como remanentes en el suelo. De igual modo, su presencia puede ser explicada ya que las estructuras sexuales (basidiosporas) de los basidiocarpos formados por estas especies se dispersan por el aire y se depositan en otros sitios, por lo que pudieran haber estado en la zona superficial de donde se tomaron los suelos.

7.2.3. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate

De los aislados que conforman el banco de microorganismos de la rizósfera de tomate fueron 590 los identificados molecularmente, de un total de 610 secuencias obtenidas, de las cuales, 20 secuencias no presentaron homología con ningún organismo reportado en la base de datos del NCBI, el phylum más abundante fue el de los Firmicutes

(97.9%), y dentro de éste el género más abundante fue el género *Bacillus* representando el 87% de los aislados del banco de tomate. Estos resultados son discutidos en la sección 7.3.3 en conjunto con los datos de toloache.

7.3. TOLOACHE

7.3.1. Identificación de las especies en la biblioteca de ADN ribosomal de origen procariótico de la rizósfera de toloache.

El análisis de abundancia mediante un banco de clonas de ADN ribosomal amplificadas a partir de ADN genómico obtenido de la rizósfera de tomate y toloache, permitió un análisis más amplio de los microorganismos presentes en la rizósfera de toloache y tomate en zonas de condiciones de conservación contrastantes.

Dentro del banco de clonas de origen procariota de la rizósfera de toloache, se obtuvo que el phylum más abundante fue Actinobacteria con 27%, las cuales son bacterias Gram-positivas, anaeróbicas o microaerófilas, y reportadas como potenciales degradadores anaeróbicos de hidrocarburos de suelo (Hamamura *et al.*, 2006). En segundo lugar en abundancia fue el phylum Proteobacteria con un 20%, en el cual como se mencionó anteriormente dentro de éste se encuentran especies fijadoras de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2006), lo que lo hace un grupo de procariotas importante en la rizósfera para el desarrollo de las plantas. Además, este phylum se ha encontrado que es el más abundante en la superficie del fruto de tomate (Talias *et al.*, 2011). Otro de los phylum más abundante de la rizósfera de toloache fue el de Gemmatimonadetes con el 18%, miembros no cultivables de este phylum se han encontrado en múltiples hábitats terrestres y acuáticos y solo se ha descrito una especie dentro de este phylum: *Gemmatimonas aurantiacus*, la cual es una bacteria Gram-negativa, aeróbica heterótrofa (Zhang *et al.*, 2003). Algunas otras cepas han sido reportadas como aisladas pero aún no se han caracterizado. Su presencia está ligada a suelos áridos sugiriendo una adaptación de este grupo bacteriano a ambientes de poca humedad, por lo que un ambiente edáfico como el persistente en Sinaloa explicaría su elevada abundancia, misma que parece no estar relacionada al manejo del suelo, ya que en diferentes tipos de suelo incluyendo en

agricultura convencional, orgánica, sucesión temprana y media no existen diferencias en su abundancia (DeBruyn *et al.*, 2011).

Otros phyla con abundancias relevantes fueron Firmicutes con el 15% y Cyanobacteria con el 8%. La mayoría de las bacterias que conforman el phylum Firmicutes son Gram-negativas y producen endosporas que las hacen resistentes a muchos ambientes, dentro de éste los principales géneros representados en nuestra biblioteca de clonas fueron *Bacillus* y *Paenibacillus*, los cuales pueden encontrarse en numerosos hábitats y con nichos ecológicos muy diversos y se han reportado por poseer especies antagonistas de patógenos de plantas (Köberl *et al.*, 2011), lo que representa un papel de importancia para la defensa de las plantas contra fitopatógenos. El phylum Cyanobacteria, son bacterias de importancia relevante ya que son las únicas bacterias capaces de llevar a cabo la fotosíntesis y además son capaces de fijar nitrógeno, lo cual puede ser de importancia nutricional para las plantas de toloache proporcionando un aporte de nitrógeno y carbono y también son capaces de sobrevivir a ambientes hostiles (Herrero y Flores, 2008). Además se identificaron otros phyla pero en abundancia menor los cuales fueron: Chloroflexi, Planctomycetes, Bacteroidetes, Sphingobacteria y Acidobacteria.

Los géneros que se presentaron con mayor frecuencia dentro del banco de clonas de procariotas de la rizósfera de toloache fueron los géneros *Paenibacillus*, *Mycobacterium* y *Conexibacter*. Por otro lado, estudios realizados por Marquez-Santacruz *et al.* (2010), sobre la microbiota de rizósfera de tomatillo, en el que obtuvieron un banco de 122 clonas de rizósfera de tomatillo (*Physalis ixocarpa*), difiere con nuestros resultados, ya que los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* con un 26.84% y *Bacillus* con 14.64%.

Una curva de rarefacción permite simular el esfuerzo del muestreo y determinar si el número de secuencias de la muestra analizada es representativa de toda la diversidad del sitio muestreado. Con la curva de rarefacción de la muestra de secuencias obtenidas del banco de clonas procariota de la rizósfera de toloache, se pudo determinar que la muestra no representa completamente la diversidad del sitio muestreado. Esto podría deberse a que la diversidad de sitios como el suelo son ambientes muy complejos y diversos, por ejemplo, se calcula que en un gramo de suelo rizosférico pueden

encontrarse hasta 1×10^9 microorganismos, y un número mayor a las 4,000 especies de bacterias (Torsvik *et al.*, 1990; 1996). Por lo que se puede ver que en estudios hechos en ambientes complejos tales como el suelo, ambientes marinos y sedimentos la curva de rarefacción no alcanza la fase de “plateau” aún con un número de secuencias superior a las de este trabajo (Sogin *et al.*, 2006, Lasher *et al.*, 2009, Peressutti *et al.*, 2010). Sin embargo, el alto número de OTUs en secuencias únicas permite mostrar que la toma de las muestras de clonas fue adecuada, ya que el que estén presentes un alto número de OTUs o filotipos en este nivel donde las secuencias son 100% similares en cuanto a la composición de nucleótidos, indica que se tomaron clonas con productos de PCR en su mayoría distintos y que no fueron copias iguales del mismo producto de PCR.

7.3.2. Identificación de las especies de ADN ribosomal en la biblioteca de origen eucariótico de rizósfera de toloache.

En cuanto al banco de clonas eucariotas se obtuvo que el phylum más abundante fue Ascomycota representado con el 72% de las clonas identificadas, el phylum Ascomycota es un grupo muy numeroso de hongos y su principal característica es que sus esporas sexuales se forman dentro de estructuras con forma de sacos microscópicos llamados ascas. Dentro de este phylum se clasifican las levaduras, hongos unicelulares, heterótrofos y de pared celular rígida. Los miembros del phylum Ascomycota pueden representar un grupo importante de hongos para la rizósfera de toloache. Estos hongos juegan un papel muy importante en el ecosistema del suelo participando en el ciclo del nitrógeno y del carbono, ya que descomponen la materia orgánica, e incluye además hongos patógenos de plantas y animales. Las levaduras que se encuentran dentro de este grupo son de importancia industrial por los productos de la fermentación que llevan a cabo, participando además en los procesos naturales de fermentación en el suelo (Rogers, 2011).

El segundo phylum más abundante fue el Basidiomycota con el 14% de las clonas analizadas, los Basidiomycota presentan estructuras microscópicas llamadas basidios, los cuales son células especializadas en forma de mazo o bastón que dan origen a cuatro esporas externas llamadas basidiosporas (Cappello-García, 2006). Este grupo de hongos es abundante y diverso en la naturaleza e incluye hongos gelatinosos, de plataforma, setas, royas y carbones, estos dos últimos representan patógenos de plantas (Rogers,

2011), estos hongos deben representar un grupo importante en el ambiente del suelo de la rizósfera de las plantas de toloache ya que juegan un papel importante en el ciclo del carbono mediante la descomposición de la materia orgánica, lo que favorece la nutrición de las plantas, algunos miembros del phylum Basidiomycota forman ectomicorrizas, las cuales son asociaciones con las raíces de las plantas principalmente de especies arbóreas, las cuales facilitan a las plantas la obtención de nutrientes minerales del suelo (Smith y Read, 1997).

El tercer phylum en abundancia fue el Zygomycota con el 6% del total, dentro de este phylum se clasifican hongos que carecen de estructuras complejas de fructificación (James y O'Donnell, 2004), la mayoría son saprófitos, pero algunas especies son patógenos de plantas, animales y otros hongos, participan en el ciclo del carbono al igual que los phyla anteriores y tienen una gran variedad de interacciones en la naturaleza (White *et al.*, 2006), por lo que podrían tener diversos papeles importantes en la rizósfera de las plantas de toloache.

El cuarto phylum en abundancia en la biblioteca de clonas eucariotas de la rizósfera de toloache fue el Nematoda con el 5% de las clonas analizadas, los nematodos juegan un papel fundamental en el reciclaje de nutrientes en los ambientes naturales, existen además especies de este phylum que son parásitas de personas y plantas, siendo algunos causantes de importantes pérdidas en la agricultura (Barker *et al.*, 1994, Hotez *et al.*, 2005). Además, se encontraron otros tres phyla de menor abundancia dentro del banco de clonas de eucariotas de la rizósfera de toloache en la zona de la reserva de “La Uva” los cuales fueron: Ciliophora, Streptophyta y Protozoa con el 1% cada uno, los Ciliophora son protistas ciliados que se encuentran en ambientes donde hay agua incluyendo el ambiente del suelo; dentro del phylum Streptophyta se clasifican las plantas terrestres y las algas verdes no clorofitas; y por último el phylum Protozoa que incluye pequeños animales unicelulares.

Por otro lado el análisis de rarefacción de la muestra de eucariotas permitió determinar que la muestra aunque no es totalmente representativa de la diversidad del sitio muestreado representa una buena proporción de esta, por lo que la muestra fue tomada adecuadamente.

7.3.3. Identificación molecular de los especímenes del banco de germoplasma de tomate y toloache.

De los 884 aislados del banco de toloache identificados molecularmente la proporción de estos grupos fue también la mayoritaria Firmicutes representó el 89% y el género *Bacillus* el 75% de las clonas secuenciadas, la diferencia es que el grupo Proteobacteria mostró un porcentaje más abundante en esta rizósfera, cerca del 11% lo cual no se observó en el banco de tomate donde casi exclusivamente se obtienen miembros de los Firmicutes.

El que el phylum más abundante dentro de los dos bancos tanto el de toloache como el de tomate haya sido Firmicutes y el género *Bacillus* también fuera el más abundante se debe a que el medio utilizado para aislar estos organismos (LB) favorece en mayor medida el crecimiento rápido y preferencial de este grupo de organismos.

Sin embargo, los organismos identificados del banco de tomate y toloache son los cultivables y estos representan solo una pequeña porción del total de bacterias presentes en la rizósfera y no da una respuesta clara de los microorganismos presentes ya que se estima que tan solo el 1% de las bacterias presentes en el suelo pueden ser aislados en el laboratorio (Patrick *et al.*, 2005). Aún así nuestros resultados sugieren una mayor diversidad en los organismos cultivables de la rizósfera de toloache respecto a la del tomate, ya que ambas colecciones fueron generadas con el mismo medio de cultivo con resultados contrastantes en cuanto a la abundancia del grupo Proteobacteria, este phylum ha sido reportado como el más abundante en la superficie del fruto de tomate, siendo los géneros *Pantoea* y *Enterobacter* los más abundantes (Talias *et al.*, 2011), esto coincide en parte con lo encontrado en nuestro trabajo en cuanto a microorganismos cultivables en la rizósfera de toloache ya que estos dos géneros (*Pantoea* y *Enterobacter*), resultaron ser los más abundantes de los aislados del banco de rizósfera de toloache en la Uva con 23 aislados del género *Enterobacter* y 10 aislados del género *Pantoea*, esto podría indicar que estas especies tienen alguna función de importancia en las Solanaceas y que las bacterias presentes en la rizósfera podrían migrar a otra parte de las plantas como lo reportado por Marquez-Santacruz *et al.* (2010), donde ellos muestran que las bacterias del suelo pueden ser también

endofíticas y colonizar otros tejidos de las plantas. Por otro lado, estos géneros no pudieron ser aislados de la rizósfera de tomate, sin embargo, esto no indica que no pudieran estar presentes en esta, ya que el aislamiento de los microorganismos presentes en la rizósfera depende de diferentes factores tales como tipo de suelo, tipo de planta, variedad, edad de la planta, época del año de la colecta, etcétera.

Una razón por la que el género más abundante de las bacterias cultivables identificadas de los bancos sean del género *Bacillus* se puede deber a que, diversas especies de este género son ubicuos en el ambiente y forman endosporas, representando las células más resistentes y de más larga vida en el suelo (Nicholson *et al.*, 2000; Nicholson 2002, 2004; y revisado en Fajardo-Cavazos y Nicholson, 2006), por lo que pueden permanecer por largos períodos de tiempo incluso en suelos degradados.

El género *Bacillus* incluye microorganismos de gran importancia económica, médica y de bioprotección tales como bioplaguicidas, biocombustibles y agentes patógenos. *Bacillus thuringiensis* se utiliza actualmente para el control biológico de insectos en cultivos. Cepas de *B. subtilis* producen un amplio espectro de péptidos bioactivos con un gran potencial para aplicaciones en la biotecnología y medicina. Cepas de *B. cereus* son patógenos importantes de los mamíferos, incluyendo seres humanos. *Bacillus pumilus* es comúnmente aislado de una variedad de fuentes ambientales, en particular de las heces de los animales, tiene propiedades tóxicas que pueden estar relacionadas con incidentes de intoxicación alimentaria. *Bacillus megaterium* es una bacteria gram-positiva que se encuentra en hábitats muy diversos y ha sido empleada industrialmente ya que posee algunas enzimas muy útiles y una gran capacidad para la producción de exoenzimas (revisado en Porwal *et al.*, 2009).

El segundo phylum más abundante del banco de toloache es el de Proteobacteria, en éste se encuentran algunas especies fijadoras de nitrógeno (Madigan *et al.*, 2006).

El phylum Actinobacteria presente en los organismos identificados del banco de toloache y toloache, se compone de bacterias gram-positivas con alto contenido de G + C en su ADN, este phylum tiene diversos estilos de vida y éstos incluyen patógenos dentro de los cuales se pueden mencionar a especies del género *Mycobacterium*; así como las bacterias de suelo, comensales de plantas y del tranco gastrointestinal y

simbiontes fijadores de nitrógeno. Las especies del phylum Actinobacteria están ampliamente distribuidas en los ecosistemas terrestres y acuáticos, especialmente en el suelo, donde juegan un papel crucial en el reciclaje de los biomateriales y la formación de humus (Ventura *et al.*, 2007).

Otro de los aislados de los bancos se identificó como *Sphingobacterium spiritivorum* que pertenece al phylum Bacteroidetes, el cual ha sido reportado como un patógeno de humanos (Kämpfer *et al.*, 2005).

7.4. Análisis comparativo de la diversidad de las rizósferas de toloache y tomate

En el análisis comparativo de la diversidad de organismos procariotas de la rizósfera de tomate y toloache, mediante el análisis de un banco de clonas de ADNr se determinó que existen diferencias entre la diversidad de ambas rizósferas. En cuanto al análisis a nivel de phyla procariotas, se pudo observar que en la rizósfera de tomate la abundancia del phylum Firmicutes (45%) supera con mucho a los otros phyla. Por otro lado, para la rizósfera de toloache el phylum más abundante fue Actinobacteria (27%), sin embargo se encuentra representado de manera más equitativa junto con otros phyla como lo son Proteobacteria (20%), Gemmatimonadetes (18%) y Firmicutes (15%), lo que era de esperarse, no sólo porque se trata de dos especies de solanáceas que aunque relacionadas son distintas: tomate y toloache, sino también porque la muestra de tomate fue tomada en un área de cultivo, lo que supone que en esta zona impactada por el manejo agrícola intensivo se muestre una alteración en la diversidad de la microbiota del suelo. Las prácticas de manejo que se realizan del suelo y el empleo de monocultivos aún cuando sean en rotaciones de cultivos de diferentes especies tales como gramíneas-solanáceas-leguminosas favorecen solo a algunos grupos mejor adaptados que son los que predominan en la rizósfera (Sun *et al.*, 2004). En el caso de la rizósfera del tomate dentro del phylum Firmicutes el género más abundante fue *Paenibacillus* y en segundo lugar dentro del phylum Proteobacteria el género *Pseudomonas*, esto se podría explicar ya que existen reportes de que estos dos géneros de bacterias son los más predominantes en suelos perturbados (Garbeva *et al.*, 2006). Los datos de la rizósfera del tomate sugieren que Firmicutes es el phylum mejor favorecido en un suelo perturbado (agrícola), comparado al panorama que se presenta

en cuanto a la frecuencia más diversa y equitativa de otros phyla en la muestra de un suelo conservado como es el caso de la rizósfera de toloache. Por otro lado, se ha reportado en un estudio reciente que los grupos de bacterias más abundantes en suelo, rizósfera y tejido de la raíz de plantas de tomate, son las pertenecientes al phylum *Proteobacteria* (α -, β - y γ -), y el grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB), dentro del cual el género *Flavobacterium* se reporta como el más abundante de este grupo (Kim *et al.*, 2006). Este estudio fue realizado en tomate variedad Gabriela en suelos de Guasave, México, y es posible que las diferencias a nivel de variedad de tomate, edad en la que se colectó la muestra de rizósfera y en las condiciones climatológicas y edáficas comparadas a las nuestras permitan explicar estas diferencias.

El phylum Actinobacteria que fue el más abundante para la rizósfera de toloache incluye bacterias Gram-positivas, aeróbicas o microaerófilas, frecuentemente encontradas en suelo, las cuales juegan un papel muy importante en éste con actividad celulolítica y quitinolítica actuando como descomponedores de materia orgánica, y ayudando a renovar las reservas de nutrientes en la tierra y en la formación de humus. Se ha reportado que se pueden encontrar en etapas finales de la sucesión del suelo (Shrestha *et al.*, 2007). Otro factor a considerar es que en tomate se tiene un monocultivo con apenas algunas malezas creciendo alrededor de las plantas las cuales son eliminadas periódicamente en el ciclo de cultivo y son poco frecuentes, mientras que en las muestras de suelo conservado de toloache existe la presencia no única de raíces de toloache sino que estas muestras frecuentemente contienen entrelazadas al sistema radical de toloache múltiples raíces provenientes de otras especies y aún cuando para el muestreo se eliminaron este otro tipo de raíces éstas también pueden influir en la conformación de la microbiota de la rizósfera aledaña al toloache. La zona de “La Uva” es poco perturbada lo que hace que exista la renovación de nutrientes entre las especies vegetales y microbianas presentes de una manera fluida. También se ha reportado que al aumentar con la profundidad del suelo, y que en condiciones aeróbicas y microaeróbicas los miembros del grupo de las Actinobacterias pueden ser capaces de degradar hidrocarburos en muchos suelos, lo que podría representar un papel muy importante para la biorremediación de suelos contaminados. Estos organismos se encuentran en diversos tipos de suelos muy agrestes, incluyendo suelos alpinos y polares (revisado en Björklöf *et al.*, 2009).

Un grupo interesante encontrado con abundancia importante entre ambas rizósferas fue el phylum Gemmatimonadetes, el cual ha sido detectado con frecuencia en este tipo de análisis de encuestas de ADN ribosomal, y se ha reportado como uno de los principales nueve phyla encontrados en ecosistemas del suelo, y comprende en promedio el 2% de las comunidades bacterianas del suelo. Los miembros de este phylum son de distribución cosmopolita, sin embargo, se han encontrado con mayor frecuencia en suelos áridos lo que indica una adaptación a suelos secos debido a su relación inversa a la humedad, lo que tiene relación con nuestro trabajo ya que se encontró con abundancia en nuestro análisis el cual fue realizado en suelos de ambientes semiáridos, además de que su presencia en entornos con concentraciones de nutrientes muy diversas, han sugerido que tienen metabolismos versátiles que han contribuido a su éxito como un grupo cosmopolita (DeBruyn *et al.*, 2011). De cualquier manera es muy interesante encontrar a este phylum en ambas rizósferas tanto de toloache como de tomate a tan elevadas proporciones (>15%).

En cuanto al análisis comparativo de los phyla eucariotas entre ambas rizósferas de ecosistemas contrastantes resultó que el phylum más abundante fue el Ascomycota, encontrándose muy por encima en cuanto a la abundancia de los demás phyla en ambas rizósferas. Para la rizósfera de toloache en la zona de reserva este phylum representó el 72% de las clonas analizadas y para la rizósfera de tomate en la zona de cultivo intensivo representó el 59%. Esto se puede explicar debido a que los Ascomycota representan el phylum eucariota más abundante en la naturaleza, y ha sido reportado como el phylum más diverso de hongos contabilizándose aproximadamente el 65% de todas las especies de hongos que se conocen en él (Kavanagh, 2011), cifras parecidas a las encontradas en nuestro trabajo. Sin embargo, nuestro trabajo incluye además hongos no descritos y organismos eucariotas de otros reinos como lo es Animalia, Protozoa y Viridiplantae. Otro phylum abundante en ambas rizósferas fue el Basidiomycota, siendo el segundo en abundancia para la rizósfera de toloache con el 14% de las clonas analizadas y el tercero para la rizósfera de tomate con el 12% de las clonas analizadas, de este phylum se ha reportado que representa el 35% de todas las especies de hongos que se conocen, estos phyla puede ser fácilmente reconocido en los ecosistemas ya que son los que producen setas (Kavanagh, 2011). Los phyla Chlorophyta y Chytridiomycota fueron encontrados únicamente en la rizósfera de tomate y no en la de toloache, el phylum Chlorophyta son algas verdes y Chytridiomycota son hongos

primitivos principalmente acuáticos, probablemente el que no se hayan encontrado en la rizósfera de toloache puede deberse a la época en la que se tomaron las muestras, ya que fue en otoño y en esta temporada existe poca humedad. Además, de que las muestras se tomaron de la rizósfera de plantas de toloache en etapa fenológica de madurez-senescencia lo que también podría indicar una baja humedad en la rizósfera de las plantas muestreadas, y por otro lado éstas se pudieron haber encontrado en la rizósfera de tomate muestreadas debido a que éstas se tomaron de cultivos agrícolas donde se utiliza el sistema de riego por goteo lo que provoca una alta humedad constante en la zona de la rizósfera de las plantas. Por otro lado, el phylum Zygomycota difirió en la abundancia entre ambas rizósferas, siendo más abundante en la rizósfera de toloache, mientras que la abundancia de los phyla Nematoda, Ciliophora y Streptophyta fue similar entre ambas rizósferas.

El análisis de rarefacción entre varias muestras permite comparar la diversidad de muestras de tamaños diferentes. La curva de rarefacción para las cuatro muestras analizadas: de los bancos de clonas procariotas de toloache y tomate, y de los bancos de clonas eucariotas de toloache y tomate, muestran en base a la tendencia de las curvas, que la muestra de eucariotas tanto de la rizósfera de toloache como la de tomate son menos diversas con respecto a las de procariotas tanto de toloache como de tomate. Mientras que la muestra de procariotas de la rizósfera de toloache resultó ser más diversa que la muestra de procariotas de tomate, esto era lo que se esperaba ya que las muestras de rizósfera de toloache son de suelos conservados y las de tomate son de suelos agrícolas fuertemente impactados por el manejo de agricultura intensivo que reciben. Nuestros resultados sugieren que los suelos preservados suelen ser más diversos que los suelos agrícolas altamente impactados en cuanto a microbiota procariota, ya que las prácticas agrícolas de manejo intensivo y monocultivo impacta y afecta a las comunidades bacterianas del suelo, corroborando observaciones previas (Sun *et al.*, 2004). Por otro lado, la diversidad de la microbiota eucariota resultó ser muy similar entre las rizósferas de ambas especies de solanáceas muestreadas en suelos con condiciones contrastantes, esto probablemente pueda ser debido a que la diversidad a nivel de organismos más complejos como los eucariotas no cambia de manera tan radical entre miembros del mismo grupo taxonómico.

El análisis de conjuntos a nivel género entre ambas rizósferas mostró que existe un número menor de géneros encontrados en ambas rizósferas en relación a los que son específicos a cada una de las rizósferas. Los géneros encontrados en ambas rizósferas tanto procariotas como eucariotas, podrían jugar un papel importante en la rizósfera de las plantas de la familia Solanaceae, y podrían tener utilidad en cuanto a la biotecnología para el mejoramiento en el manejo sustentable de solanáceas de importancia agrícola. Sin embargo, un número mayor de géneros fueron encontrados de manera exclusiva en cada una de las rizósferas, es decir que no coinciden en ambas rizósferas de suelos contrastantes, diferencias en la composición de las comunidades microbianas de diferentes especies ya han sido reportadas anteriormente (Park *et al.*, 2005; Miethling *et al.*, 2000; Grayston *et al.*, 1998; Germida *et al.*, 1998). LA razón por la que se observa esto podría deberse a las diferencias en la cantidad y composición de los exudados de las raíces, ya que existen reportes que indican que los exudados de las raíces son ampliamente responsables en el control de las poblaciones de la rizósfera, así como el efecto que pueden tener sobre estas comunidades varía entre diferentes especies de plantas y tipo de suelo (Marschner *et al.*, 2001; Whipps, 1990).

El índice de diversidad de Shannon permitió determinar que la diversidad de la microbiota de procariotas de la rizósfera de toloache es mayor en cuanto a la diversidad de organismos procariotas de la rizósfera de tomate y la diversidad de eucariotas de ambas rizósferas. El segundo lugar en diversidad lo presentó la microbiota procariota de la rizósfera de tomate, siendo la diversidad de la microbiota eucariota de ambas rizósferas las más bajas y muy similares entre si, esto coincide con el análisis de rarefacción realizado en este trabajo para comparar la diversidad de procariotas y eucariotas entre ambas rizósferas. Los valores de índices de nuestro trabajo son parecidos a los reportados en estudios de suelos agrícolas con diferentes sistemas de manejo agrícola (Hartmann y Widme, 2006).

7.5. Incorporación de los datos de la rizósfera de tomate y toloache en la base de datos

La incorporación de los datos obtenidos de la microbiota de la rizósfera de toloache y los de tomate a una base de datos públicas como lo es el de la CONABIO, permitirá un mejor manejo y difusión de la información generada, así como será una herramienta

muy útil para llevar a cabo la consulta de los análisis de diversidad, frecuencia y abundancia de los organismos identificados y la comparación entre la microbiota de la rizósfera de toloache y tomate reportadas en el presente trabajo de tesis.

8. CONCLUSIONES

- La metodología empleada permitió la obtención de un banco de microorganismos aislados y criopreservados de la rizósfera de toloache y tomate con ~95% de viabilidad, así como la generación de dos bancos de clonas de ADN_r de origen procariota y eucariota para el estudio de la diversidad de la rizósfera de esta solanácea.
- En el análisis de los organismos del banco de tomate y toloache, el phylum más abundante fue Firmicutes y en segundo lugar Proteobacteria, esto se debe probablemente a que el medio nutritivo (LB) usado para el aislamiento de los aislados del banco favorece el aislamiento de estos grupos.
- El análisis de la diversidad de procariotas de la rizósfera de tomate y toloache permitió ver diferencias entre los phyla de organismos más abundantes entre ambas rizósferas. Sin embargo, el phylum eucariota más abundante (Ascomycota) fue el mismo tanto para la rizósfera de toloache como para la de tomate y los organismos procariotas de la rizósfera de toloache de una zona de suelo preservada es más diversa que los organismos procariotas de la rizósfera de tomate de una zona de suelo agrícola, mientras que la diversidad de eucariotas de ambas rizósferas resultaron ser menos diversas comparadas a procariotas y muy parecidas entre sí.
- Los datos de los organismos identificados han sido ya incorporados a la base de datos, incluyendo los datos del banco de clonas de la rizósfera de tomate (datos generados por Cordero-Ramírez, 2008) y los datos de los organismos cultivables preservados del banco de tomate, los cuales ya han sido enviados a la CONABIO para su revisión y posterior incorporación en el sistema de bases de datos. Se continuará en una etapa subsecuente al presente trabajo de tesis con la incorporación de los datos que se obtendrán de la rizósfera de toloache, con una fecha probable de liberación de la base datos del 2013.

- De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a todos los análisis realizados, podemos concluir que la hipótesis planteada se acepta ya que si existen diferencias en la diversidad de ambas rizósferas (tomate y toloache) en los suelos contrastantes, y la diversidad en cuanto a organismos procariotas resultó ser mayor en la rizósfera de toloache de la zona preservada de “La Uva” que la de la rizósfera de tomate en la zona de cultivo, sin embargo, el índice de diversidad de Shannon y la curva de rarefacción no muestran mucha diferencia entre la diversidad de organismos eucariotas entre ambas rizósferas.

9. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. 2006. Fitopatología. Editorial Limusa, S.A de CV. México, D.F. p. 838.
- Alvarez-Ruiz, P., Jimenez, C. G., Leyva-López, N. E. & Méndez-Lozano, J. 2007. First report of tomato chlorosis virus infecting tomato crops in Sinaloa, Mexico. *Plant Pathology* 56:1043.
- Apodaca-Sánchez, M.A., Zavaleta-Mejía, E., García-Espinoza, R., Osada, K.S. et al., 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis lycopersici* W.R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 22, 7–13.
- Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M., Sklarz, M., Angel, R., Ungar, E. y Gillor, O. 2010. Soil Microbial Abundance and Diversity Along a Low Precipitation Gradient. *Microbial Ecology*. 60:453–461.
- Barea, J. M., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. 2004. Mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria. In: Varma A, Abbott L, Werner D, Hampp, R. eds. *Plant surface microbiology*. Heidelberg, Germany. Springer-Verlag. 351-371.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56:1761-1778.
- Barker, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R., Bird, G. W., Dunn, R. A., Ferris, H., Ferris, V. R., Freckman, D. W., Gabriel, C. J., Grewal, P. S., MacGuidwin, A. E., Ribble, D. L., Roberts, P. A. y Schmitt, D. P. 1994. Plant and soil nematodes: Societal impact and focus for the future. *The Journal of Nematology*. 26:127–137.
- Benhamou, N., Lafontaine, P. J., & Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants treated with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444.
- Björklöf, K., Karlsson, S., Frostegård, A. y Jørgensen, K. S. 2009. Presence of Actinobacterial and Fungal Communities in Clean and Petroleum Hydrocarbon Contaminated Subsurface Soil. *The Open Microbiology Journal*. 3:75-86.
- Brown, J. K. & Idris, A. M. 2006. Introduction of the exotic monopartite Tomato yellow leaf curl virus into West Coast Mexico. *Plant Disease* 90:1360.
- Buckley, D. H. y Schmidt, T. M. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agroecosystems. *Environmental Microbiology*. 5:441-452.
- Bueno, M., Cordero-Ramírez J. D. y Maldonado-Mendoza I.E. 2011. Software de automatización del proceso BLAST-N empleando placas de formato de 96 secuencias. En preparación.
- Cappello-García, S. 2006. Hongos del Yumka'. Primera edición, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tabasco. Pp. 111.
- Cardon, Z. G. y Whitbeck, J. L. 2007. *The Rhizosphere An Ecological Perspective*. Primera edición. Academic Press. USA. Pp. 212.
- Cifuentes-Lemus, J. L. y Gaxiola-López, J. 2002. Atlas de la Biodiversidad de Sinaloa. Primera Edición. El Colegio de Sinaloa. México. P. 442.
- Claus, H. & Filip, Z. 1988. Degradation and transformation of aquatic humic substances by laccase-producing fungi *Cladosporium cladosporioides* and *Polyporus versicolor*. *Acta Hydrochimica and Hidrobiologica* 26:180-185.
- Cordero-Ramírez, 2008. Aislamiento e identificación molecular de microorganismos de la rizósfera de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con uso potencial para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.
- Cordero-Ramírez, J. D., López-Rivera, R., Calderón Vásquez C. L., Figueroa-López, A. M., Martínez-Álvarez, J. C., Leyva-Madrigal K. Y., Cervantes-Gámez, R. G. y Maldonado-Mendoza, I. E. 2012. Microorganismos asociados a la rizósfera de jitomate en un agroecosistema del Valle de Guasave, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 83: 712-730.

- DeBruyn, J. M., Nixon, L. T., Fawaz, M. N., Jhonson, A. M. y Rodosevich, M., 2011. Global Biogeography and Quantitative Seasonal Dynamics of Gemmatimonadetes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 6295-6300.
- Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I., Alonso-Urmeneta, B., Aragón, V., Bengoachea, J.A., García-Jalón, I., Irigoyen, A., Leiva, J., Marrodán, T., Martínez de Tejada, G., Oteiza, M.C., Romero, I. Rubio, M., Velasco, J. y Vitas, A. 1995. *Manual Práctico de Microbiología*. Primera impresión. Masson, S.A. Barcelona, España. Pp. 200.
- Doran, J. W. y Zeiss, M.R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*. 15:3-11.
- Fajardo-Cavazos, P. y Nicholson, W. 2006. *Bacillus* Endospores Isolated from Granite: Close Molecular Relationships to Globally Distributed *Bacillus* spp. From Endolithic and Extreme Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 2856-2863.
- Felsenstein, J. 2009. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fierer, N. y Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 626-631.
- Garbeva, P., Postma, J., Van Veen, J. A. y Van Alsacia, J. D. 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology*. 8:233-46.
- Germida, J.J., Siciliano, S. D., de Freitas, J. R. y Seib, A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with fieldgrown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbial Ecology*. 26: 43-50.
- Grayston, S.J., Wang, S., Campbell, C. D. y Edwards, A. C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. 30: 369-378.
- H. Ayuntamiento de Guasave; Gobierno del Estado de Sinaloa; Secretaría de Desarrollo Social, Medio Ambiente y Pesca; Subsecretaría de Desarrollo Urbano y Ecológico; Dirección de Recursos Naturales y Medio Ambiente. 1998. "La Uva" Cofradía de Tamazula, Guasave. Zona de Preservación Ecológica de Centro de Población. Sinaloa.
- Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. y Sessitsch, A. 2004. Comparison of Diversities and Compositions of Bacterial Populations Inhabiting Natural Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 5057-5065.
- Hamamura N, Olson S. H., Ward D. M., Inskip W. P. 2006. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 6316-24.
- Hartmann, M. y Widme, F. 2006. Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:7804.
- Hartman, W. H. Richardson J. C. Vilgalys, R. y Bruland, G. L. 2008. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:17842-17847.
- Hawkes, J. G., Lester, R. N. y Skelding, A. D. 1979. *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London.
- Herrero A. y Flores E. 2008. *The Cyanobacteria, Molecular Biology, Genetics and Evolution*. Primera edición. Editorial Caister Academic Press. Norfolk, UK. Pp. 474
- Higgins D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- Hotez, P., Bethony, J., Brooker, S. y Albonico, M., 2005. Eliminating neglected diseases in Africa. *Lancet*. 365:2089.
- James, T. Y. y O'Donnell, K., 2004. Zygomycota. Microscopic 'Pin' or 'Sugar' Molds. Version 21. Diciembre.

- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N. et al., 2006. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1121–1126.
- Kämpfer, P., Engelhart, S., Rolke, M y Sennekamp, J. 2005. Extrinsic Allergic Alveolitis (Hypersensitivity Pneumonitis) Caused by *Sphingobacterium spiritivorum* from the Water Reservoir of a Steam Iron. *Journal of Clinical Microbiology.* 43: 4908–4910.
- Kavanagh, K., 2011. *Fungi Biology and Applications*. Segunda Edicion, editorial Wiley. USA.
- Kibblewhite, M. G., Ritz, K. y Swift, M. J. 2008. Soil health in agricultural systems. *Transacciones filosóficas de la Sociedad Real B: Ciencias Biológicas.* 363: 685-701.
- Kim, J. S., R., Dungan, R. S., Kwon S. W. y Weon, H. Y. 2006. The community composition of root-associated bacteria of the tomato plant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 22:1267-1273.
- Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E.M. y Berg, G. 2011. Desert Farming Benefits from Microbial Potential in Arid Soils and Promotes Diversity and Plant Health. *PLoS ONE.* 6: 10.1371.
- Lasher, C., Dyszynski, G., Everett, K., Edmonds, J., Ye, W., Sheldon, W., Wang, S., Joye, S. B., Moran, A. M. y Whitman, W. B. 2009. The Diverse Bacterial Community in Intertidal, Anaerobic Sediments at Sapelo Island, Georgia. *Microbial Ecology.* 58:244–261.
- Lee, I. M., Davis, R. E. & Gundersen, R. D. E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54:221-255.
- Leyva-López., N. E., Ochoa, S., J. C., Leal, K. D. S., & Martínez, S., J. P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48:287-299.
- López-Rivera, R. 2011. Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: *Solanum lycopersicum*, L. y *Datura* spp. (tomate y toloache). Tesis de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.Guasave, Sinaloa.
- Macias-Rodriguez, N. A. 2003. Comparación de métodos moleculares con tradicionales en el diagnóstico de Salmonella y Shigella en frutos de tomate. Tesis de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.Guasave, Sinaloa. p. 11.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 2006. *Biología de los Microorganismos*. Decima edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España. Pp. 986.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Ayora-Talavera, T. y Loyola-Vargas, V.M. 1992. Tropane alkaloid production in root cultures of *Datura stramonium*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 28:67-72.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Galindo-Flores, H. y López-Meyer, M. 2009. An introduction to metagenomics. En: *Molecular Biotechnology*. Eds. Ashok K.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Velazquez-Sepulveda, I. y Santoyo, G. 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in rhizosphere. *Genetics and Molecular Research.* 9: 2372-2380.
- Marilley, L. y Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology.* 13:127–136.
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R. y Crowley, D. E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry.* 33: 1437-1445.
- Martínez-Álvarez, J. C. 1998. Selección de cepas de *Pseudomonas fluorescens* con potencial de biocontrol hacia *Sclerotium rolfsii* en rizósfera de tomate. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México, pp. 78.
- Martínez-Álvarez, J. C. 2003. Identificación molecular de hongos micorrízicos arbusculares en el municipio de Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa.

- Martínez, M. y Matuda, E. 1979. Flora del estado de México. Edo de México. pp. 473-476.
- McCraig, A. E., Glover, A. y Prosser, J. I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:4554-4559.
- McGinnis, M. R., Padhye, A. A. & Ajello, L. 1974. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts, and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. *Applied Microbiology* 28:218-222.
- Miethling, R., Weiland, G., Backhaus, H. y Tebbe, C. C. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L 33. *Microbial Ecology*. 40:43-56.
- Molina, L. A., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M. C., García, J. M., Wyke, L. y Ramos, J. L. 2000. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. 32:315-321.
- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol.1. Zaragoza, 84 pp.
- Morgan, A. W., Bending, G. D. y White, P. J. 2005a. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56:1729-1739.
- Nagórska, K., Bikowski, M. & Obuchowski, M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54:495-508.
- Nee, M. 1986. Flora de Veracruz. Solanaceae I. INIREB, Xalapa, pp. 1-191.
- Neefs, J. M., Van P. Y., Hendriks L. y Wachter R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 18:2237-2330.
- Nehl, D. B., Allen, S. J. y Brown, J. F. 1997. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*. 5:1-20.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. y Setlow, P. 2000. Resistance of bacterial endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:548-572.
- Nicholson, W. L. 2002. Roles of *Bacillus* spores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:410-416.
- Nicholson, W. L. 2004. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores, p. 1-15. en E. Ricca, A. O. Henriques, and S. M. Cutting (ed.), *Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications*. Horizon Scientific Press, Norfolk, Reino Unido.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo J. M. & Vilgalys, R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5544-5550.
- O'Donell, A. G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I. & Davies, J. T. 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil* 232:135-145.
- Odum, E. P. 2001. *Ecología*. Tercera edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. P. 639.
- Oliveros-Bastidas, A. J., Macías, F. A., Carrera Fernández, C., Marín, D. y Molinillo, J. M. G. 2009. Root exudates and their relevance to the allelopathic interaction. *Química Nova*. 23:198-213.
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J. y Pace, N. R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology*. 40: 337-355.
- Orduño-Vega, W. L. 2008. Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares de suelos de La Zona de Preservación Ecológica del Centro de Población "La Uva" y el establecimiento de cultivos monospóricos para su conservación. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Los Mochis.
- Park, M. S., Jung, S. R., Lee, M. S., Kim, K. O., Do, J. O., Lee, K. H., Kim, S. B. y Bae, K. S. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *The Journal of Microbiology*. 43:219-227.

- Pasarell, L. & McGinnis, M. R. 1992. Viability of fungal cultures maintained at -70°C. *Journal of Clinical Microbiology* 30:1000-1004.
- Patrick, D., Schloss, P. D., y Handelsman, J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biology*. 6:229
- Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276:734-740.
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. & Chan, E. C. S. 1982. *Microbiología*. Cuarta edición (segunda en español). Editorial McGraw Hill. México, D.F. pp.636-637.
- Pérez-Arellanes, W. L. 2010. Análisis molecular de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) nativos de Sinaloa asociados a la rizósfera de toloache (*Datura stramonium*). Tesis de licenciatura en Biología. Universidad de Occidente.
- Peressutti S. R., Costagliola, M., Artigas, L. F. y Hozbor, C. 2010. Estudio comparativo de la estructura del bacterioplancton en aguas del Mar Argentino mediante el método de pirosecuenciación 454 tag. *Revista Argentina de Microbiología*. 42:288-297.
- Peterson, S. W. & Sigler, L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, ethiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 30:2918-2925.
- Porwal, S., Lal, S., Cheema, S. y Kalia, V. C. 2009. Phylogeny in Aid of the Present and Novel Microbial Lineages: Diversity in *Bacillus*. *PLoS ONE* 4: e4438.
- Preston, G. M. 2004. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Phylosophical Transactions of The Royal Society* 359:907-918.
- Rappé, M. S. y Giovannoni, S. J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*. 57:369-394.
- Ramírez-Villapudua, J. & Sáinz, R. R. A. 2006. Manejo integrado de las enfermedades del tomate. Once Ríos Editores. Culiacan, Sinaloa.
- Renegel, Z. 2002. Breeding for better symbiosis. *Plant and Soil* 245:147-162.
- Rivera-Soto, F. R. 2007. Detección y caracterización molecular de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* asociadas con mancha bacteriana de cultivos de tomate en Sinaloa. Tesis de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. CIIDIR-Unidad Sinaloa.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22:238-45.
- Rogers, K., 2011. *Fungi, algae, and protists*. Primera edición, editorial Britannica Educational Publishing. New York.
- Schauenberg, P y Paris, F. 1979. *Guía de las plantas medicinales*. 3rd Ed. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, pp. 43-44.
- Shrestha, P.M., Noll, M. y Liesack, W. 2007. Phylogenetic identity, growthresponse time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession. *Environmental Microbiology*. 9: 2464-74.
- SIAP, 2013. Página consultada en noviembre 2013. www.siap.sagarpa.gob.mx
- Singh, B. K., Millard P., Whiteley, A. S. y Murell J. C. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends in Microbiology*. 12:386-393.
- Smit, E., Leeftang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., y Wernars, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2284-2291.
- Smith, S. E. y Read, D. J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Segunda edición, Academic Press. San Diego, USA. Pp. 605.

- Smith, K. P., Handelsman, J. & Goodman, R. M. 1999. Genetic basis in plants for interactions with disease. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4786-4790.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, M. Hartmann, J. R., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn D. J., y Weder. C. F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:7537-41.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Welch, D. M., Huse, S. M., Neal, P. R., Arrieta, J. M., y Herndl, G. J., 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 103:12115–12120.
- Soo, P. M., Ra, J. S., Sook, L. M., Ok, K. K., Ok, D. J., Hyun, L. K., Bum, K. S. y Sook, B. K., 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *calystegia soldanella* and *elymus mollis*. *The Journal of Microbiology*. p. 219-227.
- Sun, H. Y., Deng, S. P. y Raun, W. R., 2004. Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:5868–5874.
- Talias, A., White, J. R., Pahl, D. M., Ottesen, A. R. y Walsh, C. S., 2011. Bacterial community diversity and variation in spray water sources and the tomato fruit surface. *BMC Microbiology*. 11:81.
- Tesfaye, M., Dufault, N. S., Dornbusch, M. R., Allan, D. L., Vance, C. P. y Samac, D. 2003. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. *Soil biology and Biochemistry*. 35:52-65.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. y Daae, F. L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 56:782-787.
- Torsvik, V., Sorheim, R. y Goksoyr, J. 1996 . Total Bacterial Diversity in Soil and Sediment Communities: A Review. *Journal of Industrial Microbiology*. 17:170–178.
- Van Elsas, J. D., Garbeva, P. y Salles, J. 2002. Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*. 13: 29–40.
- Vandamme, P., Goris, J., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Kersters, K., De Vos, P. y Falsen, E. 1999. Assignment of Centers for Disease Control group IVc-2 to the genus *Ralstonia* as *Ralstonia paucula* sp. no. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 663-469.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K.F y van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 71: 495–548.
- Visentin, I. Tamietti, G. Valentino, D. Portis, E. Karlovsky, P. Morreti, A. y Cardinale, F. 2009. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research*. Doi: 10.1016.
- Waldrop, M. P. y Firestone, M. K. 2006. Response of microbial community composition and function to soil climate change. *Microbial Ecology*. 52:716-724.
- Whipps, J. M. 1990. Carbon economy. In: Lynch, J. M. (ed.). *The Rhizosphere*. Wiley & Sons Ltd. John Essex, UK. pp. 59-97.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafero, M. J., Tanabe, Y. y Sugiyama, J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*. 98:872-84.
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T.J. y Fox, G.E. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*. 6:143-51.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*. 51:221-227.
- Wright, S. F. & Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198:97-107.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. y Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53:1155-1163.

9.1. Páginas electrónicas consultadas

BIBLIOTECA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana. www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx

Fundación Produce Sinaloa A.C. www.fps.org.mx

Mothur. <http://www.mothur.org>

National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov

10. ANEXOS

ANEXO 1

Abundancia absoluta de las especies encontradas en la biblioteca de origen procariótico.

Organismos procariotes identificados	No. de clonas
Acidobacteria	4
Uncultured Acidobacteria	42
Micromonospora echinospora	1
Mycobacterium avium	1
Mycobacterium gordonae	4
Mycobacterium interjectum	1
Mycobacterium tuberculosis	1
Patulibacter minatonensis	9
Solirubrobacter sp.	2
Uncultured actinobacterium	5
Flavobacterium sp.	1
Uncultured Bacteroidetes	15
Uncultured Chloroflexi	2
Leptolyngbya sp.	1
Nostoc sp.	1
Oscillatoria sp.	1
Uncultured cyanobacterium	6
Bacillus amyloliquefaciens	1
Bacillus azotoformans	3
Bacillus lentus	2
Bacillus licheniformis	2
Bacillus psychrosaccharolyticus	3
Bacillus pumilus	1
Bacillus sp.	7
Bacillus subtilis	6
Brevibacillus sp.	1
Carnobacterium sp.	1
Enterococcus avium	2
Halobacillus kuroshimensis	2
Lentibacillus salinarum	1
Paenibacillus alginolyticus	2
Paenibacillus chondroitinus	9
Paenibacillus fujiensis	6
Paenibacillus larvae	3
Paenibacillus lentimorbus	1
Paenibacillus polymyxa	1
Paenibacillus popilliae	9
Paenibacillus sp.	33
Sugarcane grassy shoot phytoplasma	9
Uncultured Bacillus sp.	2
Uncultured eubacterium	1
Uncultured Firmicutes	3
Virgibacillus marismortui	5
Virgibacillus sp.	1
Uncultured Gemmatimonadales	23
Agrobacterium vitis	2
Anaeromyxobacter dehalogenans	2
Archangium gephyra	1
Caulobacter crescentus	1

Hyalangium minutum	1
Ochrobactrum cytis	1
Pseudomonas fluorescens	1
Sphingosinicella microcystinivorans	1
Uncultured alpha proteobacterium	2
Uncultured delta proteobacterium	10
Uncultured gamma proteobacterium	1
Uncultured Myxococcales bacterium	5
Uncultured Paenibacillus sp.	1
Uncultured proteobacterium	1
Vibrio splendidus	1
S.aurantiaca	1
<hr/> Total	<hr/> 269

Continuación del Anexo 1. Abundancia relativa de las especies encontradas en la biblioteca de origen procariótico.

ANEXO 2

Abundancia absoluta de las especies encontradas en la biblioteca de origen eucariótico.

Organismo eucariótico identificado	No. clonas
<i>Absidia corymbifera</i> strain IP 1280.81	1
<i>Acremonium strictum</i>	11
<i>Acrobeloides</i> sp. 288AcrII	3
<i>Alternaria alternata</i>	22
<i>Alternaria arborenses</i>	3
<i>Alternaria gaisen</i> strain EGS90-0512	1
<i>Alternaria longipes</i>	8
<i>Alternaria longissima</i> isolate 6.3	2
<i>Alternaria mali</i>	8
<i>Alternaria</i> sp.	28
<i>Alternaria tenuissima</i>	15
<i>Aporospora terricola</i>	7
<i>Ascomycete</i> sp. Dzf7	1
<i>Ascomycete</i> sp. nasa59	2
<i>Aspergillus tamaris</i>	1
<i>Atriplex centralasiatica</i>	2
<i>Atriplex lentiformis</i>	1
<i>Berkleasium</i> sp. BCC 17003	6
<i>Cephalosporium curtipes</i> var. <i>uredinicola</i>	1
<i>Chaetomium globosum</i> isolate Cg6	1
<i>Chaetomium</i> sp. Isolate 6/97-38	1
<i>Cheilymenia stercorea</i> isolate AFTOL-ID 148	2
<i>Chrysosporium lobatum</i>	1
<i>Chrysosporium pilosum</i>	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3
<i>Cladosporium oxysporum</i>	21
<i>Cochliobolus lunatus</i>	1
<i>Conocybe crispa</i> specimen-voucher E:G137	3
<i>Conocybe rickenii</i> specimen-voucher Hessler 20421	3
<i>Coprinopsis cinerea</i>	1
<i>Cortinarius fulvocitrinus</i> TUB 011434	1
<i>Cortinarius olearioides</i> voucher Arangu-Cort-03103002	3
<i>Corynascus verrucosus</i> sp. nov.	1
<i>Cryptococcus magnus</i> isolate YNC2.7-120506	1
<i>Cyrtomyces citrina</i>	1
<i>Dunaliella</i> sp. BSF3	1
<i>Echinochloa colona</i>	1
<i>Emericella corrugata</i>	1
<i>Emericella dentata</i> strain: IFM 42024	4
<i>Emericella nidulans</i> strain NRRL 2395	1
<i>Emmonsia crescens</i> strain UAMH 132	1
<i>Emmonsia parva</i>	30
<i>Entandrophragma cylindricum</i> microsatellite DNA, clone pEcCIR247	4
<i>Eurotium chevalieri</i> strain NRRL 78	1
Fungal endophyte isolate 3323	1
Fungal endophyte sp. DF3	11
Fungal endophyte sp. DF4	1

Fungal sp. aurim1166	1
Fungal sp. DQY-9	1
Fungal sp. GD27b	1
Fungal sp. WD30d	1
Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici strain ATCC 52429	1
Fusarium sp. Dzf1	1
Fusarium sp. E033	1
Fusarium sp. TA-60	1
Gymnopilus junonius	1
Gymnopus sp.	1
Halteria grandinella	1
Hohenbuehelia portegna strain T-7	1
Hohenbuehelia tremula isolate AFTOL-ID 1503	3
Humicola fuscoatra strain DSM 63302	3
Leptosphaeria senegalensis strain IP 1766.88	1
Leucosporidium scottii strain CBS 5932	1
Mortierella sp. GD20E	1
Mycorrhizal basidiomycete of Epipogium roseum isolate:ME2-1	10
Nectria mauritiicola strain CBS 313.72T	2
NINGUNA HOMOLOGIA	4
Oedogonium tenerum	1
Olpidium brassicae genes isolate:CH-1	1
Oxytricha longigranulosa	1
Paecilomyces sp.	2
Panaeolus cambodginiensis	1
Panaeolus sphinctrinus isolate AFTOL-ID 1499	2
Paracoccidioides brasiliensis	14
Paramecium tetraurelia macronuclear X gene	1
Phoma medicaginis	1
Prunus necrotic ringspot virus mRNA for coat protein (CP gene) from Kullu, India	1
Pseudochlorella pyrenoidosa strain SAG 18.95	1
Rhizophlyctis rosea isolate AFTOL-ID #43	1
Rhizopus oryzae strain UWFP 846	1
Rhodotorula glutinis strain HB 1212	1
Rhodotorula ingeniosa strain CBS 4240	1
Rhodotorula sp. CBS 10104	3
Scenedesmus naegelii strain UTEX 74	6
Scenedesmus obliquus isolate Tow 9/21 P-1W	1
Scenedesmus sp. isolate Pic 6/16 T-1W	52
Stegelletta sp. JB075	1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma partial 16S rRNA gene, isolate BV2	1
Uncultured AMF fungus	1

Continuación Anexo 2. Abundancia relativa de las especies encontradas en la biblioteca de origen eucariótico

Uncultured ascomycete clone LM82	2
Uncultured basidiomycete clone LM539	1
Uncultured basidiomycete isolate dfmo0726_096	2
Uncultured Cladosporium fc-02	2
Uncultured fungus clone RFLP57	1
Uncultured fungus isolate EC7.1	1
Uncultured Glomus clone T1P1.07	1
Uncultured Lophiostomataceae clone bg10d	1
Uncultured Pezizomycotina clone D44	1
Uncultured soil fungus clone 174-52	1
Uncultured soil fungus isolate OTU-ZY20	1
Uncultured soil fungus clone F39 (S2)	7
Uncultured soil fungus clone F47 (S2)	15
Uncultured soil fungus clone ITS11 (S2)	2
Zeldia punctata voucher JB040	4
Zeldia sp. JB118	5

TOTAL **441**

Continuación Anexo 2. Abundancia relativa de las especies encontradas en la biblioteca de origen eucariótico