

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Título:

Aislamiento y caracterización molecular de rizobacterias de gobernadora (*Larrea tridentata*)

Por:

José Eduardo Mata Ramírez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Septiembre 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**Aislamiento y caracterización molecular de rizobacterias de
gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Presenta:

JOSÉ EDUARDO MATA RAMÍREZ

TESIS

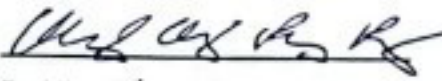
Que somete a la consideración del H. Jurado examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

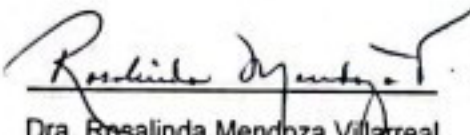
Aprobada por:




Dra. Sonia Noemi Ramirez Barrón
Presidente



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Vocal




Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Vocal



Dra. Lihua Wei
Vocal





M.C. Sergio Sánchez Martín
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México
Septiembre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**Aislamiento y caracterización molecular de rizobacterias de
gobernadora (*Larrea tridentata*)**

Presenta:

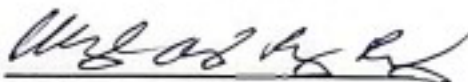
JOSÉ EDUARDO MATA RAMÍREZ

TESIS

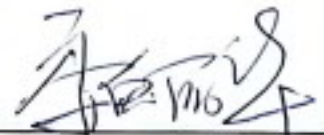
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

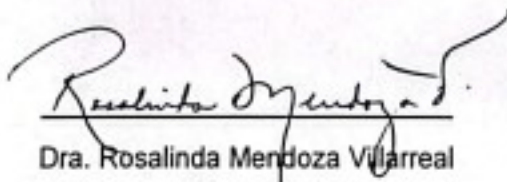
Aprobada por:



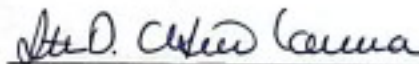
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Co-Asesor



Dra. Iveth Dalila Antonio Carmona
Co-Asesor

Saltillo, Coahuila, México
Septiembre, 2025

Agradecimientos

A Dios, por permitirme llegar hasta este punto de mi vida con salud y acompañado de mis seres queridos.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por haberme brindado el espacio para formarme académica y personalmente. Gracias por ser mi casa durante estos años y por tantas experiencias, aprendizajes y recuerdos.

A mis padres, José Mata Ríos y Raquel Ramírez Delgado, por enseñarme con su ejemplo lo que significa la constancia y el trabajo duro, por su amor incondicional, por motivarme siempre a seguir adelante y por nunca dejarme solo. Gracias por todo lo que han hecho por mí. Este logro es de ustedes también.

A mis hermanos, Lucero y Axel y a mis sobrinos, Estrella, Ángel y Kenia, quienes, sin saberlo, me inspiran a ser una mejor persona y un ejemplo para ellos.

Al Dr. Miguel Angel Pérez, por su orientación y paciencia durante este proyecto, por su tiempo, sus enseñanzas y su confianza.

A la Dra. Silvia Yudith Martínez Amador, por haber sido mi tutora durante este proceso, su guía y sus enseñanzas.

A Daniela Asencio, Angelica Alonso, Valeriano Carrillo y a todos mis compañeros de laboratorio, por estar siempre dispuestos a ayudarme, por compartir este camino conmigo, por su apoyo, sus ideas y por todas las horas de trabajo que pasamos juntos.

También a todos mis compañeros y amigos de clase, Ximena, Marisol, Vanesa, Valeria, Toño quienes con su compañía hicieron este proceso mucho más llevadero, lleno de buenos momentos y risas.

A mis amigos, Azalea, Dayana, Fernanda, Fany, Mariana, Monse y Chema por estar presentes en los buenos y malos momentos, por las risas y los consejos.

Gracias a todas esas personas que, de alguna o de otra forma, formaron parte de este camino.

Dedicatoria

A mis padres, hermanos y sobrinos, por su amor incondicional, por darme razones para seguir adelante, por ser mi ejemplo, mi inspiración diaria y mi mayor motivación.

A mis amigos, por acompañarme en cada etapa y recordarme que no estoy solo.

A quienes han creído en mí, incluso en los momentos en los que yo no lo hacía.

Índice

Agradecimientos	2
Dedicatoria.....	5
I. Resumen.....	11
II. Introducción	12
2.1. Justificación.....	13
2.2. Objetivos	13
2.2.1. Objetivo general.....	13
2.2.2. Objetivos específicos	13
III. Antecedentes	14
3.1. Endófitas	14
3.1.1. Importancia de las endófitas en las plantas	14
3.1.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	15
3.1.3. Endófitas comunes	17
3.1.4. Endófitas en la agricultura	23
3.2. Caracterización molecular de microorganismos.....	26
3.2.1. Regiones hipervariables del gen ARNr 16S.....	26
3.2.2. Caracterización molecular por 16S ribosomal	28
3.3. Caracterización morfológica y microbiológica	29
3.3.1. Aspectos por considerar en la caracterización morfológica	30
3.3.2. Medios de cultivo comunes para el aislamiento de microorganismos	31
3.4. <i>Larrea Tridentata</i>	34
3.4.1. Revisión de aspectos botánicos	34
3.4.2. Distribución geográfica e importancia ecológica.....	35

3.4.3. Propiedades funcionales y aplicaciones	36
3.5. Estudios relacionados	37
IV. Materiales y métodos	39
4.1. Colecta de las muestras	39
4.2. Transporte y conservación de las muestras	40
4.3. Preparación de medios de cultivo	40
4.4. Preparación de muestras	41
4.5. Selección de colonias.....	42
4.6. Criopreservación de bacterias.....	43
4.7. Extracción de ADN (Hot Shot).....	43
4.8. Amplificación de los fragmentos 16S (PCR).....	44
4.9. Secuenciación	46
4.10. Análisis de las secuencias.....	46
V. Resultados y discusión	48
5.1. Aislamiento de bacterias endófitas	48
5.2. Caracterización morfológica	49
5.3. Amplificación del gen 16S ARNr.....	50
5.4. Caracterización molecular	51
VI. Conclusión.....	55
Referencias.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Interacciones benéficas de planta-microorganismo.	14
Figura 2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> formando nódulos.	19
Figura 3. Cultivo de <i>Enterobacter cloacae</i>	19
Figura 4. Cultivo de <i>Bacillus cereus</i>	20
Figura 5. Cultivo de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	20
Figura 6. Cultivo de <i>Rhizobium radiobacter</i>	21
Figura 7. Cultivo de <i>Herbaspirillum huttiense</i>	21
Figura 8. Síntomas de la “mancha de fuego”; enfermedad causada por <i>Erwinia amylovora</i>	22
Figura 9. Cultivo de <i>Xanthomonas campestris</i>	22
Figura 10. Producto de RhizoVital formulado con <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24
Figura 11. Producto de Nodulaid más conocido en Australia.	25
Figura 12. Producto de MycoApply® con hongos micorrizicos corpusculares.	25
Figura 13. Producto de Azotobacterin; fertilizante microbiano fijado con nitrógeno.	26
Figura 14. Organización de las regiones hipervariables y conservadas del gen 16S rRNA.	28
Figura 15. Morfología de colonias bacterianas.	31
Figura 16. Arbusto de <i>Larrea tridentata</i>	34
Figura 17. Rama de <i>Larrea tridentata</i> con brotes florales.	35
Figura 18. Mapa de distribución natural de <i>Larrea tridentata</i> en el norte de México y el oeste de Estados Unidos.	36
Figura 19. Esquema general de la metodología.	39
Figura 20. Mapa que indica la zona de la recolección de la muestra de <i>Larrea tridentata</i>	40
Figura 21. Preparación de medio R2A.	41
Figura 22. Preparación de medio TSA.	41
Figura 23. Aislamiento y dilución de bacterias endófitas a partir de raíces.	42
Figura 24. Cripreservación de bacterias.	43
Figura 25. Extracción de ADN.	44

Figura 26. Amplificación y secuenciación del ADN.	46
Figura 27. SnapGene.....	46
Figura 28. MAFFT.	47
Figura 29. EMBOSS Cons.	47
Figura 30. BLASTn.....	47
Figura 31. Crecimiento bacteriano en medio de cultivo R2A y TSA.	48
Figura 32. Gel de electroforesis de productos de PCR.	50
Figura 33. Electroferograma con regiones de alta calidad.	51
Figura 34. Electroferograma con regiones de baja calidad.	51

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes para la mezcla de PCR con Gotaq® green master mix.	44
Tabla 2. Programa de PCR utilizado para amplificar el gen ARNr 16S.	45
Tabla 3. Crecimiento bacteriano en medio R2A y TSA.	48
Tabla 4. Resultados de la caracterización morfológica de las colonias bacterianas.	49
Tabla 5. Resultados del BLAST de las secuencias del gen 16S ARNr de los aislamientos bacterianos.	52

I. Resumen

Las bacterias endófitas desempeñan un papel fundamental en la promoción del crecimiento vegetal y en la adaptación de plantas a condiciones de estrés, o que las convierte en una herramienta prometedora para la agricultura sustentable. En esta investigación se aislaron y caracterizaron bacterias endófitas asociadas a *Larrea tridentata* mediante técnicas microbiológicas convencionales y herramientas moleculares como la amplificación del gen 16S ARNr con los iniciadores 27F y 1429R, alineamiento de secuencias, generación de secuencias consenso y análisis mediante BLASTn.

Se seleccionaron diez colonias con morfologías distintas, obtenidas en medio de cultivo R2A y TSA, y se identificaron géneros como *Bacillus*, *Metabacillus*, *Peribacillus*, *Streptomyces* y *Paenibacillus*. Estas bacterias han sido reportadas por su capacidad para solubilizar fosfatos, producir siderofóros, fijar nitrógeno, sintetizar ACC desaminasa y generar compuestos antimicrobianos. Estas características refuerzan su potencial como biofertilizantes o agentes de control biológico.

Los resultados permitieron conservar las colonias en cultivo puro con la posibilidad de realizar evaluaciones funcionales en plantas y explorar su aplicación como bioinoculantes. Esta investigación contribuye al conocimiento de la diversidad microbiana local y su potencial uso en estrategias agrícolas ecológicas.

Palabras clave: Bacterias endófitas, *Larrea tridentata*, aislamiento bacteriano, caracterización molecular, gen 16S ARNr, agricultura sustentable.

II. Introducción

En los últimos años, la agricultura sostenible ha cobrado gran relevancia ante la necesidad de reducir el uso de agroquímicos y mitigar el impacto ambiental generado por los modelos agrícolas convencionales. Los microorganismos benéficos asociados a plantas han sido objeto de múltiples investigaciones, especialmente aquellos que promueven el crecimiento vegetal, mejoran la absorción de nutrientes y contribuyen al control biológico de patógenos (Kumar et al., 2016).

Entre estos microorganismos, las bacterias endófitas representan una alternativa prometedora debido a su capacidad para establecer relaciones simbióticas o mutualistas dentro de los tejidos vegetales sin dañar al hospedero. Diversos estudios han demostrado que este tipo de bacterias puede desempeñar funciones clave como la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la fijación de nitrógeno y la síntesis de compuestos antimicrobianos, lo que las hace valiosas para su aplicación en biofertilizantes, bioestimulantes o agentes de biocontrol (Gopalakrishnan et al., 2012).

Gran parte del conocimiento actual sobre bacterias endófitas se ha generado a partir de cultivos comerciales o plantas de interés agrícola. Son pocos los estudios enfocados en la microbiota asociada a plantas nativas de zonas áridas, a pesar de que estas especies suelen establecer relaciones con microorganismos bien adaptados a condiciones de estrés hídrico, baja fertilidad del suelo y altas temperaturas. Un ejemplo de ello es *Larrea tridentata*, comúnmente conocida como gobernadora que se encuentra ampliamente distribuida en el norte de México y adaptada a climas extremos (Hunter et al., 2001).

Para estudiar a fondo la diversidad de bacterias endófitas, es fundamental combinar técnicas microbiológicas clásicas con herramientas moleculares modernas. El aislamiento en medios de cultivo específicos sigue siendo clave para recuperar bacterias viables en condiciones controladas, permitiendo su caracterización morfológica y preservación para futuros estudios funcionales (Madigan et al., 1997).

Se ha demostrado que el análisis del gen 16S ARNr es una herramienta confiable para la identificación bacteriana, ya que este gen contiene regiones conservadas útiles para el diseño de iniciadores universales y regiones hipervariables que permiten diferenciar entre géneros y especies (Clarridge, 2004). La integración de métodos bioinformáticos como el alineamiento de secuencias y su comparación con bases de datos públicas, como NCBI, ha facilitado un enfoque más preciso en la identificación de microorganismos (Ortiz-Estrada et al., 2017).

2.1. Justificación

Estudiar las bacterias endófitas asociadas a *L. tridentata* no solo permite conocer parte de la biodiversidad microbiana presente en esta especie, sino que también abre la posibilidad de identificar cepas con potencial agrobiotecnológico. Además, trabajar con cultivos nativos de la región representa una estrategia para desarrollar soluciones locales, con mayor adaptabilidad a los suelos y condiciones climáticas de zonas semiáridas como Saltillo, Coahuila.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Aislar e identificar bacterias endófitas asociadas a raíces de *Larrea tridentata* mediante herramientas microbiológicas y moleculares.

2.2.2. Objetivos específicos

- Realizar el aislamiento de bacterias endófitas a partir de raíces de *Larrea tridentata* mediante técnicas de cultivo.
- Caracterizar morfológicamente las colonias bacterianas seleccionadas.
- Amplificar y secuenciar el gen 16S ARNr para la identificación molecular de las cepas.
- Analizar el potencial biotecnológico de las bacterias identificadas.

III. Antecedentes

3.1. Endófitas

Las bacterias endófitas son microorganismos, que habitan en el interior de los tejidos vegetales sin causarles daño (**Figura 1**). Estas desarrollan una interacción simbiótica beneficiosa para la planta, desempeñando funciones esenciales como promover su crecimiento, protegerla contra patógenos y degradar contaminantes en la rizosfera (Pérez & Chamorro, 2013). Son una fuente importante de compuestos bioactivos con potencial agrícola, médico e industrial (Ryan et al., 2008).

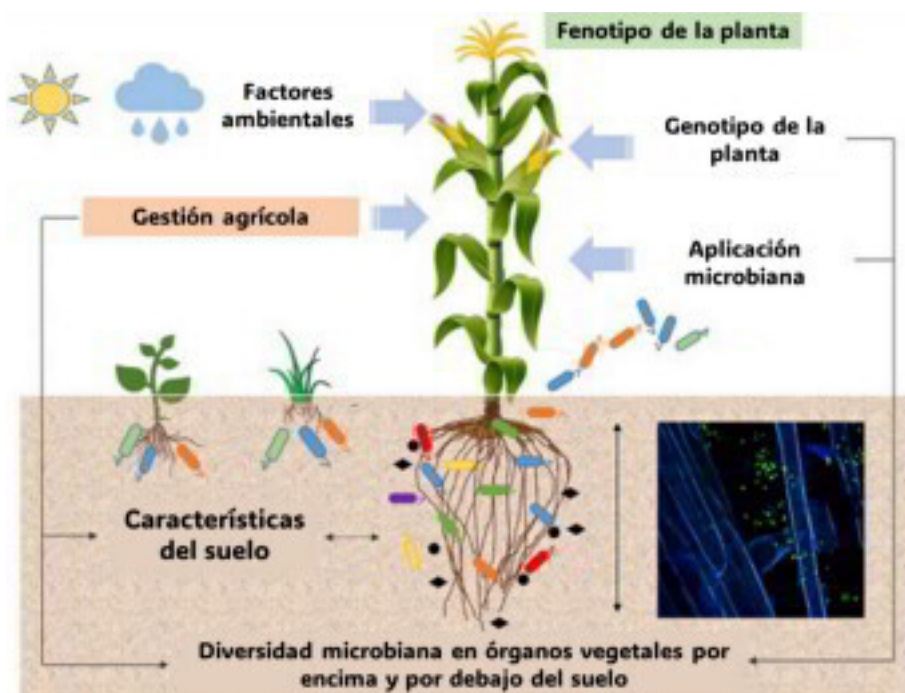


Figura 1. Interacciones benéficas de planta-microorganismo. Tomada y editada de (Nie et al., 2021).

3.1.1. Importancia de las endófitas en las plantas

Los microorganismos endófitos benefician a las plantas mediante mecanismos como el antagonismo, la resistencia sistémica inducida (RSI) y adquirida (RSA), la promoción del crecimiento vegetal y la adaptación al estrés ambiental; la interacción entre la planta y las bacterias endófitas refleja una coevolución

influenciada por factores como el genotipo de la planta, su etapa de desarrollo, estado fisiológico y tipo de tejido (Sánchez-Bautista et al., 2018).

Las comunidades microbianas asociadas a las raíces son determinantes para la salud de las plantas, superando en relevancia a las comunidades externas de la rizosfera. Estas endófitas contribuyen a la protección contra plagas, enfermedades y condiciones adversas del entorno (Backman & Sikora, 2008).

Estas bacterias pueden colonizar casi todas las plantas y, aunque generalmente provienen de la rizosfera, algunas especies se transmiten por semillas. Su capacidad para solubilizar fosfato y fijar nitrógeno también mejora la fertilidad del suelo. Estas características les otorgan un gran potencial en la fitorremediación y la producción sostenible de biomasa y biocombustibles (Ryan et al., 2008). Las bacterias endófitas pueden aumentar la tolerancia de las plantas a factores abióticos como la salinidad y la sequía y algunas poblaciones específicas permiten a las plantas sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Sánchez-Bautista et al., 2018).

3.1.2. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Entre los mecanismos utilizados para fomentar el crecimiento vegetal están la producción de fitohormonas (auxinas, citoquininas y giberelinas), la actividad de la enzima ACC desaminasa para mitigar el estrés, la fijación de nitrógeno y la movilización de nutrientes como el Fósforo. Además, inducen defensas naturales y producen sustancias antagonistas contra patógenos (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011).

3.1.2.1. Producción de fitohormonas

La producción de fitohormonas por parte de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPR) es uno de los mecanismos biológicos más relevantes para la mejora del desarrollo de las plantas. Las fitohormonas, como las auxinas, citoquininas y giberelinas desempeñan funciones clave en la regulación de procesos fisiológicos esenciales, como la elongación y división celular, así como la diferenciación de tejidos (Spaepen et al., 2007).

La biosíntesis de auxinas, particularmente del ácido indolacético (AIA) ocurre mediante rutas metabólicas derivadas del triptófano, como la vía del índol-3-piruvato (IPA). En cuanto a las citoquininas, estas derivan de nucleótidos como el isopentil adenosín monofosfato (iPAMP), mientras que las giberelinas se generan a través de la ruta del ácido mevalónico (Wani et al., 2007).

Géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* han demostrado una destacada capacidad para sintetizar estas fitohormonas, promoviendo directamente el desarrollo vegetal. Dentro de estos géneros *Azospirillum* y *Bacillus* se distinguen por su naturaleza endófito, permitiendo una interacción más íntima con los tejidos internos de las plantas hospederas (Santoyo et al., 2016).

3.1.2.2. Actividad de ACC desaminasa

La enzima ACC desaminasa representa un mecanismo crucial en la mitigación del estrés abiótico en las plantas. Esta enzima degrada el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que es un precursor inmediato del etileno, una hormona relacionada con respuestas de estrés en las plantas. Al reducir los niveles de etileno, los microorganismos ayudan a las plantas a tolerar condiciones adversas, como sequías, alta salinidad y contaminación por metales pesados (Glick, 2014).

El proceso catalizado por la ACC desaminasa convierte el ACC en α -cetobutirato y amoníaco, lo que no solo disminuye el etileno, sino que también proporciona metabolitos beneficiosos para las bacterias. Entre los géneros bacterianos que destacan por esta actividad se encuentran *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia* y *Bacillus* (Glick et al., 1998). De estos, *Burkholderia* y *Bacillus* son reconocidos por su capacidad endófito, permitiendo interacciones directas dentro de los tejidos vegetales y mejorando su capacidad de adaptación.

3.1.2.3. Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso exclusivo de ciertos microorganismos que convierte el nitrógeno atmosférico en amoníaco y de esta manera pueda estar disponible para la absorción por las plantas. Este mecanismo

es fundamental en suelos pobres de nitrógeno y contribuye significativamente a la sostenibilidad agrícola (Taiz et al., 2015).

La nitrogenasa, es un complejo enzimático sensible al oxígeno y es responsable de catalizar la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco. Para evitar la inhibición por oxígeno, los microorganismos producen leghemoglobina en simbiosis con plantas leguminosas. Los géneros bacterianos clave en este proceso son *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Frankia* y *Klebsiella*. *Rhizobium* y *Azospirillum* pueden acutar como endófitos.

3.1.2.4. Movilización de fósforo

El fósforo es esencial para el crecimiento de las plantas, pero su disponibilidad en el suelo suele estar limitada, debido a su fijación en formas insolubles. Los microorganismos solubilizadores de fósforo desempeñan un papel crucial al liberar este elemento en formas disponibles mediante la producción de ácidos orgánicos, tales como el ácido cítrico y el ácido glucónico, así como enzimas como fosfatasas y fitasas. Entre los géneros más relevantes en la solubilización de fósforo se encuentran *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Rodríguez & Fraga, 1999).

3.1.2.5. Inducción de defensas naturales y producción de sustancias antagonistas

Los microorganismos también pueden estimular las defensas naturales de las plantas a través de la activación de rutas de señalización como las del ácido salicílico y el ácido jasmónico. Estas rutas promueven la síntesis de compuestos fenólicos y proteínas de defensa. Además, algunos microorganismos generan metabolitos secundarios con actividad microbiana, como sideróforos antibióticos y enzimas líticas, que inhiben directamente a los patógenos vegetales (Pieterse et al., 2014).

3.1.3. Endófitas comunes

Los endófitos más comunes son comensales, con funciones aún no determinadas en las plantas. Los menos frecuentes son mutualistas o

antagónicos. (Vera Loo et al., 2018). Las Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacterias y Bacteroides han sido ampliamente estudiadas, mientras que aún no se han encontrado arqueas como endófitas internas (Reinhold-Hurek & Hurek, 2011). En cuanto a hongos, los endófitos más conocidos incluyen especies clavicipitáceas y microbios mutualistas adaptados a distintos ambientes (Backman & Sikora, 2008).

Algunos microorganismos patógenos humanos como *Salmonella sp.* pueden comportarse como endófitos, representando un riesgo sanitario debido a su resistencia a los métodos convencionales de desinfección. Por ello, es crucial evaluar el impacto de introducir estas bacterias en sistemas agrícolas para prevenir problemas de salud pública (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Los géneros más estudiados de microorganismos endófitos incluyen *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia* y *Xanthomonas*, los cuales destacan por su diversidad y potencial en interacciones benéficas con las plantas (Dibut et al., 2009).

Las especies del género *Pseudomonas* (**Figura 2**) son reconocidas por su capacidad para producir sideróforos, como la pioverdina, que secuestra hierro del entorno, facilitando su disponibilidad para la planta y limitando el acceso de patógenos a este nutriente. Además, algunas cepas producen compuestos antifúngicos y antibacterianos que contribuyen al control de enfermedades de plantas (Glick et al., 1998).

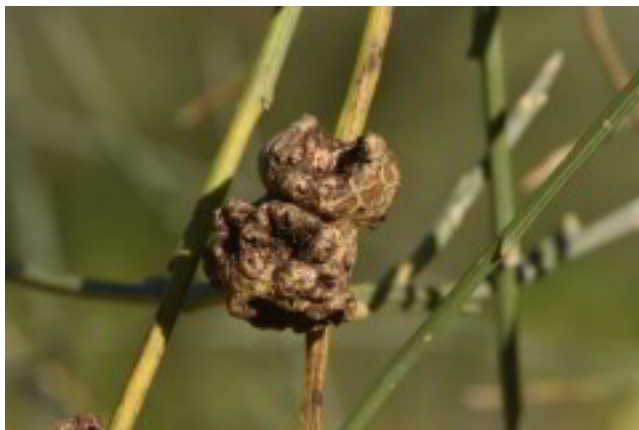


Figura 2. *Pseudomonas savastanoi* formando nódulos. Tomada de (Creative Commons, 2021).

Enterobacter (**Figura 3**) incluye especies que pueden fijar nitrógeno atmosférico y sintetizar fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA). Estas bacterias también han demostrado capacidad para solubilizar fosfatos, aumentando la disponibilidad de fósforo para las plantas (Glick et al., 1998).

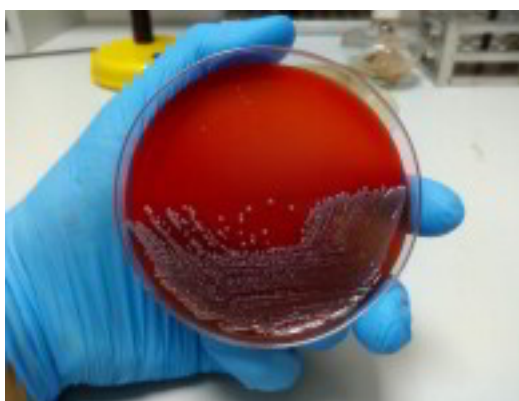


Figura 3. Cultivo de *Enterobacter cloacae*. Tomada de (Lifeder, 2021).

El género *Bacillus* (**Figura 4**) es conocido por la producción de esporas resistentes y la síntesis de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas, como las surfactinas y fengicinas. Estas sustancias ayudan a proteger a las plantas contra patógenos del suelo y foliares (Glick et al., 1998).



Figura 4. Cultivo de *Bacillus cereus*. Tomada de (Joe Rubin, 2017).

Gluconacetobacter diazotrophicus (**Figura 5**) es una endófito que se asocia principalmente con la caña de azúcar y otras plantas de alto contenido de sacarosa. Esta bacteria fija nitrógeno atmosférico, contribuyendo al suministro de nitrógeno de la planta sin la formación de nódulos en las raíces (Chanway, 1998).

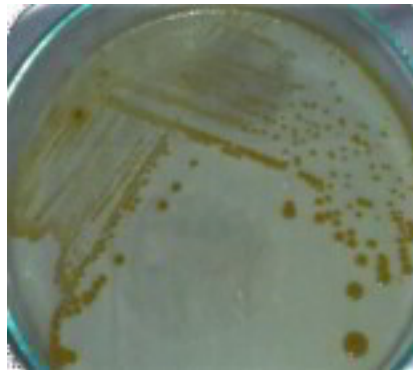


Figura 5. Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tomada de (Ahmed et al., 2016)

Las bacterias del género *Rhizobium* (**Figura 6**) son conocidas por su capacidad para formar nódulos en las raíces de leguminosas, donde llevan a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico en una forma utilizable para la planta. Esta simbiosis es fundamental para el crecimiento de las leguminosas y la fertilidad del suelo (Berg et al., 2006).



Figura 6. Cultivo de *Rhizobium radiobacter*. Tomado de (Nathan Reading, 2013).

Herbaspirillum (**Figura 7**) es un género de bacterias endofíticas que se asocian con diversas plantas, incluyendo gramíneas como el arroz y el maíz. Estas bacterias pueden fijar nitrógeno y producir fitohormonas, contribuyendo al crecimiento y desarrollo de las plantas (Chanway, 1998).



Figura 7. Cultivo de *Herbaspirillum huttiense*. Tomada de (Muñoz & Sakurada, 2018).

Aunque muchas especies del género *Erwinia* (**Figura 8**) son conocidas por ser fitopatógenas, algunas cepas pueden existir como endófitas sin causar síntomas de enfermedad. Estas bacterias pueden producir enzimas que degradan la pared celular de las plantas, facilitando su entrada y colonización (Berg et al., 2006).



Figura 8. Síntomas de la “mancha de fuego”; enfermedad causada por *Erwinia amylovora*. Tomada de (Redazione Microbiologia Italia, 2021).

Xanthomonas (**Figura 9**) es un género que incluye especies fitopatógenas que afectan a una amplia gama de plantas. Estas bacterias producen exopolisacáridos que contribuyen a la formación de biopelículas y pueden obstruir tejidos vasculares de las plantas, causando síntomas de enfermedad (Chanway, 1998).



Figura 9. Cultivo de *Xanthomonas campestris*. Tomada y editada de (T S & Borkar, 2020).

Bacterias como *Bacillus* sp. y *Pseudomonas fluorescens* han sido empleadas para el control de enfermedades, destacando su capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas; algunos estudios han demostrado que *Bacillus* puede colonizar tanto la superficie como el interior de las plantas, disminuyendo significativamente la incidencia de patógenos como *Phytophthora capsici* (Vera Loo et al., 2018).

3.1.4. Endófitas en la agricultura

En la agricultura sostenible, las endófitas se emplean como agentes de biocontrol, promotores de crecimiento y protectores frente al estrés ambiental (Backman & Sikora, 2008). Incorporarlas en semillas o trasplantes garantiza la mejora en la productividad de los cultivos (Backman & Sikora, 2008). Investigaciones revelan que diversas especies formadoras de endosporas, como *Bacillus subtilis* y *Enterobacter cloacae*, no combaten patógenos, sino que también promueven el crecimiento de las plantas, lo que las posiciona como herramientas prometedoras en la agricultura sostenible (Vera Loo et al., 2018).

Las bacterias endófitas tienen funciones metabólicas que respaldan su capacidad multifuncional. Como agente de biocontrol, sintetizan compuestos antimicrobianos como fenazinas, pirrolnitrinas y quitinasas que inhiben el desarrollo de patógenos bacterianos y fúngicos. Además, regulan la expresión de genes sensibles al estrés y modifican la arquitectura radicular para mejorar la absorción de agua (Vurukonda et al., 2016).

En cuanto a la promoción del crecimiento vegetal, estimulan la producción de fitohormonas mejorando el desarrollo radicular y la absorción de nutrientes. Además, movilizan fósforo y fijan nitrógeno atmosférico, incrementando su disponibilidad para las plantas (Hurek & Reinhold-Hurek, 2003).

En cuanto a la protección frente al estrés ambiental, las bacterias endófitas producen osmorreguladores, como trehalosa y glicerol, que contribuyen al equilibrio hídrico celular y limitan el daño oxidativo. También sintetizan antioxidantes, como catalasas y peroxidasas, los cuales permiten que las plantas toleren condiciones adversas, como sequía, salinidad y temperaturas extremas (Vurukonda et al., 2016).

En el maíz (*Zea mays*), se ha observado la presencia de endófitas como *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, las cuales mejoran la disponibilidad de nitrógeno atmosférico y promueven el desarrollo radicular al estimular la producción de fitohormonas (Santoyo et al., 2016). En el arroz (*Oryza sativa*), microorganismos como *Burkholderia* y *Pseudomonas* incrementan la resistencia a enfermedades

y la tolerancia a estrés abiótico, como la salinidad al producir compuestos antimicrobianos (Stéphane et al., 2005). El trigo (*Triticum aestivum*) alberga hongos endófitos como *Fusarium* y *Trichoderma*, que antagonizan patógenos del suelo y solubilizan fósforo (Anwar et al., 2023).

En la soja (*Glycine max*), bacterias del género *Bradyrhizobium* hacen simbiosis formando nódulos radiculares y favoreciendo un crecimiento más vigoroso (Hungria & Mendes, 2015). Por último, en el tomate (*Solanum lycopersicum*), bacterias como *Bacillus* y *Enterobacter* activan las defensas naturales contra patógenos y estimulan el crecimiento mediante la síntesis de auxinas (Santoyo et al., 2016).

Estos microorganismos han sido aprovechados para producir biofertilizantes comerciales en diversos cultivos. Por ejemplo, RhizoVital® (**Figura 10**) que es un biofertilizante líquido que contiene *Bacillus amyloliquefaciens*, una bacteria promotora del crecimiento vegetal. Su formulación natural y libre de tóxicos permite su aplicación en cultivos orgánicos sin restricciones de seguridad. La aplicación de RhizoVital® se recomienda en dosis de 5 ml por litro de agua, con repeticiones cada 2 o 4 semanas (Vuna Agri, 2021).



Figura 10. Producto de RhizoVital formulado con *Bacillus amyloliquefaciens*. Tomada de (Vuna Agri, 2021).

Otro producto relevante es Nodulaid® (**Figura 11**), producto a base de *Bradyrhizobium japonicum*, diseñado para promover la fijación de nitrógeno mediante la estimulación de la nodulación en cultivos leguminosos y así reducir la necesidad de fertilizantes nitrogenados. Nodulaid® se formula en diferentes

presentaciones según la cepa de rizobios y el cultivo a inocular. (Hungria & Mendes, 2015).

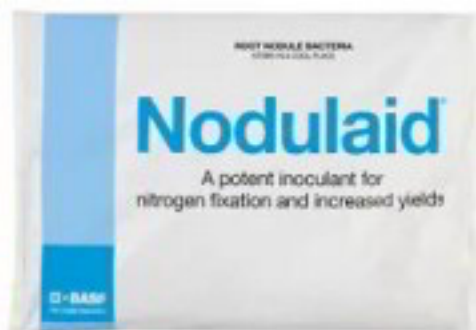


Figura 11. Producto de Nodulaid más conocido en Australia. Tomada de (BASF SE, 2017).

Otro ejemplo es MycoApply® Injector Endo Organic (**Figura 12**), es un concentrado en polvo de hongos micorrizicos corpusculares (HMA) como *Glomus intradices*, diseñado para mejorar la absorción de agua y nutrientes en cultivos hortícolas. Su formulación, basada en un portador húmico soluble, permite su fácil aplicación en sistemas de riego (MycoApply, 2015).



Figura 12. Producto de MycoApply® con hongos micorrizicos corpusculares. Tomada de (MycoApply, 2015).

También se encuentra Azotobacterin® (**Figura 13**), un fertilizante en polvo que utiliza *Azetobacter chroococcum* para mejorar la disponibilidad de nitrógeno y estimular el crecimiento vegetal. Su aplicación permite reducir la dependencia de fertilizantes sintéticos como la urea y NPK y mejora la calidad de los cultivos (Wao Biotecnología, 2020).



Figura 13. Producto de Azotobacterin; fertilizante microbiano fijado con nitrógeno. Tomada de (Wao Biotecnología, 2020).

3.2. Caracterización molecular de microorganismos

En los años 60, Dubnau y su equipo identificaron regiones conservadas en el gen que codifica el ARNr 16S en *Bacillus spp.*, lo que marcó el inicio de su uso en taxonomía bacteriana. Posteriormente, Carl Woese impulsó su aplicación como cronómetro molecular, permitiendo dividir a los procariotas en Eubacteria y Archeobacteria (Woese, 2002). En su trabajo “Bacterial Evolution” (1987), Woese, demostró que el análisis de regiones conservadas variables del ARNr 16S facilita tanto la clasificación como la diferenciación entre microorganismos, según su distancia evolutiva (Freites, 2015).

Hebert, Cywinska, Ball y DeWaard introdujeron el concepto del “código de barras del ADN” en 2003 como una herramienta confiable para identificar organismos mediante la amplificación de un fragmento estándar de ADN a través de PCR. Propusieron el gen mitocondrial COI como marcador, útil para clasificar animales, sin embargo, su aplicación resultó limitada en plantas, hongos y microorganismos, lo que motivó la búsqueda de marcadores alternativos más apropiados (Valenzuela-González et al., 2015).

3.2.1. Regiones hipervariables del gen ARNr 16S

La secuenciación del ADNr 16S se utiliza principalmente para identificar bacterias cuya clasificación es complicada, inviable o consume demasiado tiempo al

emplear otros métodos. Este proceso generalmente requiere ADN extraído de un cultivo bacteriano puro para amplificar el gen de interés. (del Rosario Rodicio & del Carmen Mendoza, 2004).

El gen ARNr 16S es de aproximadamente 1500 pares de bases, sin embargo, en estudios de identificación bacteriana no siempre se secuencia en su totalidad, sino que se amplifican fragmentos específicos cuya longitud varía según los cebadores utilizados. Este gen posee regiones variables clave para la identificación taxonómica y regiones conservadas (**Figura 14**) que permiten el uso de cebadores universales, esenciales en la clasificación de microorganismos (Freites, 2015). Esto ha revolucionado la taxonomía bacteriana al establecer un sistema de clasificación moderno y facilitar la identificación de bacterias de manera más rápida y precisa (Valenzuela-González et al., 2015). Estas regiones presentan distintos grados de variabilidad entre especies bacterianas y son clave para la identificación y clasificación filogenética de los microorganismos (Chakravorty et al., 2007).

Las regiones V1 y V2 son altamente variables y permiten diferenciar géneros bacterianos, lo que las hace útiles en estudios de diversidad microbiana en suelos y ambientes acuáticos. La región V3 es una de las más utilizadas en secuenciación de alto rendimiento, ya que proporciona una buena resolución taxonómica para la identificación de microorganismos a nivel género y especie. La región V4 es ampliamente empleada en estudios metagenómicos debido a su equilibrio entre conservación y variabilidad, lo que permite una identificación precisa (Chakravorty et al., 2007).

Las regiones V5 y V6 presentan variabilidad intermedia y han sido utilizadas en la caracterización de microbiomas específicos, como los de ambientes extremos y sistemas simbióticos. En cuanto a las regiones V7 y V8, aunque son menos comunes en estudios metagenómicos, han demostrado ser valiosas en la diferenciación de ciertos grupos bacterianos específicos, como las proteobacterias. La región V9 es la más corta y ha sido utilizada en estudios de

microbiomas mediante tecnologías de secuenciación de fragmentos cortos (Chakravorty et al., 2007).

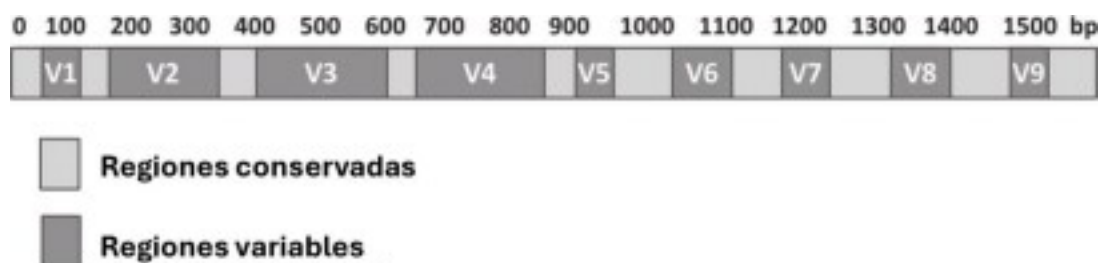


Figura 14. Organización de las regiones hipervariables y conservadas del gen 16S rRNA. Tomada y editada de (McAllister et al., 2018).

El análisis molecular comienza con la extracción de ácidos nucleicos, como ADN o ARN, para luego amplificar regiones específicas mediante PCR. Este proceso incluye la ruptura celular, eliminación de proteínas y precipitación del material genético (Blanco-Jarvio et al., 2014).

3.2.2. Caracterización molecular por 16S ribosomal

La obtención de secuencias 16S ribosomales comienza con la extracción de ADN genómico, seguido de su amplificación mediante PCR utilizando iniciadores diseñados para regiones conservadas del gen. En este caso, se utilizaron los iniciadores **27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3-')** y **1429R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT3-')** (Moreno Herrera et al., 2010), los cuales permiten amplificar un fragmento extenso del gen 16S ARNr, facilitando el análisis filogenético y la identificación de microorganismos (Moreno Herrera et al., 2010).

Los iniciadores 27F y 1429R fueron diseñados para amplificar la mayoría de las secuencias del 16S ARNr en bacterias, cubriendo las regiones variables (V1-V9), lo que permite una identificación taxonómica con alta resolución (Weisburg et al., 1991).

Los productos obtenidos se analizan con herramientas bioinformáticas como BLAST, lo que permite identificar y clasificar organismos al comparar las secuencias con bases de datos y clasificar los organismos según su similitud genética (Blanco-Jarvio et al., 2014).

El ARNr 16S es un marcador clave en la identificación de comunidades metagenómicas y en el análisis evolutivo de procariotas, tanto cultivadas como no cultivables. Su relevancia ha dado lugar a bases de datos especializados como Greengenes, SILVA, Ez-Taxon y RPD, que facilitan su estudio. Para su uso efectivo en taxonomía, se recomienda trabajar con secuencias completas, aplicar métodos de alineamiento y optimizar la formación de unidades taxonómicas operacionales (Ortiz-Estrada et al., 2017).

Esta técnica ha demostrado ser útil para discriminar géneros, especies e incluso cepas, identificando diferencias genéticas que no son detectables por métodos tradicionales. Además, el uso de software especializado facilita la creación de alineamientos, secuencias consenso y dendogramas que resaltan regiones variables y conservadas, clave para estudios filogenéticos y taxonómicos. La metodología también ha sido aplicada exitosamente en la identificación de organismos asociados a eventos tóxicos, lo que subraya su potencial para monitorear comunidades microbianas de manera más confiable (Blanco-Jarvio et al., 2014). Sin embargo, el uso exclusivo del ARNr 16S presenta limitaciones, como la ocurrencia de inserciones y pérdidas en la secuencia, transferencia horizontal de genes y variabilidad, lo que puede complicar la asignación precisa de especies (Ortiz-Estrada et al., 2017).

La caracterización molecular desempeña un papel fundamental en la comprensión y resolución de desafíos biotecnológicos. Permite identificar las propiedades genéticas y bioquímicas de organismos o sistemas biológicos, lo que resulta esencial para optimizar procesos, desarrollar productos y garantizar la seguridad de aplicaciones biotecnológicas (Barnum, 1998). Además, proporciona información precisa sobre los genes y sus funciones, lo que facilita avances en áreas como la ingeniería genética, la biomedicina y la agricultura sostenible (Council et al., 2001).

3.3. Caracterización morfológica y microbiológica

La caracterización morfológica de los microorganismos es una etapa crucial para su identificación y estudio. Este enfoque proporciona información clave sobre las

propiedades físicas y estructurales de bacterias y otros microorganismos (Madigan et al., 1997).

3.3.1. Aspectos por considerar en la caracterización morfológica

En medios de cultivo sólidos, las bacterias forman colonias cuya apariencia puede ser característica de ciertos géneros o especies. Se describen parámetros como tamaño, forma, borde, elevación, color, textura (**Figura 15**), los cuales son útiles para la identificación inicial (Cappuccino & Welsh, 2016).

El tamaño de las colonias bacterianas puede ir desde pequeñas y puntiformes hasta grandes y extensas, dependiendo de la especie, las condiciones de cultivo y el tiempo de incubación. Por ejemplo, bacterias como *Mycobacterium spp.* suelen formar colonias pequeñas debido a su crecimiento lento, mientras que organismos como *Escherichia coli* generan colonias de mayor tamaño en poco tiempo (Madigan et al., 1997).

La formación de colonias, observable desde una vista superior incluye tipos como circular, irregular, filamentosa o rizoidal. Estas características pueden asociarse con la estructura del organismo. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* produce colonias redondeadas, mientras que las rizoidales son comunes en algunos hongos y bacterias de suelo (Berlanga, 2000).

El borde de una colonia describe el contorno de su periferia, que puede ser entero (liso), ondulado, lobulado o filamentoso. Bordes lisos suelen observarse en bacterias como *Enterobacter spp.*, mientras que bordes filamentosos son indicativos de organismos con alta producción de polisacáridos (Madigan et al., 1997).

La elevación refleja el perfil de la colonia en su sección transversal. Puede ser plana, convexa, umbonada o crateriforme. Las colonias de *Staphylococcus spp.* son generalmente convexas, mientras que *Bacillus spp.* puede formar colonias planas o elevadas (Cappuccino & Welsh, 2016).

El color de las colonias depende de la producción de pigmentos por parte del microorganismo. Esto puede ir desde tonos translúcidos o blancos hasta colores

vivos como verde, amarillo o rojo. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* produce un pigmento verde (piocianina), y *Serratia marcescens* puede producir pigmentos rojos bajo condiciones específicas. La coloración a menudo refleja funciones metabólicas particulares (Bergey, 1994).

El tamaño, la forma (cocos, bacilos, espirilos) y la agrupación celular (cadenas, racimos o pares) son características fundamentales en la identificación de bacterias. Estas propiedades reflejan adaptaciones evolutivas y funcionales específicas de los microorganismos en distintos entornos (Madigan et al., 1997).

Aunque la caracterización morfológica es un paso muy importante, presenta limitaciones, como la incapacidad de identificar microorganismos con estructuras morfológicas similares y debe complementarse con técnicas moleculares, como la secuenciación del ARNr 16S, para lograr una identificación más precisa (Tindall et al., 2010).

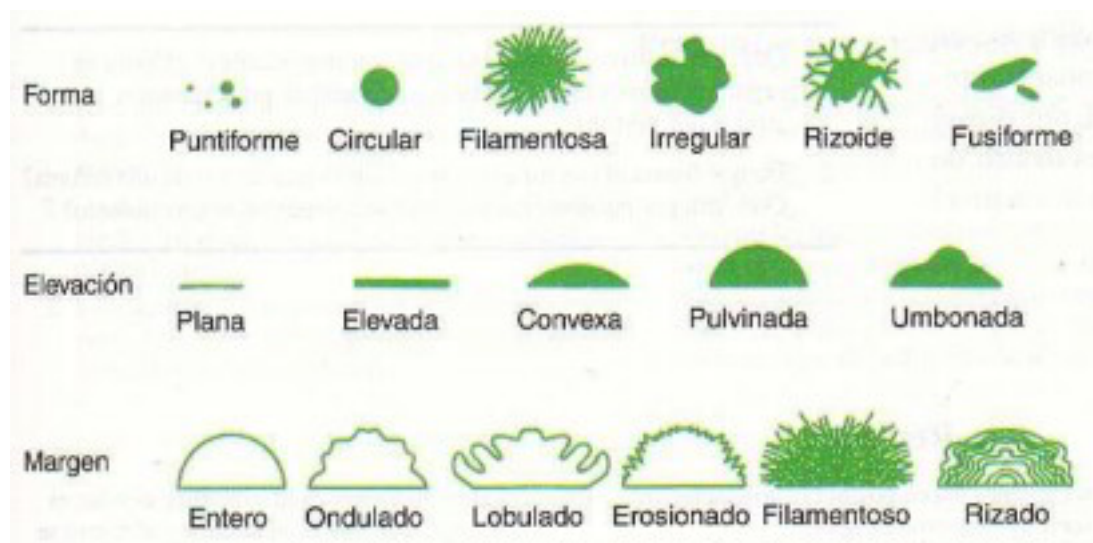


Figura 15. Morfología de colonias bacterianas. Tomada de (SlideShare, 2025).

3.3.2. Medios de cultivo comunes para el aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos requiere el uso de medios de cultivo específicos que permitan el crecimiento de bacterias, hongos y otros microorganismos asociados al entorno de las raíces. La selección de estos

medios depende de las características de los microorganismos a estudiar y su capacidad para interactuar en el suelo y beneficiar a las plantas (King et al., 1954).

El agar nutritivo es un medio no selectivo que proporciona una base rica en nutrientes para el crecimiento de bacterias heterótrofas comunes en la rizosfera y es ampliamente utilizado en estudios iniciales para aislar una gran variedad de microorganismos bacterianos; se compone de peptona, extracto de carne y agar. (Cappuccino & Welsh, 2016).

Otro medio común es el agar King B (KB), diseñado para promover el crecimiento de bacterias fluorescentes como las del género *Pseudomonas*, reconocidas por sus propiedades beneficiosas para las plantas, como la producción de compuestos antifúngicos. Este medio incluye glicerol, peptona, fosfato dipotásico y sulfuro de magnesio, lo que lo hace adecuado para aislar microorganismos promotores del crecimiento vegetal y antagonistas de patógenos (King et al., 1954).

En el caso de los hongos, el agar Sabouraud (SDA) es un medio frecuentemente utilizado debido a su pH ácido, que favorece el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras, al mismo tiempo que inhibe el desarrollo bacteriano. Este medio contiene dextrosa, peptona y agar con un pH ajustado a 5.6. (Pitt, 2009).

El agar papa dextrosa (PDA) también es empleado para el cultivo de hongos y ciertos tipos de bacterias. Este medio, compuesto por extracto de papa, dextrosa y agar, se utiliza en el estudio de microorganismos simbióticos o fitopatógenos. En algunas ocasiones, se le añaden antibióticos para evitar el crecimiento bacteriano no deseado (Cappuccino & Welsh, 2016).

Para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, se utiliza el medio de nitrógeno libre (NFM), que carece de una fuente de carbono específica. Este medio, compuesto principalmente por sales minerales y agar, está diseñado para favorecer el desarrollo de microorganismos especializados, como las bacterias

del género *Rhizobium*, esenciales en el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Vincent, 1970).

El medio R2A está diseñado para el cultivo de bacterias oligotróficas aquellas adaptadas a entornos con bajo contenido de nutrientes, como la rizosfera. Su composición equilibrada, que incluye fuentes de carbono y nitrógeno, facilita el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, incluso de aquellos que son difíciles de cultivar en medios ricos (Reasoner & Geldreich, 1985).

Por otro lado, el medio LB es un medio nutritivo de uso general, diseñado inicialmente para el cultivo de *Escherichia coli*, pero ampliamente empleado para diversos microorganismos debido a su capacidad para soportar su rápido crecimiento. Aunque su alto contenido de nutrientes puede favorecer bacterias dominantes, sigue siendo útil para estudios de microbiología rizosférica en los que se requiere un crecimiento acelerado de las bacterias (Sambrook & Russell, 2001).

El Agar Pikovskaya es un medio de cultivo recomendado para la detección de microorganismos del suelo capaces de solubilizar fosfatos. Su composición incluye extracto de levaduras, dextrosa, fosfato, calcio, sulfato de amonio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato ferroso y agar. Microorganismos como *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* pueden crecer en este medio, formando zonas claras alrededor de las colonias debido a la solubilización de fosfato en su proximidad (Pikovskaya, 1948).

El agar soja tripticaseína (TSA) es un medio de cultivo no selectivo ampliamente utilizado para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. Su composición incluye peptonas de caseína y soja, así como cloruro de sodio y agar, proporcionando un entorno nutritivo adecuado para bacterias ambientales, clínicas e industriales. Debido a su capacidad para soportar el crecimiento de diversos grupos microbianos, es empleado en estudios microbiológicos generales, control de calidad y análisis de alimentos y agua (Atlas, 2010).

3.4. *Larrea Tridentata*

3.4.1. Revisión de aspectos botánicos

La gobernadora o arbusto de creosota (*Larrea tridentata*) (**Figura 16**) es una especie característica de los desiertos cálidos de América del Norte. *L. tridentata* pertenece a la familia *Zygophyllaceae*, la cual abarca aproximadamente 30 géneros y 250 especies; esta familia es característica de regiones cálidas y áridas, donde sus miembros han desarrollado adaptaciones para prosperar en condiciones climáticas extremas (Morales-Ubaldo et al., 2022). Su expansión ha sido notable, ocupando alrededor de 19 millones de hectáreas que previamente eran pastizales desérticos (Arteaga et al., 2005).



Figura 16. Arbusto de *Larrea tridentata*. Tomada de (Hernández-Baez et al., 2019).

L. tridentata es conocida en Estados Unidos como chaparral o madera grasa, mientras que en México se le llama guamis, alcaparra falsa, hediondilla o gobernadora (Morales-Ubaldo et al., 2022).

L. tridentata es una planta perenne que crece en regiones áridas, alcanzando una altura entre 1 y 3 metros, sus ramas, que tienen una apariencia retorcida y nudosa, sostienen hojas compuestas por dos pequeños folíolos de alrededor de 1 cm de largo, los cuales presentan una superficie brillante debido a una capa de resina secretada por glándulas presentes en las estípulas. Estas estructuras glandulares se encuentran en los nudos del tallo, el cual es de textura leñosa y

no presenta espinas. Las flores de esta especie son amarillas y nacen de manera individual en las axilas de las ramas. Tienen cinco pétalos alargados con una forma distintiva similar a una garra (**Figura 17**). El fruto, es una cápsula redondeada que está cubierta por una densa capa de pequeños pelos blancos, los cuales protegen las semillas en su interior. Estas características reflejan su alta especialización para sobrevivir en ambientes secos y extremos (Arteaga et al., 2005).



Figura 17. Rama de *Larrea tridentata* con brotes florales. Tomada de (Eric, 2010).

3.4.2. Distribución geográfica e importancia ecológica

Un patrón biogeográfico notable en *L. tridentata* es la distribución alineada de sus razas diploides, tetraploides y hexaploides a lo largo de los desiertos de Chihuahua, Sonora y Mojave, en el oeste de América del Norte (**Figura 18**). Estudios recientes han utilizado diferencias significativas en el tamaño de las células protectoras de hoja actuales y fósiles para trazar las distribuciones históricas y actuales de estas razas de ploidía, abarcando desde el Último Máximo Glacial (LGM) hasta el presente (Hunter et al., 2001).

La poliploidía es un proceso clave en la diversificación de las especies, ya que puede generar nuevas barreras tanto precigóticas como postcigóticas (Laport et al., 2016). *L. tridentata* presenta poblaciones con niveles de ploidía variados, incluyendo diploides, tetraploides y hexaploides. Este fenómeno la posiciona

como un ejemplo destacado de un complejo taxonómico autopoliploide, reflejando su diversidad genética y adaptabilidad en diferentes entornos (Laport et al., 2012).



Figura 18. Mapa de distribución natural de *Larrea tridentata* en el norte de México y el oeste de Estados Unidos. Tomada de (Elbert L. Little, 2021).

3.4.3. Propiedades funcionales y aplicaciones

Su composición química está dominada por productos derivados de las rutas metabólicas del mevalonato, shikimato y malonato (Reyes-Melo et al., 2021). Entre las propiedades medicinales atribuidas a *L. tridentata*, destacan especialmente sus efectos antioxidantes, los cuales han sido objeto de múltiples investigaciones debido a su potencial en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres (Arteaga et al., 2005).

Entre sus metabolitos secundarios destaca el ácido nordihidroguaiaretico (NDGA), conocido por sus importantes propiedades biológicas. Este compuesto actúa como un potente antioxidante al secuestrar especies reactivas de oxígeno, inhibir las lipoxigenasas (LOX) y activar la respuesta antioxidante endógena mediada por el factor NRF2 (factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2) (Reyes-Melo et al., 2021). Durante la década de 1950, este compuesto se utilizó extensamente como conservante alimentario y en la preservación de fibras naturales, sin embargo, su uso fue prohibido en la década de 1960 tras reportes

de toxicidad y se han documentado casos de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad asociados al consumo crónico tanto del arbusto como del NDGA (Arteaga et al., 2005).

L. tridentata cuenta con más de 50 usos tradicionales documentados (Reyes-Melo et al., 2021). *L. tridentata* ha sido empleada tradicionalmente en diversas formas debido a sus propiedades medicinales. Las hojas y ramitas de la planta se utilizan comúnmente para preparar infusiones o tés, mientras que en la actualidad también se encuentran disponibles en presentaciones como cápsulas y tabletas destinadas al consumo oral. En México, el té elaborado a partir de esta planta es popularmente utilizado para tratar afecciones como cálculos renales y biliares, destacando su importancia en la medicina tradicional de la región (Arteaga et al., 2005).

3.5. Estudios relacionados

Un estudio reciente analizó bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) aisladas de las raíces de *Larrea divaricata* expuestas a metales pesados como plomo (Pb), cadmio (Cd) y zinc (Zn). Se identificaron doce cepas resistentes a estos metales, principalmente de los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas* y *Agrobacterium*. Estas cepas mostraron capacidades para producir biopelículas, sideróforos y actividad ACC deaminasa, aunque solo una mostró capacidad para solubilizar fosfatos. Esto indica su potencial en la fitorremediación de suelos contaminados por actividades mineras (Fernández et al., 2023).

Otro estudio evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de *Larrea tridentata* contra cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Los resultados indicaron que dichos extractos exhiben una fuerte actividad contra bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*. Esto sugiere que los compuestos presentes en *L. tridentata* podrían utilizarse como alternativas para el control bacteriano (Morales-Márquez et al., 2025).

Además de su microbiota bacteriana, *L. tridentata* también establece asociaciones con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales

desempeñan un papel clave en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés. Un estudio realizado en el Desierto Chihuahuense evaluó la diversidad temporal de HMA en la rizosfera de *L. tridentata*, identificando 17 especies distribuidas en 12 géneros dentro del filo *Glomeromycota*. *Funneliformis geosporum* fue la especie más abundante y perteneciente a la familia *Glomeraceae*, la cual presentó la mayor diversidad de géneros en asociación con esta planta. Se observó que el porcentaje de micorrización variaba a lo largo del año, siendo más alto en febrero (83.22%) en comparación con septiembre (75.27%) y mayo (65.27%). Estos resultados indican que la interacción entre *L. tridentata* y los HMA está influenciada por factores estacionales, lo que podría tener implicaciones en la restauración ecológica y la gestión de ecosistemas áridos (Hernández-Zamudio et al., 2018).

L. tridentata alberga una comunidad diversa de bacterias endófitas y rizobacterias que desempeñan un papel clave en su salud y crecimiento. El impacto de estos microorganismos no se limita solo a la gobernadora, sino que también han sido clave en el desarrollo de biofertilizantes y estrategias sostenibles para mejorar la productividad de suelos degradados. Esto abre oportunidades para aplicar bacterias benéficas en la agricultura de regiones áridas, reduciendo la necesidad de fertilizantes químicos.

IV. Materiales y métodos

Las bacterias endófitas fueron aisladas mediante un procedimiento basado en cultivo (**Figura 19**) (Bokhari et al., 2019).

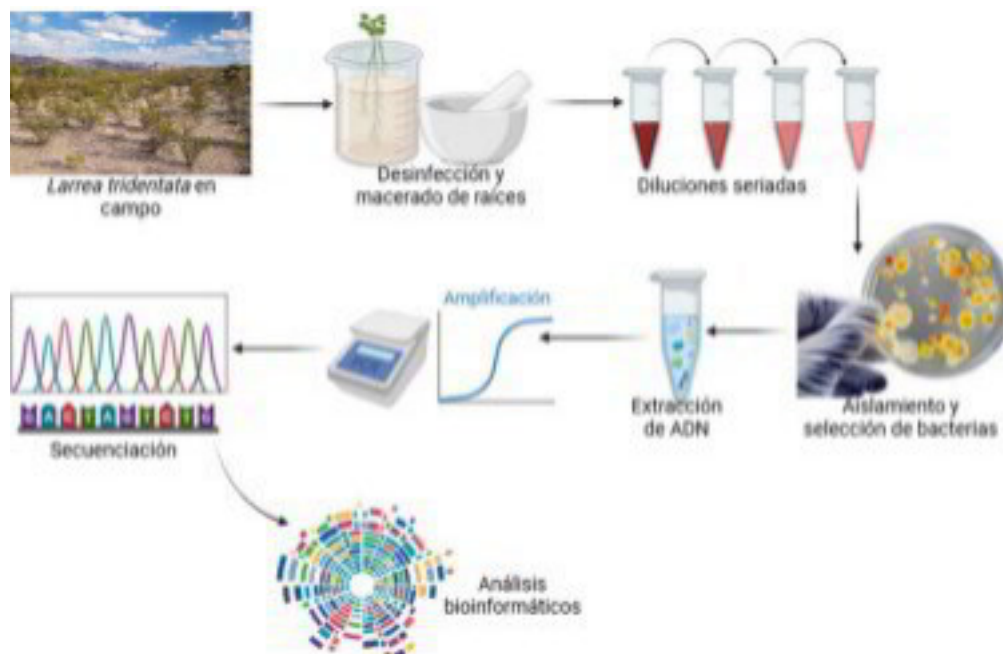


Figura 19. Esquema general de la metodología.

4.1. Colecta de las muestras

La recolección de muestras de *L. tridentata* se llevó a cabo seleccionando una planta sana y representativa de la población local en el municipio de Saltillo, Coahuila (**Figura 20**). Las coordenadas geográficas del punto de recogida fueron las siguientes:

N 25° 21' 16.75" E 101° 2' 54.083"

Se colectó la raíz y el suelo de 20 cm alrededor del tallo y fue colocado en una bolsa estéril y transportado al laboratorio.

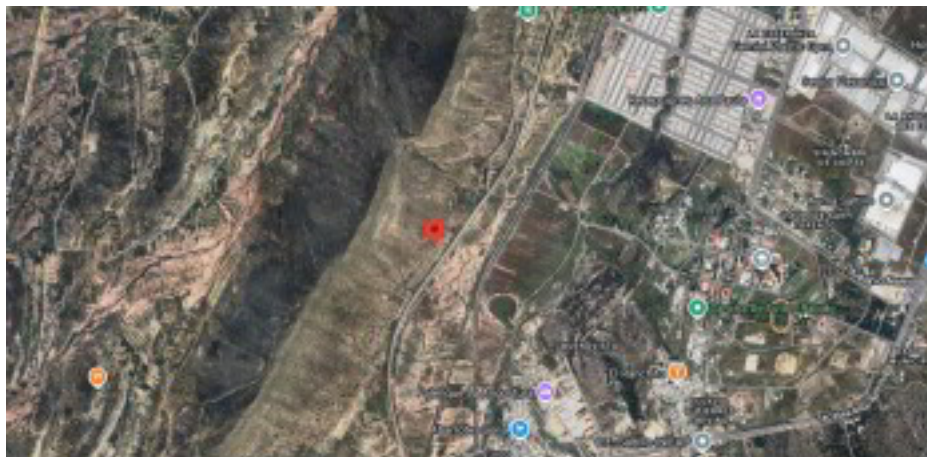


Figura 20. Mapa que indica la zona de la recolección de la muestra de *Larrea tridentata*.

4.2. Transporte y conservación de las muestras

El material recolectado fue transportado al laboratorio en condiciones controladas y almacenado inmediatamente a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento.

4.3. Preparación de medios de cultivo

La preparación del medio TSA (**Figura 22**) se realizó disolviendo 30 g de medio (Caldo Soya Trypticaseína, MCD LAB, Cat. No. 7382) en un litro de agua destilada. Para obtener un medio sólido, se le añadió 1.5 g de agar por cada 100 ml de agua destilada (Madigan et al., 1997).

Por otro lado, el medio R2A (**Figura 21**) (R2A Agar, Millipore, Cat. No. 100416) se preparó disolviendo 18.2 g del medio por cada litro de agua destilada (Atlas, 2010).

Los reactivos fueron pesados en una balanza analítica y mezclados con el volumen correspondiente de agua destilada en un matraz. La mezcla fue esterilizada en autoclave a 115°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado, el medio fue enfriado durante 10 a 15 minutos y vaciado en cajas Petri estériles dentro de la campana de flujo laminar.



Figura 21. Preparación de medio R2A.

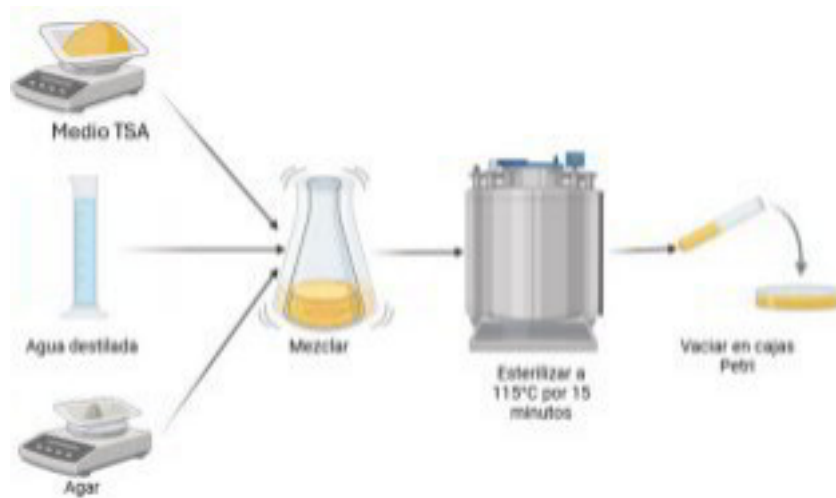


Figura 22. Preparación de medio TSA.

Es importante destacar que todo el material de vidrio, las soluciones y los medios de cultivo utilizados fueron previamente esterilizados en autoclave bajo las mismas condiciones.

4.4. Preparación de muestras

Las raíces fueron sometidas a un proceso de lavado (**Figura 23**), sumergiéndolas en un vaso de precipitado con 1 L de etanol al 70% durante 30 segundos bajo agitación constante. Posteriormente se lavaron con hipoclorito de sodio al 2% por 5 minutos manteniendo la agitación.

Luego de ser enjuagadas con agua destilada estéril, las raíces fueron trituradas en una solución de NaCl al 0.8%. Del líquido resultante se tomó 1 ml, el cual se depositó en microtubos de 1.5 ml para realizar diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de 1×10^{-3} .

De cada dilución, se inocularon 50 μ L en placas Petri con medio de cultivo previamente preparado, usando perlas de vidrio. Se incluyó un control negativo.

Las placas inoculadas fueron incubadas a 25 °C durante 72 horas.

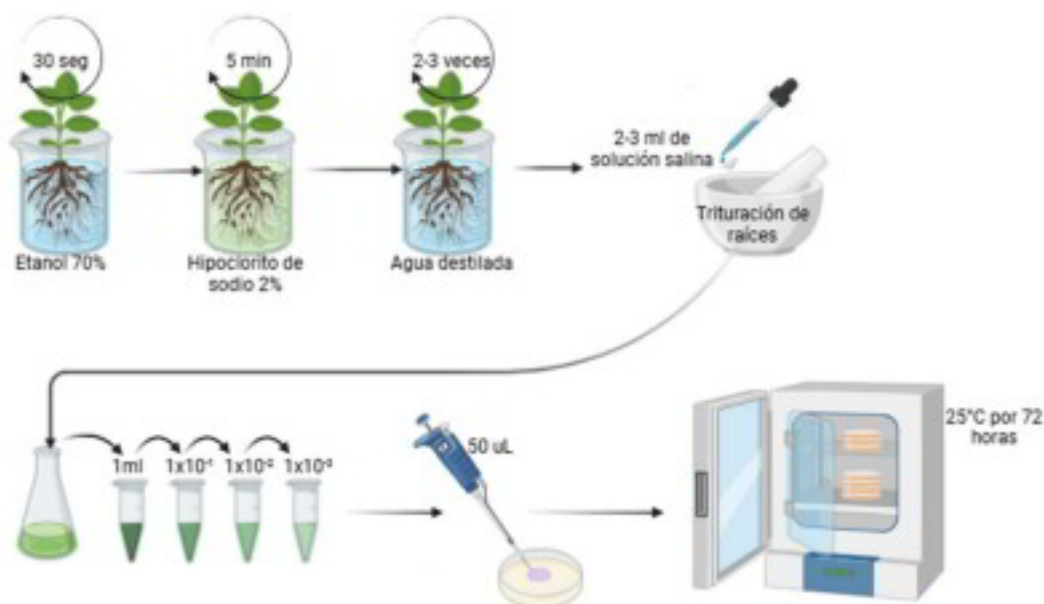


Figura 23. Aislamiento y dilución de bacterias endófitas a partir de raíces.

4.5. Selección de colonias

Tras el periodo de incubación de 72 horas, las placas fueron inspeccionadas para identificar colonias bacterianas. Las colonias seleccionadas fueron aquellas que presentaban características morfológicas distintivas, como color, forma y tamaño.

Cada colonia seleccionada fue inoculada en placas Petri con medio de cultivo fresco, las cuales se incubaron nuevamente a 25°C por un periodo de 48 a 72 horas. Este procedimiento se repitió entre dos y tres veces.

Para la clasificación morfológica se utilizó una lupa y se registraron características como forma (circular, irregular, filamentosa o rizoidal), elevación

(plana, convexa o umbonada), borde (liso, ondulado, lobulado o filamentoso) y color (blanco, crema, amarillo o translúcido).

4.6. Criopreservación de bacterias

Se tomaron muestras individuales y se mezclaron con 200 μ L de medio LB líquido en microtubos de 1.5 ml. A esta mezcla se le agregaron 200 μ L de glicerol (**Figura 24**).

La mezcla fue homogenizada con ayuda de un agitador tipo vortex y se almacenó a -81°C para su conservación a largo plazo.



Figura 24. Criopreservación de bacterias.

4.7. Extracción de ADN (Hot Shot)

El ADN bacteriano fue extraído utilizando la técnica de Hot Shot (**Figura 25**) (Truett et al., 2000). Para este procedimiento se prepararon dos soluciones: una solución de lisis alcalina y una solución de neutralización (Tris-HCl).

- Para la preparación de 5 ml de la solución de lisis alcalina, se utilizaron 1.25 ml de NaOH 100 mM y 0.1 mL de EDTA 10 mM y se aforó a 5 ml con agua ultrapura estéril. La solución de NaOH a 100 mM se obtuvo mezclando 4.5 ml de agua ultrapura estéril con 0.5 ml de NaOH 1 M, mientras que la solución de EDTA a 10 mM se preparó combinando 2 ml de agua ultrapura estéril con 0.5 ml de EDTA 50 mM.
- Por otro lado, la solución de neutralización se obtuvo disolviendo 0.0315 g de Tris-HCl en 5 ml de agua ultrapura estéril.

En microtubos de 1.5 ml se mezclaron 20 μL de agua ultrapura estéril con colonias bacterianas aisladas hasta lograr su disolución completa. Posteriormente, 10 μL de esta solución se transfirieron a microtubos de 200 μL que contenían 50 μL de la solución de lisis alcalina. Las muestras fueron incubadas a 95°C durante una hora.

Después de la incubación, se agregaron 50 μL de la solución de neutralización. Las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Se preparó una dilución 1:10 del material extraído, la cual fue utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

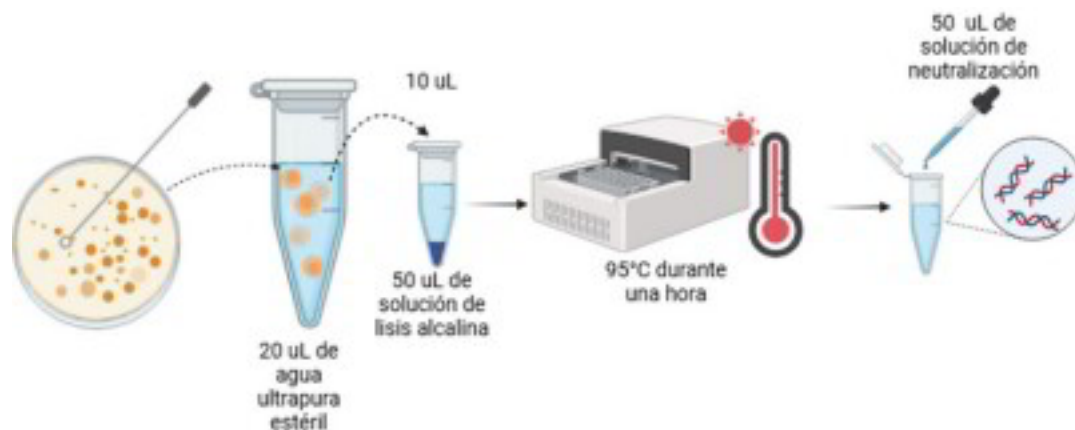


Figura 25. Extracción de ADN.

4.8. Amplificación de los fragmentos 16S (PCR)

La región del gen 16S rRNA fue amplificada utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**Figura 26**) (Weisburg et al., 1991), empleando los cebadores específicos **27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3-')** y **1429R (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT3-')** junto con el estuche comercial de GoTaq® Green Master Mix, Promega como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Componentes para la mezcla de PCR con Gotaq® green master mix.

Componente	Volumen	Concentración
ADN	1 μL	Variable
Agua ultrapura estéril	2 μL	N/A

Primer Fw (27F)	1 μ L	0.2 μ M
Primer Rv (1429R)	1 μ L	0.2 μ M
Gotaq green master mix	5 μ L	1X (contiene 200 μ M dATP, 200 μ M dGTP, 200 μ M dCTP, 200 μ M dTTP y 1.5 mM MgCl ₂).

Cada muestra fue procesada en duplicado en un termociclador Axygen® MaxyGene II siguiendo el programa que se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Programa de PCR utilizado para amplificar el gen ARNr 16S.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94	5 minutos	1
Desnaturalización	94	30 segundos	30
Alineamiento	56		
Extensión	72		
Extensión	72	10 minutos	1

Los productos de la amplificación fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, utilizando un voltaje constante de 80-85 V y visualizados en un fotodocumentador Axygen™.

Una vez confirmada la amplificación, se realizó una segunda PCR con un volumen de reacción de 25 μ L de cada muestra por duplicado, empleando el estuche de 2x Go taq Master mix, Promega y los mismos cebadores.

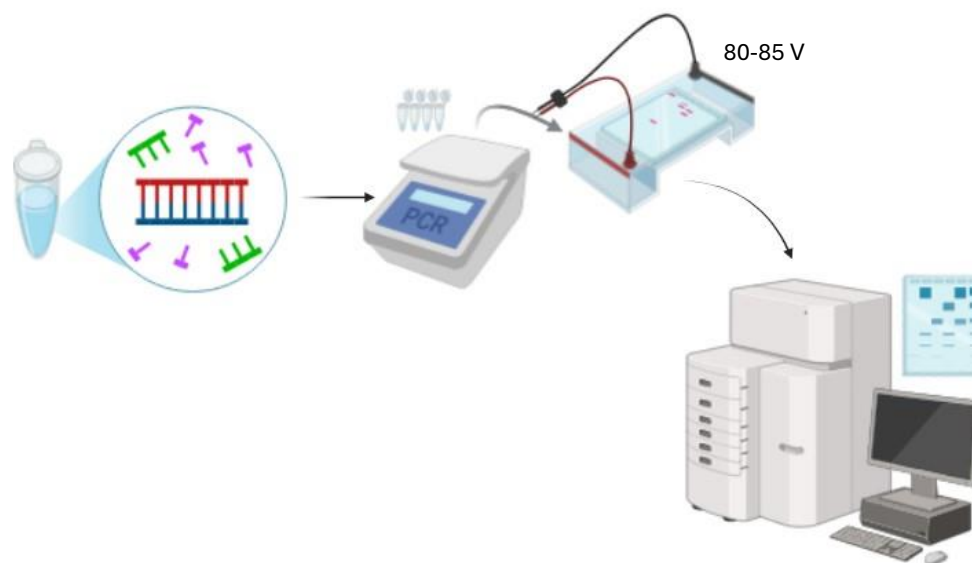


Figura 26. Amplificación y secuenciación del ADN.

4.9. Secuenciación

Las muestras se mandaron a secuenciar bidireccionalmente al Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) con los cebadores **27F** (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3-') y **1429R** (5'-GTTTACCTTGTTACGACTT3-'), siguiendo las especificaciones del servicio.

4.10. Análisis de las secuencias

Las secuencias generadas fueron analizadas utilizando el software de SnapGene (**Figura 27**), que permitió la visualización y manipulación de las secuencias.



Figura 27. SnapGene. Tomada de (SnapGene, 2025).

Para llevar a cabo el alineamiento de las secuencias provenientes de ambas direcciones de una muestra, se empleó el programa MAFFT (**Figura 28**), una herramienta especializada en alineación múltiple de secuencias. El alineamiento resultante fue exportado en formato FASTA.



Figura 28. MAFFT. Programa de alineación de secuencias. Tomada de (Kazutaka Katoh, 2013)

El archivo de alineamiento en formato FASTA fue ingresado en la herramienta EMBOSS Cons del programa de EMBL-EBI (**Figura 29**), la cual permite la construcción de una secuencia consenso a partir de las secuencias alineadas. Esta secuencia consenso representa la mejor estimación de la secuencia original.



Figura 29. EMBOSS Cons. Herramienta del programa de EMBL-EBI. Tomada de (EMBL, 2013).

Una vez obtenida la secuencia consenso, se analizó mediante la herramienta de BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (**Figura 30**). Esta herramienta permite realizar una búsqueda de homología, comparando la secuencia obtenida con secuencias depositadas en bases de datos genómicas de todo el mundo, facilitando la identificación de las secuencias y su posible relación con otras especies o cepas de interés.

Se consideraron como criterios de validación que el porcentaje de identidad fuera superior al 90%, un E-value cercano a 0 y se registró el número de acceso de la mejor coincidencia obtenida.



Figura 30. BLASTn. Tomada de (National Center for Biotechnology Information, 2025).

V. Resultados y discusión

5.1. Aislamiento de bacterias endófitas

Tras el proceso de desinfección y maceración de raíces, se logró un crecimiento en las placas incubadas, observándose mayor densidad y diversidad en medio R2A comparado con TSA (**Tabla 3**). Esto sugiere que la composición del medio R2A, al tener concentraciones más bajas de nutrientes favorece el crecimiento de bacterias típicas de ambientes naturales como la rizosfera (Reasoner & Geldreich, 1985). Mientras que el medio TSA, al ser más rico, tiende a ser más selectivo, reduciendo la diversidad microbiana visible.

Tabla 3. Crecimiento bacteriano en medio R2A y TSA.

Medio	Numero de Colonias en la Dilución			
	0	1×10^{-1}	1×10^{-2}	1×10^{-3}
R2A	36	6	0	0
TSA	17	3	1	0

Se seleccionaron un total de diez colonias bacterianas que presentaron morfología visible y diferenciada, lo que indica la presencia de distintas especies bacterianas. De estas, siete colonias fueron seleccionadas del medio R2A (**R3, R4, R5, R6, R11, R14 y R1.2**) y tres fueron seleccionadas del medio TSA (**T01, T03 y T10**). La selección visual de colonias con características distintas sugiere una diversidad de especies presentes en *Larrea tridentata* (**Figura 31**).



Figura 31. Crecimiento bacteriano en medio de cultivo R2A y TSA.

5.2. Caracterización morfológica

Las colonias seleccionadas fueron clasificadas según sus características morfológicas mediante la observación con apoyo de una lupa y un estereoscopio. Entre las formas predominantes se encontraron colonias circulares con bordes enteros, elevación convexa y coloraciones crema y blancas como se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de la caracterización morfológica de las colonias bacterianas.

Colonia	Forma	Elevación	Borde	Color
R03	Irregular	Convexa	Ondulado	Blanco
R04	Irregular	Plana	Entero	Crema
R05	Circular	Convexa	Entero	Crema
R06	Circular	Plana	Entero	Blanco
R11	Circular	Convexa	Entero	Translúcido
R14	Filamentosa	Convexa	Filiforme	Blanco
R1.2	Circular	Convexa	Entero	Blanco
T01	Circular	Plana	Entero	Blanco
T03	Circular	Plana	Entero	Blanco
T10	Irregular	Plana	Entero	Crema

Las colonias filamentosas o con bordes filiformes podrían estar asociadas a géneros como *Streptomyces*, caracterizados por su morfología filamentosa y formación de micelios similares a hongos (Kämpfer, 2006). Mientras que las colonias circulares y convexas son comunes en géneros como *Bacillus* y *Paenibacillus* (Logan & Vos, 2015). Además, la textura, color y elevación permiten distinguirlas de posibles hongos, los cuales presentan micelios aéreos y crecimiento algodonoso.

La elección de medios de cultivo también influye en las morfologías observadas. El medio R2A, diseñado originalmente para bacterias heterótrofas de ambientes acuáticos, tiene bajas concentraciones de nutrientes, lo que favorece el crecimiento de bacterias permite el desarrollo de colonias más diversas y menos dominantes, facilitando la detección de microorganismos minoritarios (Reasoner

& Geldreich, 1985). En cambio, el medio TSA que es rico en nutrientes, promueve el crecimiento rápido de bacterias más competitivas, lo que puede promover la aparición de formas más homogéneas (Madigan et al., 1997).

5.3. Amplificación del gen 16S ARNr

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó exitosamente en las diez muestras seleccionadas, utilizando los iniciadores universales 27F y 1429R. Los resultados mostraron bandas nítidas con un tamaño aproximado de 1400 pb (**Figura 32**), lo que corresponde al tamaño esperado (Weisburg et al., 1991). Esta observación confirmó que la amplificación fue exitosa.

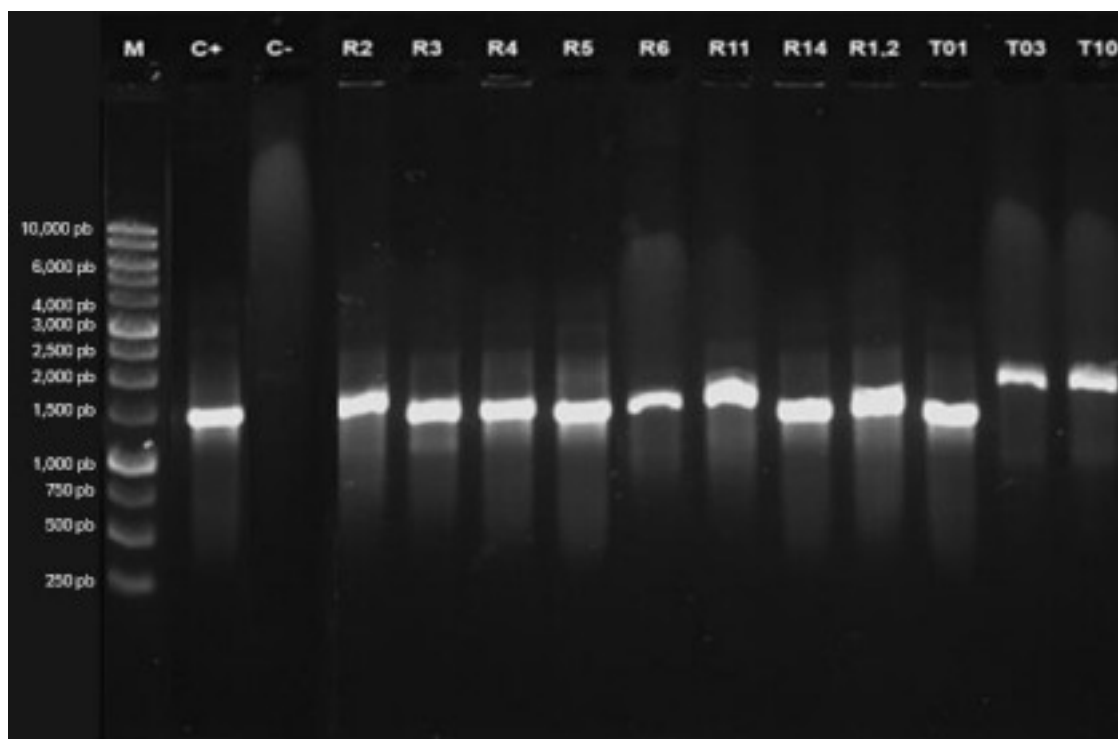


Figura 32. Gel de electroforesis de productos de PCR. (M: Marcador, C+: control positivo, C-: control negativo).

El gen 16S ARNr es ampliamente utilizado en estudios de identificación bacteriana debido a su distribución universal en bacterias, la presencia de regiones conservadas hipervariables, y su base de datos extensa para comparación (Clarridge, 2004). La universalidad del gen permite su aplicación en una gama amplia de bacterias, mientras que las regiones hipervariables ofrecen una resolución suficiente para diferenciar especies.

Además, la región amplificada de aproximadamente 1400 pb abarca una porción considerable del gen 16S, lo cual incrementa la precisión de los análisis filogenéticos (Chakravorty et al., 2007). La elección de los primers 27F y 1429R ha sido documentada en múltiples estudios previos de identificación bacteriana en tejidos vegetales, suelos y ambientes extremos donde han demostrado alta eficacia y especificidad (Weisburg et al., 1991). La amplificación eficiente de esta región respalda la calidad del ADN extraído y la ausencia de bandas en el control negativo confirma la ausencia de contaminación en la reacción (Clarridge, 2004).

5.4. Caracterización molecular

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del gen 16S ARNr fueron sometidas a un proceso de análisis molecular con el objetivo de identificar taxonómicamente las colonias bacterianas. Inicialmente se utilizó el software SnapGene® para visualizar las secuencias generadas por la PCR. Esta herramienta facilitó la inspección manual de las secuencias directas e inversas, permitiendo eliminar regiones de baja calidad (**Figura 34**) y asegurando que solo se consideraran las regiones más fiables (**Figura 33**).

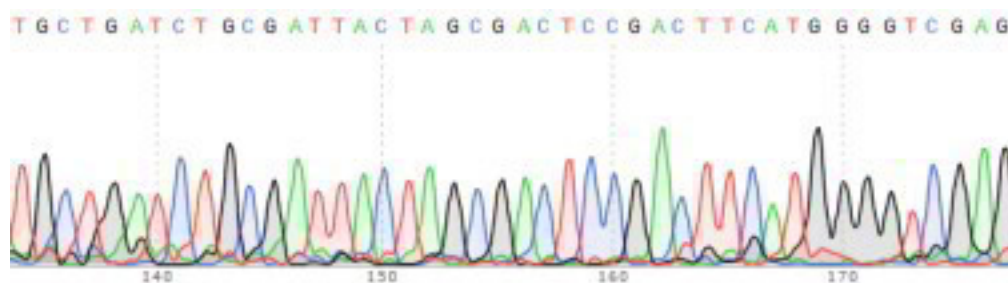


Figura 33. Electroferograma con regiones de alta calidad.

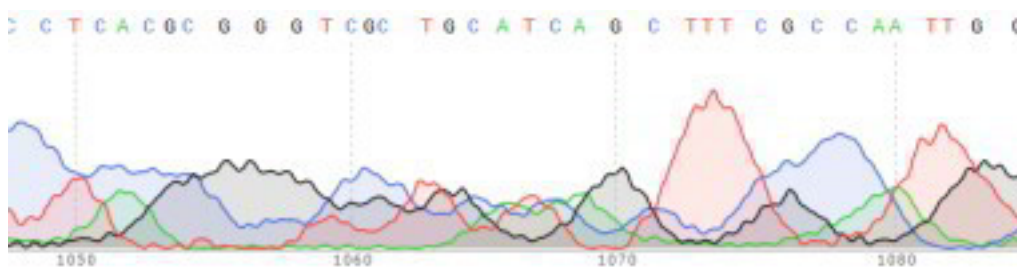


Figura 34. Electroferograma con regiones de baja calidad.

Al utilizar el programa MAFFT para alinear las secuencias directas e inversas y haber generado secuencias consenso para cada muestra, garantiza la fiabilidad del BLAST, ya que minimiza errores derivados de lecturas parciales o señales irregulares.

Las secuencias consenso representan la versión más fiable del fragmento amplificado y mostraron alta calidad, permitiendo identificar las muestras mediante comparación en comparación en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLASTn.

La secuencia consenso comparada en la base de datos del NCBI mediante la herramienta BLAST. Para validar la identificación de las cepas se consideraron como criterios un porcentaje de identidad superior al 90%, un E-value cercano a 0 como se muestra en la **Tabla 5**. Además, se registró el número de acceso de la coincidencia más significativa, el cual permite rastrear la cepa en la base de datos y consultar información taxonómica y genómica asociada.

Tabla 5. Resultados del BLAST de las secuencias del gen 16S ARNr de los aislamientos bacterianos.

Colonia	Género	Especie	Per. Ident	Acc. Len	E VALUE	ACCESION
R03	No determinante	No determinante	-	-	-	-
R04	<i>Bacillus</i>	<i>atrophaeus</i>	99.39	1504	0	LC769482.1
R05	<i>Peribacillus</i>	<i>muralis</i>	99.02	1455	0	MW564009.1
R06	<i>Metabacillus</i>	<i>Idriensis</i>	99.21	1410	0	PP053280.1
R11	No determinante	No determinante	-	-	-	-
R14	<i>Streptomyces</i>	-	96.41	1486	0	MG770721.1
R1.2	<i>Metabacillus</i>	<i>sp.</i>	99.92	1410	0	OR434643.1
T01	<i>Streptomyces</i>	-	96.64	1368	0	MW485118.1
T03	<i>Paenibacillus</i>	-	96.06	1352	0	JQ809432.1
T10	<i>Bacillus</i>	<i>sp</i>	99.28	1387	0	PV428658.1

Los resultados obtenidos permitieron identificar diferentes géneros bacterianos con un alto potencial agrobiotecnológico asociados a *Larrea tridentata*, muchas de las cuales han sido descritas anteriormente como promotoras de crecimiento vegetal.

Entre las bacterias identificadas, se encontraron dos muestras correspondientes a *Metabacillus idriensis*, una especie recientemente reubicada desde el género *Bacillus*, que destaca por su habilidad para producir enzimas extracelulares y degradar compuestos orgánicos complejos, lo que sugiere su posible contribución a la ciclicidad de nutrientes del suelo (Gupta et al., 2020). Aunque su papel como bacteria promotora del crecimiento vegetal aún no está ampliamente documentado, su capacidad metabólica puede resultar útil en la descomposición de materia orgánica, facilitando la liberación de nutrientes esenciales para las plantas, sobre todo en suelos degradados o de poca fertilidad.

Se identificó también a *Peribacillus muralis*, especie con habilidades similares a las de otras del mismo género como *P. simplex*, reconocidas por solubilizar fosfatos, sintetizar sideróforos y tolerar condiciones adversas como suelos secos o con bajo contenido de nutrientes (Alaylar, 2022). Estas características la convierten en una especie candidata para su uso como biofertilizante en regiones semiáridas.

En el caso de *Bacillus atrophaeus*, una bacteria conocida por su capacidad para formar biopelículas, producir compuestos antimicrobianos, y contribuir al control de patógenos en la rizosfera. Al igual que otras especies del mismo género, su presencia es común en suelos agrícolas donde juegan un papel clave en la salud vegetal. (Kumar et al., 2016). Puede emplearse como parte de estrategias de manejo integrado de plagas y enfermedades, reduciendo el uso de pesticidas sintéticos.

Otra muestra fue de *Bacillus sp.*, la cual, aunque no fue determinado a nivel especie, probablemente comparta capacidades similares a otras especies del

género como la producción de hormonas vegetales, enzimas y compuestos antagonistas frente a hongos fitopatógenos (Kumar et al., 2016). Estas características han hecho del género *Bacillus* uno de los más estudiados en productos biotecnológicos aplicados a la agricultura.

En cuanto al género *Paenibacillus*, aunque no se lograra identificar su especie, es un grupo altamente reconocido por producir ACC desaminasa, lo que permite a las plantas tolerar condiciones de estrés abiótico, además de fijar nitrógeno y mejorar el aprovechamiento de nutrientes por parte del hospedero, lo que las hace especialmente útiles como alternativas naturales a los fertilizantes nitrogenados (Hussain et al., 2020).

También se aislaron dos cultivos pertenecientes al género *Streptomyces*, caracterizados por su morfología filamentosa y su capacidad para sintetizar una amplia variedad de compuestos bioactivos, incluyendo antibióticos y promotores de crecimiento. Se ha demostrado que estos microorganismos no solo protegen a las plantas frente a enfermedades del suelo, sino también promueven el desarrollo radicular (Gopalakrishnan et al., 2012). Varias especies de este género ya se utilizan comercialmente como agentes biocontroladores y como parte de consorcios microbianos en biofertilizantes para cultivos como jitomate, soya y papa.

Aunque no se logró identificar con precisión dos de las bacterias, no significa que no sean importantes. De hecho, podrían tratarse de especies poco estudiadas, lo que abre nuevas oportunidades a futuras investigaciones para conocer sus funciones ecológicas y posibles aplicaciones agrícolas.

VI. Conclusión

Realizar esta investigación permitió aplicar de manera práctica distintas herramientas microbiológicas y moleculares para el estudio de bacterias endófitas asociadas a *Larrea tridentata* como la amplificación del gen 16S ARNr, el alineamiento de secuencias y el análisis mediante BLAST para la identificación de comunidades microbianas.

Además, es importante mencionar que esta investigación no solo permitió conocer qué bacterias estaban presentes, sino también obtenerlas en cultivo puro. Esto facilita su preservación y uso en futuros estudios funcionales y ensayos en plantas, pues al contar con ellos hace posible evaluar directamente su efecto en semillas, raíces o suelos mediante bioensayos controlados. Esto representa una ventaja importante frente a otros métodos, ya que permite evaluar directamente el efecto de cada cepa y, eventualmente, diseñar bioinoculantes adaptados a las condiciones de esta región.

Este trabajo también confirmó que en la biodiversidad local existen soluciones reales y potenciales a los problemas del campo; que incluso en plantas nativas como *Larrea tridentata* se pueden encontrar microorganismos con propiedades funcionales importantes como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, actividad enzimática, síntesis de compuestos antimicrobianos y posible fijación de nitrógeno. Estas propiedades son de especial interés por su uso en estrategias sustentables de producción agrícola, sobre todo en regiones de suelos pobres o condiciones climáticas adversas como las del noreste de México.

Considero que el siguiente paso para esta investigación está en realizar pruebas funcionales con las bacterias obtenidas, tanto en condiciones de laboratorio como en campo. Sería interesante evaluar su comportamiento en cultivos locales, su compatibilidad con otros microorganismos para desarrollar alternativas agrobiotecnológicas con impacto positivo en la región.

Referencias

- Ahmed, H. F., Badawy, F. H., Mahmoud, S. M., & El-Dosouky, M. M. (2016). Characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolated from sugarcane (*Saccharum officinarum*) cultivated in upper Egypt. *Assiut J. Agric. Sci*, 47, 569–582.
- Alaylar, B. (2022). Isolation and characterization of culturable endophytic plant growth-promoting *Bacillus* species from *Mentha longifolia* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46(1), 73–82.
- Anwar, S., Ali, A., Ullah, Z., Binjawhar, D. N., Sher, H., Ali, R., Iqbal, R., Ali, B., & Ali, I. (2023). The Impact of *Trichoderma harzianum* Together with Copper and Boron on Wheat Yield. *ACS Agricultural Science & Technology*, 3(6), 517–527. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00076>
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., & Cárdenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 231–239. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.002>
- Atlas, R. M. (2010). *Manual de medios microbiológicos* (CRC Prensa, Ed.; 4ta Edición).
- Backman, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46(1), 1–3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.009>
- Barnum, S. R. (1998). *Biotechnology: An Introduction*. Wadsworth Publishing Company. <https://books.google.com.mx/books?id=i9hGAAAAYAAJ>
- BASF SE. (2017, November 29). *Productos biológicos*. <https://Crop-Solutions.Basf.Com.Au/Biologicals-for-Crops>.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2006). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site.

FEMS Microbiology Ecology, 56(2), 250–261. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00025.x>

Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Berlanga, M. (2000). Microbiología. LM Prescott, JP Harley, DA Klein. *International Microbiology*, 3(3), 198–199.

Blanco-Jarvio, A., Martínez, L. A., & Bautista, G. A. (2014). Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. *CICIMAR Océánides*, 29(2), 37–44.

Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F. F., Andres-Barrao, C., Jalal, R., Alamoudi, S., Razali, R., Alzubaidy, H., Shah, K. H., Siddique, S., Bajic, V. B., Hirt, H., & Saad, M. M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(1), 18154. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>

Cappuccino, J. G., & Welsh, C. T. (2016). *Microbiology: A Laboratory Manual*. Pearson Education. <https://books.google.com.mx/books?id=OtF5CwAAQBAJ>

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>

Chanway, C. P. (1998). *Bacterial endophytes: ecological and practical implications*.

Clarridge, E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.840-862.2004>

- Council, N. R., Sciences, D. on E. and P., Technology, B. on A. S. and, & Applications, C. on O. in B. for F. A. (2001). *Opportunities in Biotechnology for Future Army Applications*. National Academies Press. <https://books.google.es/books?id=Eo9NqrwUaloC>
- Creative Commons. (2021, February 19). *Pseudomonas savastanoi pv retacarpa*. <https://Flickrriver.Com/Photos/Tags/Pseudomonas/Interesting/>.
- del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6)
- Dibut, B., Martínez-Viera, R., Ortega, M., Ríos, Y., Planas, L., Rodríguez, J., & Tejeda, G. (2009). Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus*-cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, 30(4), 0.
- Elbert L. Little, Jr. (2021, August 24). *Área de distribución natural*. https://En.Wikipedia.Org/Wiki/Larrea_tridentata.
- EMBL. (2013, April 28). *Comunicaciones EMBL*. <https://Www.Embl.Org/about/Info/Communications/Blog/2017/09/Embl-Sub-Brands/>.
- Eric. (2010, April 10). *Ramita con botones florales, flores y frutos en Furnace Creek en Death Valley N.P.* https://En.Wikipedia.Org/w/Index.Php?Title=Larrea_tridentata&oldid=1271900615.
- Fernández, L., Castaño, C., García, P., Saran, A., Lorda, G., & Merini, L. (2023). Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria (PGPB) from *Larrea divaricata* Cav., with potential use in phytoremediation of mining soils. *Environmental Sustainability*, 6(2), 271–281. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00272-x>

- Freites, J. C. (2015). *Identificación molecular del contenido de lactobacillus de muestras de leche materna humana y de heces del neonato en lactancia exclusiva*. [Universidad Central de Venezuela]. <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/13336/1/TESIS%20JC%202015.pdf>
- Glaeser, S. P., Dott, W., Busse, H.-J., & Kämpfer, P. (2013). *Fictibacillus phosphorivorans* gen. nov., sp. nov. and proposal to reclassify *Bacillus arsenicus*, *Bacillus barbaricus*, *Bacillus macauensis*, *Bacillus nanhaiensis*, *Bacillus rigui*, *Bacillus solisalsi* and *Bacillus gelatini* in the genus *Fictibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt_8), 2934–2944.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A Model For the Lowering of Plant Ethylene Concentrations by Plant Growth-promoting Bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Gopalakrishnan, S. , P. H. P. H., Srinivas Vadlamudi, S. V., Rajendran Vijayabharathi, R. V., Bhimineni, R. K., & Om Rupela, O. R. (2012). *Plant growth-promoting traits of Streptomyces with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost*.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5753–5798.

- Hernández-Baez, I., LOPEZ, J. C., Espinosa-Reyes, G., Lee Rangel, H., Faz-Colunga, D., & Pinos-Rodriguez, J. (2019). Creosote bush (*Larrea tridentata*) biomass as fodder for sheep. *Revistas Chapingo Serie Zonas Áridas*, *18*, 1–9. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2019.09.023>
- Hernández-Zamudio, G., Sáenz-Mata, J., Moreno-Reséndez, A., Castañeda-Gaytán, G., Ogaz, A., Carballar-Hernández, S., & Hernández-Cuevas, L. (2018). Dinámica de la diversidad temporal de los hongos micorrícicos arbusculares de *Larrea tridentata* (Sesse & Mocino ex DC) Coville en un ecosistema semiárido. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(3), 301–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.007>
- Hungria, M., & Mendes, I. C. (2015). Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? In *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 1009–1024). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>
- Hunter, K. L., Betancourt, J. L., Riddle, B. R., Van Devender, T. R., Cole, K. L., & Spaulding, W. G. (2001). Ploidy race distributions since the Last Glacial Maximum in the North American desert shrub, *Larrea tridentata*. *Global Ecology and Biogeography*, *10*(5), 521–533.
- Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2003). *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *Journal of Biotechnology*, *106*(2), 169–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.010>
- Hussain, A., Ahmad, M., Nafees, M., Iqbal, Z., Luqman, M., Jamil, M., Maqsood, A., Mora-Poblete, F., Ahmar, S., & Chen, J.-T. (2020). Plant-growth-promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species improve the nutritional status of *Triticum aestivum* L. *Plos One*, *15*(12), e0241130.
- Joe Rubin. (2017, April 18). *Bacillus cereus*. <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/33735589730/in/photostream/>.
- Kämpfer, P. (2006). The family Streptomycetaceae, part I: taxonomy. *The Prokaryotes*, *3*, 538–604.

- Kazutaka Katoh. (2013). *MAFFT*. <https://Mafft.Cbrc.Jp/Alignment/Software/>.
- King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44(2), 301–307.
- Kumar, A., Singh, R., Yadav, A., Giri, D. D., Singh, P. K., & Pandey, K. D. (2016). Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Curcuma longa* L. *3 Biotech*, 6(1), 60. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0393-y>
- Laport, R. G., Minckley, R. L., & Ramsey, J. (2012). Phylogeny and cytogeography of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Systematic Botany*, 37(1), 153–164.
- Laport, R. G., Minckley, R. L., & Ramsey, J. (2016). Ecological distributions, phenological isolation, and genetic structure in sympatric and parapatric populations of the *Larrea tridentata* polyploid complex. *American Journal of Botany*, 103(7), 1358–1374.
- Lifeder. (2021, April 27). *Enterobacterias*. <https://www.lifeder.com/enterobacterias/>.
- Logan, N. A., & Vos, P. De. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–163.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). *Brock biology of microorganisms* (Vol. 11). Prentice hall Upper Saddle River, NJ.
- McAllister, T. A., Dunière, L., Drouin, P., Xu, S., Wang, Y., Munns, K., & Zaheer, R. (2018). Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science*, 101, 4060–4074. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>
- Morales-Márquez, R., Delgadillo-Ruiz, L., Esparza-Orozco, A., Delgadillo-Ruiz, E., Bañuelos-Valenzuela, R., Valladares-Carranza, B., Chávez-Ruvalcaba, M. I., Chávez-Ruvalcaba, F., Valtierra-Marín, H. E., & Gaytán-Saldaña, N. A. (2025). Evaluation of *Larrea tridentata* Extracts and Their Antimicrobial

Effects on Strains of Clinical Interest. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(3), 1032.

Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Madariaga-Navarrete, A., Higuera-Piedrahita, R. I., Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., & Zaragoza-Bastida, A. (2022). Phytochemical compounds and pharmacological properties of *larrea tridentata*. *Molecules*, 27(17), 5393.

Moreno Herrera, C. X., Gómez Ocampo, E., Pérez, O., Romero, M., & Cadavid, G. E. (2010). *Actividad antimicrobiana de bacterias asociadas al caracol pala (strombus gigas) de la costa caribe colombiana*. Universidad Nacional de Colombia - Sede Caribe. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/73844>

Muñoz, B., & Sakurada, A. (2018). *Herbaspirillum* spp. *Revista Chilena de Infectología*, 35, 545–546.

MycoApply. (2015, April 14). *MycoApply® Inyector Endo*. <https://Mycorrhizae.Com/Mycoapply-Inyector-Endo-Organic/>.

Nathan Reading. (2013, February 12). *Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter on Columbia Horse Blood Agar*. <https://www.flickr.com/photos/54976525@N08/8468059793>.

National Center for Biotechnology Information. (2025, January 12). *BLAST*. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?QUERY=NLLTNFHGMDFTTDKL&LAYOUT=OneWindows&AUTO_FORMAT=Fullauto.

Nie, S., Liang, W., Mo, W., Miao, B., Wu, D., Peng, M., Crespo, R., & Sanjuán, O. (2021). Pilot Study Analysis Based on Various Fertilizers on Grape Cropping Cultivation using Advanced Temperature and Time agricultural bio-ethanol harvest. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, *In Press*. <https://doi.org/10.1007/s00477-020-01921-x>

Ortiz-Estrada, Á. M., Martínez-Porchas, M., & Vargas-Albores, F. (2017). La secuencia completa del gen arn ribosomal 16s, una promesa para mejorar la

precisión en la asignación taxonómica microbiana. *Diagnóstico, Tendencias En Investigación y Áreas de Oportunidad*, 50–62.

Pérez, A., & Chamorro, L. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 5(2), 439–462.

Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347–375.

Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362–370. *Plant Soil*, 287, 77–84.

Pitt, J. I. (2009). *Fungi and food spoilage*. Springer.

Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>

Redazione Microbiologia Italia. (2021, April 20). *Colpo di fuoco batterico*. <https://www.microbiologiaitalia.it/fitopatologia/colpo-di-fuoco-batterico/>.

Reinhold-Hurek, B., & Hurek, T. (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 435–443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>

Reyes-Melo, K. Y., Galván-Rodrigo, A. A., Martínez-Olivo, I. E., Núñez-Mojica, G., Ávalos-Alanís, F. G., García, A., & del Rayo Camacho-Corona, M. (2021). *Larrea tridentata* and its Biological Activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 21(26), 2352–2364.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4), 319–339. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)

- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(8), 827–837.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, *278*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Issue v. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://books.google.com.mx/books?id=Bosc5JVxNpkC>
- Sánchez-Bautista, A., León-García de Alba, C. De, Aranda-Ocampo, S., Zavaleta-Mejía, E., Nava-Díaz, C., Goodwin, P. H., & Leyva-Mir, S. G. (2018). Bacterias endófitas de la raíz en líneas de maíces tolerantes y susceptibles a sequía. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *36*(1), 35–55.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, *183*, 92–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- SlideShare. (2025). *Nutricion, cultivo y crecimiento microbiano*. <https://Es.Slideshare.Net/Slideshow/Nutricion-Cultivo-y-Crecimiento-Microbiano/14361398>.
- SnapGene. (2025, January 30). *SnapGene*. <https://www.snapgene.com/>.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*(4), 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Stéphane, C., Brion, D., Jerzy, N., Christophe, C., & Ait, B. E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental*

- Microbiology*, 71(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- T S, A., & Borkar, S. G. (2020). *Crop host specificity of Xanthomonas campestris pv. vesicatoria prevalent in Nashik district in India*.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and Development*.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249–266.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., & Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques*, 29(1), 52–54. <https://doi.org/10.2144/00291bm09>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297–313.
- Vera Loor, M. A., Bernal Cabrera, A., Leiva Mora, M., Vera Loor, A. E. A., Vera Coello, D., Peñaherrera Villafuerte, S., Solís Hidalgo, K., Terrero Yépez, P., & Jiménez Guerrero, V. E. (2018). Microorganismos endófitos asociados a Theobroma cacao como agentes de control biológico de Moniliophthora roreri. *Centro Agrícola*, 45(3), 81–87.
- Vincent, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root-nodule Bacteria*. [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific. <https://books.google.com.mx/books?id=dcQcAQAAIAAJ>
- Vuna Agri. (2021, November 22). *Rizovital*. <https://Vuna-Agri.Co.Za/Rhizovital/>.
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting

rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13–24.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>

Wani, P. A., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2007). Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(2), 283–287.

Wao Bioteconlogía. (2020, February 8). *Phân bón vi sinh cố định đạm Azotobacterin*. <https://Nongnghiepthuanthien.vn/San-Pham/Phan-Bon-vi-Sinh-Azotobacterin-Thanh-Chau/>.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Woese, C. R. (2002). On the evolution of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8742–8747.
<https://doi.org/10.1073/pnas.132266999>