



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Ciencias Agropecuarias

Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano.

TESIS

(idónea Comunicación de Resultados)

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

QFB. Leilani Itzel Salinas Virgen.

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Hugo César Ramírez-Saad.

Asesores:

Dr. José Félix Aguirre Garrido.

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández.

Septiembre 2019

COMITÉ TUTORAL.

DIRECTOR:

Dr. Hugo César Ramírez Saad.

Profesor-Investigador. Laboratorio de Ecología Molecular. Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Nacional Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

ASESOR:

Dr. José Félix Aguirre Garrido.

Profesor-Investigador. Laboratorio de Biotecnología Ambiental. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma.

ASESOR:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández.

Catedrática CONACYT, comisionada a la UAM Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

COMISIÓN DE EVALUACIÓN.

El jurado designado por la Comisión de Evaluación de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco aprobó la Tesis titulada “**Identificación y caracterización de la actividad PGPR de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de Echinocactus platyacanthus (biznaga dulce) creciendo en condiciones silvestres y de invernadero en el semidesierto queretano**”, que presentó:

QFB. Leilani Itzel Salinas Virgen.

PRESIDENTE:

Dr. Juan Esteban Barranco Florido. _____

Profesor-Investigador. Laboratorio de biotecnología. Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

SECRETARIA:

Dra. María Eugenia de la Torre Hernández. _____

Catedrática CONACYT, comisionada a la UAM Xochimilco. Departamento de Producción Agrícola y Animal. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

VOCAL:

Dr. Jesús Israel Morales Jiménez. _____

Catedrático CONACYT. Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

El programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, en el Nivel “En desarrollo” clave 000357.

La ponente tuvo apoyo proporcionado por CONACYT a través de la beca con número de registro 620104.

DEDICATORIA.

Es mi deseo dedicar, con todo mi cariño, esta tesis y todo el trabajo que representa:

A mis padres, **Obdulia y Antonio**, quienes, con todo el amor del mundo, entre esfuerzos y sacrificios, han hecho todo lo posible para darme lo mejor que tengo en la vida, una buena educación; quienes me han apoyado incondicionalmente en todas las decisiones importantes de mi vida y han dado todo lo que está en sus manos para que yo llegue a lograr todas mis metas y cumplir todos mis sueños.

A **Yaretzi**, mi niña adorada, el motor de mi vida y la luz de mis días.

A mi familia (a mis hermanas **Arlene y Esther**, y a mis sobrinos **Aislinn, Michelle, Ian y Danna**), que siempre ha creído en mí y me apoya incondicionalmente en cada etapa de mi vida.

Y, por último, pero no menos importante, a **Samuel**, mi compañero en el camino de la vida, quien comparte mis sueños y mis metas y los vuelve suyos al apoyarme incondicionalmente para alcanzarlos, quien me ha acompañado durante toda mi formación profesional comprendiéndome, aconsejándome, escuchándome y confiando siempre en mí.

Los amo, sin ustedes este sueño no sería hoy una realidad.

AGRADECIMIENTOS.

A mi comité tutorial, mis modelos a seguir:

Con afecto, respeto y admiración, a mi director el **Dr. Hugo César Ramírez Saad** por haber dirigido este proyecto, por haberme guiado de la mejor manera durante mi formación en este posgrado, por brindarme su apoyo y su confianza, por su paciencia y comprensión, por todos los conocimientos que me ha transmitido y por enseñarme la mejor cara de la grandeza.

Con cariño, respeto y admiración, a mi asesora la **Dra. María Eugenia de la Torre Hernández** en primer lugar por haberme invitado a trabajar en este proyecto, por haber sido una buena guía para mi todo este tiempo, por todos los conocimientos que me ha brindado, por su apoyo, confianza, paciencia, comprensión y consejos, entre muchas cosas más, pero sobre todo por su preciada amistad.

Con afecto, respeto y admiración, a mi asesor el **Dr. José Félix Aguirre Garrido** por ser un buen guía, por su paciencia, comprensión, apoyo y confianza, y por todos los conocimientos que me ha brindado.

A mis profesores, el **Dr. Esteban Barranco**, el **Dr. Fidel Payán**, el **Dr. Ramón Soriano**, la **Dra. Leydi Rivera**, el **Dr. Gabriel Campos**, la **Dra. Alejandra Caballero**, la **Dra. Patricia Bárcenas** y el **Dr. Adolfo Álvarez** por haber contribuido para que tuviera una excelente formación durante el periodo escolarizado de este posgrado.

A los chicos de servicio social **Cristina** y **Gabriel** por su trabajo y esmero.

A mis compañeros de laboratorio **Alejandra, Daniel, Yovani, Verónica, Valeria, Viky y José Luis** por haber hecho grata la estadía en el laboratorio, por su apoyo, compañía, consejos, pero sobre todo su amistad.

A la **Dra. Alejandra Miranda** por haberme proporcionado los hongos para la prueba de biocontrol realizada.

A la **Dra. Alma Piñeiro** del departamento El Hombre y su Ambiente de la UAM Xochimilco y a la **Dra. Berenice García Ponce de León** del Instituto de Ecología de la UNAM, por haberme proporcionado las semillas de *A. thaliana* para realizar la prueba *in planta*.

Al **Dr. José Arévalo** por haberme permitido usar su cámara de crecimiento.

Y a todos los que contribuyeron de alguna manera a mi crecimiento personal y profesional, y al desarrollo de este proyecto y tesis de maestría.

ABREVIATURAS

16S rRNA: gen 16S ribosomal.

ADH: Prueba bioquímica que evalúa actividad Arginina Dihidrolasa.

ADI: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Ácido Adípico.

API 20 NE: Galería de 20 pruebas bioquímicas para no enterobacterias.

ARA: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Arabinosa.

CAM: Crassulaceae Acid Metabolism. Metabolismo Ácido de las Crasuláceas.

CAP: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Ácido Caprico.

CAT: Prueba bioquímica que evalúa actividad Catalasa.

CIT: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Citrato Trisódico.

CITES: Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre.

ddNTP's: Didesoxi nucleótidos trifosfato.

DNA: Deoxyribonucleic Acid. Ácido Desoxirribonucleico.

ESC: Prueba bioquímica que evalúa hidrólisis de Esculina (actividad β -Glucosidasa).

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno.

GEL: Prueba bioquímica que evalúa hidrólisis de Gelatina (actividad Proteasa).

GLU: Prueba bioquímica que evalúa fermentación/asimilación de Glucosa.

GNT: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Gluconato Potásico.

IAA: Indoleacetic Acid. Ácido Indolacético.

IAM: Vía indol-3-acetamida para la síntesis de IAA.

IAN: Vía del indol-3-acetonitrilo para la síntesis de IAA.

IPyA: Vía del ácido indol-3-piruvico para la síntesis de IAA.

MAL: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Maltosa.

MAN: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Manitol.

Mb: Mega bases.

MLT: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Ácido Málico

MNE: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Manosa.

N: Nitrógeno.

N₂: Nitrógeno molecular.

NAG: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de N-Acetil-Glucosamina.

NO₃: Prueba bioquímica que evalúa la reducción de nitratos a nitritos o nitrógeno,

NOM: Norma Oficial Mexicana.

ONU: Organización de las Naciones Unidas.

OX: Prueba bioquímica que evalúa actividad oxidasa.

P: Fósforo.

³²P: Isótopo radioactivo de fósforo.

PAC: Prueba bioquímica que evalúa asimilación de Ácido Fenilacético.

pb: Pares de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PGPR: Plant Growth Promotion Rhizobacteria. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas.

PNG: Prueba bioquímica que evalúa actividad β-Galactosidasa.

REA: Enzymatic Restriction Analysis. Análisis de Restricción Enzimática.

TAM: Vía de la triptamina para la síntesis de IAA.

TRP: Prueba bioquímica que evalúa la formación de Indol.

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

URE: Prueba bioquímica que evalúa actividad Ureasa.

RESUMEN

Aproximadamente el 60% del territorio mexicano está conformado por zonas áridas y semiáridas donde se desarrollan numerosas especies de plantas, principalmente cactáceas. Por influencia de diversos factores, un gran número de ellas se encuentran en riesgo de extinción, como sucede con *Echinocactus platyacanthus*. Esta situación genera la necesidad de plantear medidas para su protección, como la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que coadyuven en el desarrollo y supervivencia de esta cactácea.

Dado que se desconoce qué microorganismos están presentes en la rizosfera de *E. platyacanthus* y qué función desempeñan en el crecimiento y desarrollo de la misma, en este trabajo se identificó la composición de la fracción cultivable de esta comunidad bacteriana a través de un análisis filogenético, además de caracterizar las actividades PGPR de algunos aislados bacterianos *in vitro*. Por otra parte, se determinó el perfil bioquímico de algunas de estas cepas en estudio y se evaluó su efecto en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, tras la inoculación de plántulas con estas mismas cepas.

Se obtuvieron 45 aislados y fue posible identificar taxonómicamente a 36 de ellos. El 100% de las cepas en estudio fueron capaces de solubilizar fosfato y producir ácido indolacético en diferentes proporciones; además, cerca del 60% ejercen algún nivel de biocontrol sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y/o *Ustilago maydis*. El perfil bioquímico de las cepas seleccionadas, indica que son capaces de asimilar diferentes sustratos y realizar actividades enzimáticas relacionadas con su capacidad promotora del crecimiento vegetal.

La inoculación de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con las cepas bacterianas seleccionadas provocó, en algunos de los tratamientos, un incremento en el desarrollo de las plantas, evaluado como porcentaje de supervivencia, tiempo de aparición de tallos e inflorescencias, altura del cuerpo aéreo, diámetro de la roseta, número de inflorescencias y presencia o ausencia de hojas caulinares. Fue posible observar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos, con ANOVA y prueba de diferencia de medias de TUKEY ($p < 0.05$).

Palabras clave: rizosfera, *E. platyacanthus*, PGPR, fosfato, IAA, biocontrol, *A. thaliana*.

ABSTRACT.

Approximately 60% of the Mexican territory is made up of arid and semi-arid areas where numerous plant species, mainly cacti, develop. Under the influence of various factors, a large number of them are at risk of extinction, as is the case with *Echinocactus platyacanthus*. This situation creates the need to propose measures for its protection, such as the use of plant growth promoting bacteria (PGPR) that contribute to the development and survival of this cacti.

Since it is unknown what microorganisms are present in the rhizosphere of *E. platyacanthus* and what role they play in the growth and development of the plant, in this work, the composition of the cultivable fraction of this bacterial community was identified through a phylogenetic analysis, in addition to characterizing the PGPR activities of some bacterial isolates *in vitro*. On the other hand, the biochemical profile of some of these strains under study was determined and their effect on the growth of *Arabidopsis thaliana* was evaluated, after inoculation of seedlings with these same strains.

45 isolates were obtained and it was possible to taxonomically identify 36 of them. 100% of the strains under study were able to solubilize phosphate and produce indolacetic acid in different proportions. In addition, about 60%, develop some level of biocontrol over the phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and/or *Ustilago maydis*. The biochemical profile of the selected strains indicates that they are able to assimilate different substrates and perform enzymatic activities related to their plant growth promoting capacity.

The inoculation of *Arabidopsis thaliana* seedlings with the selected bacterial strains caused, in some of the treatments, an increase in the development of the plants, evaluated as percentage of survival, time of appearance of stems and inflorescences, height of the aerial body, diameter of the rosette, number of inflorescences and presence or absence of caulinary leaves. It was possible to observe statistically significant differences between the results obtained, with ANOVA and TUKEY mean difference test ($p < 0.05$).

Keywords: rhizosphere, *E. platyacanthus*, PGPR, phosphate, IAA, biocontrol, *A. thaliana*.

Contenido.

COMITÉ TUTORAL.....	i
COMISIÓN DE EVALUACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. Índice de figuras.....	1
2. Índice de tablas.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1 Zonas áridas y semiáridas de México.....	3
3.1.1. Semidesierto Queretano.....	4
3.1.2. Desertificación.....	6
3.2. Diversidad vegetal de México.....	7
3.3. Familia Cactaceae.....	7
3.3.1. Características de las cactáceas.....	8
3.3.1.1. Resistencia a la aridez.....	8
3.3.1.2. Suculencia.....	9
3.3.1.3. Metabolismo CAM.....	9
3.3.1.4. Sistema radicular de las cactáceas.....	10
3.3.2. Proceso de estabilización del suelo por cactáceas.....	10
3.3.3. <i>Echinocactus platyacanthus</i>	11
3.4. Rizósfera.....	14
3.4.1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPR).....	15
3.4.2. Bacterias endófitas.....	15
3.4.3. Mecanismos de promoción del crecimiento.....	15
3.4.3.1. Fijación de nitrógeno.....	16
3.4.3.2. Solubilización de fosfatos.....	18
3.4.3.3. Producción de fitohormonas.....	20
3.4.3.4. Biocontrol de fitopatógenos.....	22
3.4.3.5. Utilidad de las PGPR.....	24
3.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental.....	26

3.5.1. Ciclo vital.....	28
3.5.2 Estudios de PGPR en <i>A. thaliana</i>	29
3.6. Análisis filogenético	30
3.6.1. Gen 16S rRNA.	31
4. ANTECEDENTES.....	33
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	34
6. HIPÓTESIS.....	34
7. OBJETIVOS.	34
7.1 Objetivo General.	34
7.2. Objetivos específicos.....	34
8. METODOLOGÍA.....	35
8.1. Siembra de bacterias.....	35
8.2. Extracción de DNA.....	35
8.3. Amplificación y purificación del gen 16S rRNA.	35
8.4. Secuenciación tipo Sanger.....	35
8.5. Análisis filogenético.....	35
8.6. Determinación <i>in vitro</i> de actividades promotoras del crecimiento vegetal....	36
8.6.1. Fijación biológica de nitrógeno.....	36
8.6.2. Solubilización de fosfato.....	37
8.6.3. Producción de ácido indol acético.....	37
8.6.4. Biocontrol de fitopatógenos.	37
8.7. Caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas para realizar pruebas <i>in planta</i>	38
8.8. Determinación de actividad <i>in planta</i>	38
8.9. Análisis estadístico.....	40
9. RESULTADOS.....	41
9.1 Extracción de DNA.....	41
9.2. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA.	41
9.3. Identificación bacteriana.	42
9.4. Análisis filogenético.....	43
9.5. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	46
9.5.1. Fijación biológica de nitrógeno.....	46
9.5.2. Solubilización de fosfato.....	48

9.5.3. Producción de ácido indolacético.....	50
9.5.4. Biocontrol de fitopatógenos.....	52
9.6. Caracterización bioquímica.....	55
9.7. Determinación de actividad <i>in planta</i>	57
10. DISCUSIÓN.....	61
11. CONCLUSIONES.....	70
12. REFERENCIAS.....	72
13. ANEXOS.....	83
ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones.....	83
ANEXO II. Protocolo de extracción de DNA.....	86
ANEXO III. Electroforesis de DNA.....	87
ANEXO IV. Amplificación de genes por PCR.....	88
Amplificación del gen 16S por PCR.....	88
Amplificación del gen <i>nifH</i>	89
ANEXO V. Protocolo de purificación de productos de PCR.....	91
ANEXO VI. Análisis bioinformático.....	92
ANEXO VII. Cuantificación celular en cultivos.....	94
ANEXO VIII. Solubilización de fosfato.....	95
ANEXO IX. Producción de IAA.....	97
ANEXO X. Biocontrol de fitopatógenos.....	98
ANEXO XI. Caracterización bioquímica.....	99
ARTÍCULO.....	100
CURSOS.....	111
CONGRESOS.....	113

1. Índice de figuras.

Figura 1: Localización del Desierto Chihuahuense, Semidesierto Queretano y ubicación del Cuadrante de Tolimán.	4
Figura 2: Estabilización del suelo por cactáceas.	10
Figura 3: <i>Echinocactus platyacanthus</i> (biznaga dulce).	12
Figura 4: Rizósfera. Colonización por microorganismos atraídos por los exudados de raíz	14
Figura 5: Ciclo biogeoquímico del nitrógeno.	16
Figura 6: Complejo nitrogenasa y reducción de N_2 a NH_3	17
Figura 7: Solubilización de fosfato inorgánico mediada por la producción de un ácido orgánico.	19
Figura 8: Hidrólisis enzimática de fosfato orgánico.	20
Figura 9: Síntesis de IAA a partir de triptófano.	21
Figura 10: Representación esquemática de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Figura 11: Ciclo de vida de <i>A. thaliana</i>	29
Figura 12: Estructura secundaria del gen 16S rRNA.	31
Figura 13: Sitios de unión a primers específicos para la amplificación del gen 16S rRNA.	32
Figura 14: Representación esquemática del cultivo de un hongo y una bacteria para evaluar su relación antagonista.	38
Figura 15: Patrón de distribución para la siembra de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> en cajas Petri con medio MS sólido.	39
Figura 16: Gel de electroforesis para visualizar DNA genómico	41
Figura 17: Gel de electroforesis para visualizar el gen 16S rRNA amplificado por PCR. .	42
Figura 18: Árbol filogenético de las bacterias en estudio.	45
Figura 19: Gel de electroforesis para la visualización del gen <i>nifH</i> amplificado por PCR con primers universales.	46
Figura 20: Gel de electroforesis para la visualización del gen <i>nifH</i> amplificado por PCR con primers Entero.	47
Figura 21: Solubilización de fosfato en medio NBRIP+BPB.	48
Figura 22: Capacidad de solubilización de fosfato medida como índice de solubilización	49
Figura 23: Cuantificación de fosfato soluble en medio líquido NBRIP.	50
Figura 24: Producción de ácido indolacético en medio Burk sin fuente de nitrógeno.	51
Figura 25: Biocontrol ejercido sobre el hongo fitopatógeno <i>Fusarium solani</i>	52
Figura 26: Biocontrol ejercido sobre el hongo fitopatógeno <i>Ustilago maydis</i>	53
Figura 27: Desarrollo de <i>A. thaliana</i> en caja Petri (medio MS) durante las tres semanas pre-inoculación.	57
Figura 28: Controles de inoculación de <i>A. thaliana</i>	58
Figura 29: Desarrollo de <i>A. thaliana</i> en maceta.	58
Figura 30: Representación esquemática del cultivo de un hongo y una bacteria para evaluar su relación antagonista.	98
Figura 31: Forma en que se observan los resultados de las pruebas de la galería API 20NE.	99

2. Índice de tablas.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la biznaga dulce.....	11
Tabla 2: Categorías de riesgo de especies vegetales amenazadas según diferentes normatividades. En negritas se destacan las categorías en las que está considerada la biznaga dulce.	13
Tabla 3: Estudios sobre el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en diferentes cultivos.....	24
Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Tabla 5: <i>Primers</i> utilizados para la amplificación del gen <i>nifH</i>	36
Tabla 6: Identificación bacteriana de acuerdo con las bases de datos de GenBank y EZTaxon.	44
Tabla 7: Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium solani</i> por las bacterias en estudio que dieron positivo para esta prueba.	52
Tabla 8: Inhibición del crecimiento de <i>Ustilago maydis</i> por las bacterias en estudio que dieron positivo para esta prueba.	54
Tabla 9: Perfil bioquímico de las cepas seleccionadas para realizar pruebas <i>in planta</i>	56
Tabla 10: Parámetros de crecimiento evaluados en <i>Arabidopsis thaliana</i> sometida a diferentes tratamientos	60
Tabla 11: Mezcla de reacción para amplificación del gen 16S rRNA por PCR.....	88
Tabla 12: Programa de amplificación de gen 16S rRNA para termociclador.....	88
Tabla 13: Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR con <i>primers</i> universales.	89
Tabla 14: Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR con <i>primers</i> específicos.	89
Tabla 15: Programa de amplificación del gen <i>nifH</i> para termociclador con <i>primers</i> generales.....	89
Tabla 16: Programa de amplificación del gen <i>nifH</i> para termociclador con <i>primers</i> específicos.	89
Tabla 17: <i>Primers</i> universales utilizados para la amplificación del gen <i>nifH</i>	90
Tabla 18: <i>Primers</i> específicos utilizados para la amplificación del gen <i>nifH</i>	90
Tabla 19: Soluciones de la curva patrón para la producción de IAA.....	97

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Zonas áridas y semiáridas de México.

Las zonas áridas, de acuerdo con González Medrano (2012), “son aquellas regiones cuya provisión de agua es deficiente, su precipitación y su humedad atmosféricas suelen ofrecer valores muy por debajo del promedio mundial anual”. La precipitación pluvial media anual mundial es de 840 mm; para la República Mexicana, es de 780 mm, por lo tanto, son consideradas regiones áridas aquellas en las que la evaporación potencial es mayor que la lluvia anual, de acuerdo con esto, las zonas áridas están designadas como aquellas en las que las precipitaciones anuales son de 250 mm o menos y las semiáridas, en donde la precipitación se encuentra entre 250 y 500 mm anuales.

Una de las principales características de las zonas áridas es su tipo de suelo que, por lo regular, se presenta en planicies y es poco desarrollado. En zonas pobremente drenadas el contenido de sales es alto. La cantidad de agua acumulada en el suelo determina la disponibilidad de agua para las plantas, que a su vez, depende de la humedad derivada de la precipitación, de la pérdida por evaporación o por evapotranspiración, de la textura del suelo (de arenosa a arcillosa) su extensión y de la profundidad de la percolación, además de que el golpeteo de las gotas de lluvia erosionan el suelo y compactan su superficie reduciendo la porosidad del mismo y la permeabilidad del agua que también se ve afectada por el alto contenido de sales como el sodio (González-Medrano, 2012).

Aunado al tipo de suelo, los niveles de humedad en una región se ven altamente influenciados por diversos factores como: las altas temperaturas (que generan que la evaporación de agua sea mayor), la altitud (ya que a menor altura sobre el nivel del mar hay mayor temperatura y, por lo tanto, mayor evaporación), y las estaciones del año (ya que la evapotranspiración varía durante las mismas) (González-Medrano, 2012).

Las principales causas de la aridez del norte de México son: la ubicación geoespacial -que coincide con una región de alta presión subtropical y anticiclónica- que disminuye el contenido de humedad en el área, y la orografía ya que las regiones montañosas como la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico Transversal impiden el paso de vientos húmedos al área rodeada por estas regiones (González-Medrano, 2012).

En México, las zonas áridas y semiáridas representan aproximadamente el 60% del territorio nacional (CONAZA, 2019), con una dimensión aproximada de 100 millones de hectáreas (Granados-Sánchez *et al.*, 2013), es uno de los tres países del continente americano que más regiones de este tipo contiene, ya que contribuye con el 18% de la superficie total de las zonas áridas de América Latina y el Caribe (Verbist, 2010).

Una de las regiones más representativas y de gran importancia biológica es el desierto de Chihuahua, que comprende 507 mil kilómetros cuadrados, abarcando parte del sur de Estados Unidos y las zonas norte y centro de México. Constituye un centro de diversidad de la flora mexicana ya que en él se concentran 329 especies de cactáceas, que representan el 60% de las especies mexicanas y más del 20% del total continental (Hernández *et al.*, 2007).

3.1.1. Semidesierto Queretano.

La región conocida como semidesierto queretano está ubicada en el extremo sur del desierto de Chihuahua, constituye un núcleo de diversidad y endemismo biológico ya que alberga un gran número de cactáceas como la biznaga dulce (*Echinocactus platyacanthus*), la biznaga burra (*Astrophytum ornatum*), la biznaga dorada (*Echinocactus grusonii*), el organito (*Echinocereus schmollii*), el órgano dorado (*Neobuxbaumia polylopha*), la bolita de hilo (*Mammillaria herrerae*) y la biznaguita (*Thelocactus hastifer*) (Hernández *et al.*, 2007; Meza-Nivón, 2011).

El semidesierto queretano, es una fracción de la zona árida Querétaro-hidalguense comprendida por cinco municipios del estado de Querétaro: Tolimán, Cadereyta, Colón, Peñamiller y Ezequiel Montes, además de tres municipios del estado de Hidalgo: Tecozautla, Zimapán y Huichapan, mismos que albergan al llamado cuadrante de Tolimán (Figura 1), área geográfica delimitada, utilizada principalmente para el estudio de la biodiversidad de la región por poseer la mayor riqueza cactológica del desierto de Chihuahua (Hernández *et al.*, 2007; Hernández-Oria *et al.*, 2007; Hernández-Magaña *et al.*, 2012).

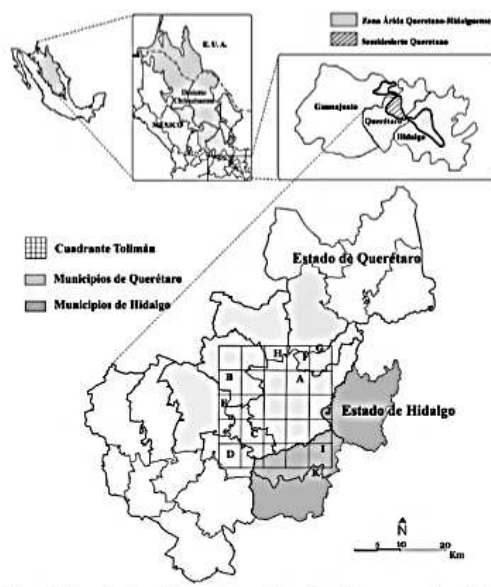


Figura 1: Localización del Desierto Chihuahuense, Semidesierto Queretano y ubicación del Cuadrante de Tolimán. Municipios del estado de Querétaro: A. Cadereyta; B. Tolimán; C. Ezequiel Montes; D. Tequisquiapan; E. Colón; F. San Joaquín; G. Pinal de Amoles; H. Peñamiller. Municipios del estado de Hidalgo: I. Tecozautla; J. Zimapán; K. Huichapan. Fuente: Hernández-Oria, 2007.

Es una región con gran variedad fisiográfica y climatológica que comprende climas secos en las zonas más altas y semihúmedos en las zonas más bajas. La presencia de la Sierra Madre Oriental impide el paso del aire húmedo procedente del Golfo de México, lo que genera una escasa precipitación, dando lugar a tierras agrestes que proporcionan la condición de aridez en la región (Salinas-Chávez, 2015).

En México, alrededor del 58% de la población nacional vive cerca de zonas áridas o semiáridas (CONAZA, 2019). La población total de los ocho municipios que conforman la región del semidesierto queretano es de 220 mil habitantes aproximadamente, la mayoría de ellos desempeña actividades económicas como la agricultura, la fruticultura, la minería y el comercio (Salinas-Chávez, 2015; INEGI, 2016).

La población rural asentada en esta área, como en el resto de las zonas áridas y semiáridas del país, satisface sus necesidades con los recursos naturales que la región les proporciona, principalmente con el uso -para diversos fines- de las plantas locales y sus partes: frutos, semillas, tallos, raíces, rizomas o bulbos (Flores y Macías, 2008; González-Medrano, 2012).

Además, estos grupos de población dependen en gran medida de los recursos vegetales como base para su economía, ya sea mediante su uso directo para consumo humano, como materia prima para la obtención de diversos productos (gomas, resinas, látex, almidón, granos y proteínas o ácidos grasos) o mediante su uso indirecto como forraje para ganado (Flores y Macías, 2008; González-Medrano, 2012).

La perturbación humana sobre los ecosistemas de las zonas áridas y semiáridas, a través de las actividades agrícolas y pecuarias, así como la extracción y sobreexplotación de plantas silvestres para fines alimenticios u ornamentales, conlleva a la modificación de las comunidades bióticas que las conforman. El 52 % de estas regiones están formadas por matorrales, que son uno de los tipos de vegetación más afectada por las actividades humanas (González-Medrano, 2012; Granados-Sánchez *et al.*, 2013).

Debido al mal manejo de los recursos naturales propios de las regiones áridas y semiáridas, se presenta la susceptibilidad al deterioro de la zona, desencadenando una serie de procesos negativos para la misma, entre los que se enlistan: la pérdida de suelos por erosión eólica e hídrica, empobrecimiento químico del suelo, reducción del nivel de agua del subsuelo, alteración general del ciclo hidrológico, regeneración natural menor de plantas herbáceas y leñosas, reducción severa de la productividad de los ecosistemas y pérdida de la diversidad biológica (Granados-Sánchez *et al.*, 2013).

La degradación del suelo de las zonas áridas, semiáridas y subhúmedas-secas, es resultado conjunto de las variaciones climáticas y las actividades humanas (Cerda *et al.*, 2011; Landa *et al.*, 2014; FAO, 2016); por un lado, la vegetación de estas

regiones está sujeta a condiciones ambientales drásticas y extremas que limitan su supervivencia, además, el impacto de las poblaciones humanas en la biosfera juega un papel importante en el cambio ambiental ya que el continuo incremento de las poblaciones en estas zonas genera alteraciones del ecosistema, y por ende en la vegetación (González-Medrano, 2012).

Las actividades humanas de mayor impacto son: el sobrepastoreo debido a la introducción de ganado bovino y caprino, el cambio de uso del suelo por la expansión de la agricultura intensiva, la ganadería extensiva y actividades mineras, la deforestación, la labranza postcosecha y el mal manejo del suelo, que conllevan a la degradación del mismo, pudiendo ser consideradas como parte de un proceso de desertificación (Ramírez, 2005; Granados-Sánchez *et al.*, 2013; Royo-Márquez *et al.*, 2014; FAO, 2016).

3.1.2. Desertificación.

La **ONU** define el proceso de desertificación como “la degradación de las tierras áridas, semiáridas y zonas subhúmedas secas. Causado principalmente por variaciones climáticas y actividades humanas tales como el cultivo y el pastoreo excesivo, la deforestación y la falta de riego” (CINU, 2008).

La **FAO** considera que los fenómenos de desertificación son el resultado de procesos evolutivos que dependen de los cambios de ciertos factores climáticos y humanos (FAO, 2016).

Cerca del 30% de la superficie de las zonas áridas de América Latina es susceptible de desertificación, en ellas, la velocidad del proceso es mayor que la velocidad de recuperación de los ecosistemas dedicados a la producción agrícola, pecuaria y forestal, lo que dificulta el desarrollo sostenible y la conservación de los ecosistemas (Verbist *et al.*, 2010; Granados-Sánchez *et al.*, 2013).

Lo anterior es resultado de la disminución de la resistencia del suelo a la variabilidad climática natural; normalmente con el transcurso del tiempo, debería recuperarse después de sufrir perturbaciones climáticas y antropogénicas, sin embargo, bajo presión y degradación constantes, esta capacidad se reduce y con ello la limitada productividad de estas zonas. Las repercusiones ambientales que esto genera, trascienden a aspectos socioeconómicos y políticos (Cerdeira *et al.*, 2011; Granados-Sánchez *et al.*, 2013; Landa *et al.*, 2014).

La alteración del ecosistema se ve reflejada por la reducción de la biomasa y la degradación de la cubierta vegetal que consiste en la sustitución de la vegetación primaria por otras especies vegetales y su eventual desaparición. La desertificación se hace irreversible cuando la vegetación primaria ha desaparecido y en su lugar queda roca desnuda por la falta de los almacenes de agua necesarios para el establecimiento y supervivencia de las plantas (González-Medrano, 2012; Granados-Sánchez *et al.*, 2013; Landa *et al.*, 2014).

Cuando la vegetación natural de una región desaparece por factores como adecuación de la tierra para ser utilizada como sembradío, el sobrepastoreo de ganado o para dar paso a la urbanización del territorio, se degrada la capa superficial del suelo que lo protege contra la erosión (Bashan *et al.*, 2005; Flores y Macías, 2008). El restablecimiento de la cobertura vegetal no puede darse de manera natural, sin embargo, muchas de las especies regionales, especialmente las que pertenecen a la familia Cactaceae, funcionan como estabilizadores del suelo y pueden ser usadas para prevenir la erosión, por ello son de particular interés, a pesar de su baja tasa de establecimiento y lento crecimiento, que limitan su uso (Bashan *et al.*, 2005).

3.2. Diversidad vegetal de México.

México es uno de los 12 países con mayor diversidad biológica del mundo ya que alberga entre el 10 y el 12% de la diversidad terrestre global, en cuanto a plantas es el quinto país más diverso (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008) con cerca de 22 mil especies vegetales, de las cuales 9,300 son endémicas del país (Royo-Márquez *et al.*, 2014). Todas estas especies se distribuyen a lo largo del territorio mexicano en diferentes ecosistemas, de entre los cuales destacan las regiones áridas y semiáridas, en las que se encuentran un gran número de especies de plantas, en su mayoría cactáceas, que convierten al país en el principal centro de diversidad cactológica del mundo (Hernández-Oria *et al.*, 2007; Hernández-Magaña *et al.*, 2012).

3.3. Familia Cactaceae.

La Familia Cactaceae es uno de los grupos más representativos de la diversidad biológica mexicana, son plantas muy diversas que poseen gran variedad morfológica y taxonómica, que les permite ocupar los estratos herbáceo, arbustivo y arbóreo de las zonas semiáridas. Las cactáceas son nativas exclusivamente del continente americano en el que existen cerca de 2000 especies; México alberga más del 30% -con 669 especies-, de las cuales entre el 70% y el 80% son endémicas de nuestro país (Hernández, 2007; Jiménez-Sierra, 2011; Castañeda-Romero *et al.*, 2016).

Se encuentran distribuidas en las regiones áridas y semiáridas del territorio nacional gracias a características específicas que les confieren resistencia a condiciones de aridez. En el Semidesierto de Querétaro se puede encontrar un gran número de estas especies, tan solo en el cuadrante de Tolimán, considerado como una de las áreas de mayor riqueza cactológica del Desierto Chihuahuense, se ha documentado la presencia de 55 especies de cactáceas que son utilizadas como grupo indicador de la actual condición ecológica de la región y denotan la importancia de su conservación (Hernández, 2007).

Entre las diferentes especies de cactáceas hay algunas con altos niveles de rareza o endemismo, que poseen algún atributo de interés o bien, se encuentran amenazadas por diversos factores, principalmente la acción humana; en el

cuadrante de Tolimán, 17 de las 55 especies locales se encuentran en alguna categoría de amenaza a su sobrevivencia y son de distribución geográfica restringida; además, otras 6 especies podrían estar en riesgo dadas sus características demográficas y la especificidad de su hábitat (Hernández, 2007; Hernández-Oria *et al.*, 2007).

El uso desmedido de muchas de estas especies para diversos fines, el impacto humano en su hábitat, el cambio de uso de suelo y la extracción directa de las plantas de su ambiente, aunados al alto endemismo y especificidad ambiental de sus poblaciones, son las causas principales por las que 276 especies se encuentren en alguna categoría de riesgo de extinción (Denisse, 2010). Además, algunos procesos biológicos propios de las especies de cactáceas como el lento crecimiento y los ciclos de vida largos (Álvarez *et al.*, 2004; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012), hacen que sus poblaciones se recuperen muy lentamente de los disturbios poblacionales ocasionados de manera natural o como consecuencia de la actividad humana (Arias *et al.*, 2005; Jiménez-Sierra, 2011).

3.3.1. Características de las cactáceas.

Las cactáceas han evolucionado desarrollando características particulares que les permiten establecerse y sobrevivir en condiciones ambientales de escasez hídrica y temperaturas extremas propias de las zonas áridas (Islas, 2008; Jiménez-Sierra, 2011), algunas de estas características adaptativas se explican a continuación:

3.3.1.1. Resistencia a la aridez.

La resistencia de las plantas a la sequía se define como “el grado en el cual una planta puede tolerar el déficit de lluvia”, esta resistencia está dada por mecanismos específicos propios de las plantas como (González-Medrano, 2012):

1. La formación de sistemas radicales anchos y profundos.
2. Presencia de tejidos almacenadores de agua.
3. Cubiertas protectoras o cubiertas cerosas.
4. Reducción de la superficie foliar o caducifoleidad.
5. Presencia de tallos fotosintetizadores.
6. Tolerancia de los tejidos a una reducida cantidad de agua, aun en condiciones de sequedad del aire.
7. Presión osmótica elevada que les permiten extraer la humedad de suelos muy secos y retenerla en su interior.
8. Crecimiento adaptado a las estaciones en que el agua está disponible.

Estos mecanismos permiten que algunas plantas xerófitas, como cactáceas y agaváceas, por su alto contenido de ceras en la cutícula que propician el engrosamiento de la misma, reduzcan la evapotranspiración y almacenen agua; además el gran número de espinas las protegen contra depredadores y su sistema radicular permite el anclaje de la planta en suelos adelgazados (Islas, 2008; González-Medrano, 2012).

3.3.1.2. Suculencia.

Las cactáceas y, en menor proporción, las crasuláceas y agaváceas, son los grupos más notorios de suculentas (González-Medrano, 2012). Cuya estructura suculenta o crasa de sus troncos, les permite acumular gran cantidad de agua en sus tejidos. Sus hojas se han reducido o prácticamente están ausentes, con lo cual reducen la evapotranspiración, y la fotosíntesis se lleva a cabo entonces en la superficie de sus tallos (Jiménez-Sierra, 2011).

Además de ser ahorradoras extremas de agua, sus características morfofisiológicas también están relacionadas con las temperaturas predominantes de las diferentes regiones donde crecen, estas se enlistan a continuación:

1. Presencia de estructuras que impiden la pérdida de agua, como son cutículas engrosadas, a menudo con desarrollo de cubiertas cerosas.
2. Ausencia o reducción de hojas asociado con la presencia de espinas.
3. Desarrollo de tomento.
4. Bajas relaciones de superficie/volumen.
5. Tendencia a la reducción de la superficie de transpiración.
6. Buena capacidad de almacenamiento de agua.
7. Gran sensibilidad estomática al potencial hídrico.
8. Máxima eficiencia para el uso del agua.
9. Diferencias en el tipo y plasticidad del metabolismo fotosintético.

Las suculentas poseen órganos fotosintéticos masivos que les permiten almacenar una gran cantidad de calor, pues el área superficial para disipación de la energía se ve reducida por el gran volumen que desarrollan (González-Medrano, 2012).

3.3.1.3. Metabolismo CAM.

El metabolismo ácido de las crasuláceas (**CAM**) es el metabolismo propio de las cactáceas ya que la fotosíntesis se lleva a cabo en los tallos e induce que los estomas sólo se abran durante la noche, tiempo en el que se produce el intercambio gaseoso para la asimilación de CO₂ de la atmósfera y la liberación de O₂; al realizar este proceso durante las horas de menor temperatura cuando la demanda evaporativa es menor, las plantas evitan la pérdida de agua por transpiración (Islas, 2008; González-Medrano, 2012).

Este tipo de metabolismo es el más costoso energéticamente, pero también es el más productivo al sintetizar azúcares e incorporar CO₂, además, la disminución de la pérdida de agua es altamente benéfica para la planta ya que le permite responder eficazmente a condiciones de estrés hídrico, por lo que puede considerarse este tipo de fotosíntesis como una adaptación a condiciones de aridez (González-Medrano, 2012).

3.3.1.4. Sistema radicular de las cactáceas.

Las cactáceas presentan cinco tipos de raíz. El primero se encuentra entre 5 y 15 cm de profundidad; el segundo es extenso, largo y superficial, cuenta con una raíz principal que sirve de anclaje principalmente a cactus columnares; el tercero consta de raíces pequeñas y ramificadas ubicadas bajo la planta; el cuarto es una raíz pivotante, globosa y tuberosa con pocas raíces secundarias; por último, presentan raíces adventicias. Cada uno de estos sistemas radicales es característico del tipo de cactácea del que se trata, sin embargo, todas presentan un sexto tipo de raíz que consiste en raicillas con pelos radicales ubicadas en las raíces secundarias que se denominan raíces de lluvia ya que se generan durante este periodo y su tiempo de vida se restringe al mismo (Islas, 2008).

3.3.2. Proceso de estabilización del suelo por cactáceas.

El mecanismo de estabilización del suelo por especies de cactáceas inicia con el desarrollo de raíces de lluvia, algunas de estas raíces sobreviven después de la temporada de lluvia y permiten la acumulación y formación de nuevas capas de suelo, mismas que son colonizadas por raíces permanentes (Bashan *et al.*, 2005); este proceso se muestra en la Figura 2.

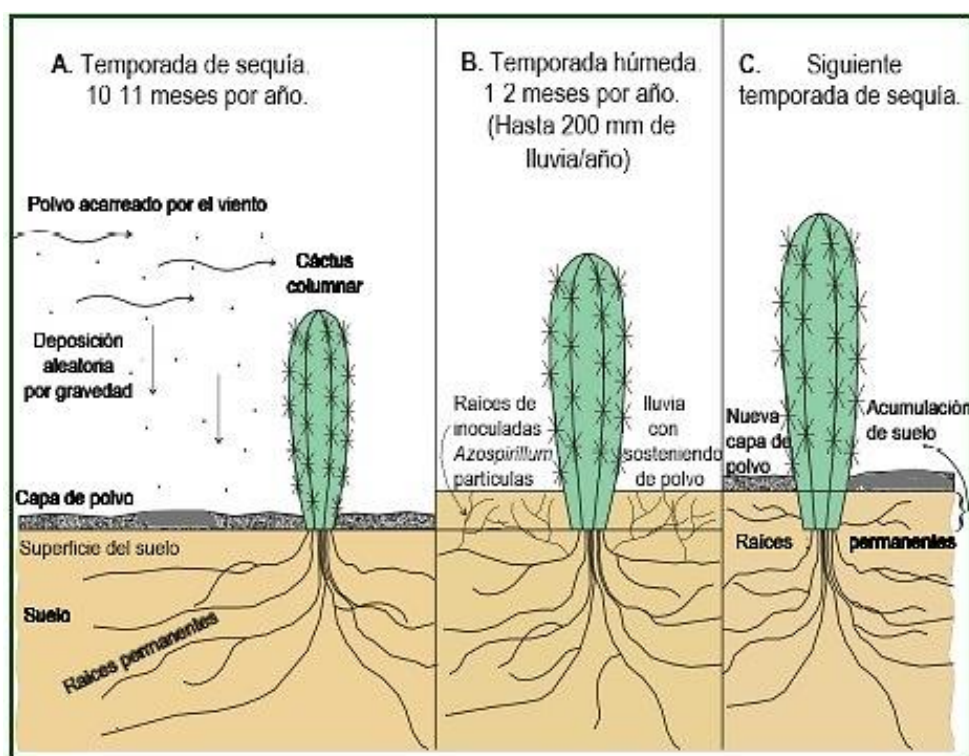


Figura 2: Estabilización del suelo por cactáceas. A) Acumulación de polvo en temporada lluviosa. B) Formación de raíces de lluvia. C) Colonización y formación de la nueva capa de suelo por raíces permanentes. Fuente: Bashan *et al.*, 2005.

3.3.3. *Echinocactus platyacanthus*.

La biznaga dulce o de barril (*Echinocactus platyacanthus*) es una cactácea endémica de México y se distribuye en los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Meza-Nivón, 2011; Hernández *et al.*, 2013; Castañeda-Romero *et al.*, 2016). Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la biznaga dulce (Taxonomy, 2017).	
Súper reino	Eucariota
Reino	Viridiplantae
Phylum	Streptophyta
Subphylum	Streptophytina
Plantas terrestres	Embriophyta
Plantas vasculares	Tracheophyta
Plantas vasculares	Euphyllophyta
Plantas con semillas	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Mesangiospermae
Clase	Eudicotyledons
Subclase	Gunneridae
Eudicots	Pentapetalae
Orden	Caryophyllales
Suborden	Cactineae
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Cactoideae
Tribu	Cacteae
Género	<i>Echinocactus</i>
Especie	<i>Platyacanthus</i>

Es un cactus arbustivo de forma globular (Figura 3). Posee tallos que miden de 50 cm a 1 m de alto y 40 cm a 1 m de ancho, simples, rara vez ramificados; son de color verde oscuro y poseen un ápice cubierto por abundantes tricomas amarillos, los individuos adultos poseen hasta 60 costillas gruesas, duras, con un surco intercostal profundo; sus aréolas miden 0.5 a 1.2 cm de largo, que se posicionan distantes entre sí en individuos jóvenes y contiguas en ejemplares adultos; tienen espinas radiales, rectas, ascendentes, rígidas de color amarillento a grisáceo que en los tallos jóvenes van de 8 a 10 y miden de 2 a 4 cm largo, con la edad, el número se reduce hasta desaparecer. Posee grandes flores amarillas y frutos del tamaño de las flores que al madurar contienen pulpa blanca y seca, que contienen a las semillas ovaladas, negras y brillantes (Montes *et al.*, 2012).



Figura 3: *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce). Fuente: Jiménez-Sierra y Eguiarte, 2010.

Puede llegar a medir 2 metros de altura y 1.2 metros de diámetro y, de acuerdo a su tamaño, se consideran como plántulas a los individuos menores de 3 cm, como jóvenes a aquellos que están entre 3 y 25 cm, y como adultos a aquellos que sobrepasen los 25 cm, aunque con diferentes grados de maduración (Castañeda-Romero *et al.*, 2016).

Es una especie relativamente abundante, sin embargo, su lento desarrollo y la intensa extracción de su hábitat por la alta demanda de ejemplares que son utilizados con fines como la alimentación humana (ya que con sus tallos se prepara una confitura comúnmente llamada acitrón o dulce de biznaga), alimentación animal (como forraje para ganado en los periodos de sequía), y con fines artísticos, artesanales y de ornato, las hace especialmente vulnerables a la declinación de su población por la eliminación de individuos adultos y la escasa reproducción de individuos jóvenes (Meza-Nivón, 2011; Hernández *et al.*, 2013).

Todos estos factores son los que han colocado a la biznaga en una categoría de riesgo de extinción (Tabla 2), por lo que ha sido considerada en el Apéndice II de la Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (**CITES**), por la **NOM-059-SEMARNAT-2010** en la categoría “Pr” (Denisse, 2010) y por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (**UICN**) en la categoría “NT” (Meza-Nivón, 2011; Hernández *et al.*, 2013; Castañeda-Romero *et al.*, 2016).

Tabla 2: Categorías de riesgo de especies vegetales amenazadas según diferentes normatividades. En negritas se destacan las categorías en las que está considerada la biznaga dulce (Arias <i>et al.</i> , 2005, Flores y Macías, 2008; CITES).		
NOM-059-ECOL-2001.	UICN.	CITES.
E = Probablemente extinta en medio silvestre.	EX = Extinto.	Apéndice I. Ampara especies en peligro de extinción y su comercio se autoriza solamente bajo circunstancias específicas.
	EW = Extinto en estado silvestre.	
P = En peligro de extinción.	CR = En peligro crítico.	Apéndice II. Alberga especies que no están incluidas en peligro de extinción, pero podrían estarlo por lo que su comercio debe ser controlado para evitar la utilización incompatible con su supervivencia
	EN = En peligro.	
A = Amenazadas.	VU = Vulnerable.	
	NT = Casi amenazado	
Pr = Sujeta a protección especial	LC = Preocupación menor.	Apéndice III. Incluye especies a solicitud de una Parte, reglamentando su comercio para evitar la explotación insostenible o ilegal de las mismas.
	DD = Datos insuficientes.	
	NE = No evaluado.	

A pesar de ser una especie protegida, continúa siendo objeto de extracción para satisfacer un interés económico ya que, aunque es ilegal, una de las principales actividades relacionadas a la sobreexplotación de las poblaciones de biznaga, es su comercialización como dulce de acitrón (Jiménez-Sierra y Eguiarte, 2010).

En adición, esta especie también es amenazada por otros factores; Jiménez Sierra y Eguiarte (2010) realizaron un estudio sobre la perturbación que sufre la población de biznaga dulce en diferentes áreas de distribución de la zona árida queretano-hidalguense, en el que encontraron que la actividad humana es el principal factor de perturbación al causar más del 50% del daño a las poblaciones de las plantas localizadas en esas áreas; otros dos factores de impacto fueron el paso del ganado y el grado de erosión del suelo que, aunque en un porcentaje menor, también causan daño a las biznagas. Como puede verse, la perturbación humana sigue siendo el principal factor de riesgo para la especie y es el resultado de los múltiples asentamientos humanos muy próximos a su hábitat, que propician la transformación del mismo para satisfacer las necesidades de la población (Jiménez-Sierra y Eguiarte, 2010).

Las cactáceas son elementos importantes en la estructura y la dinámica de las comunidades vegetales de las zonas semidesérticas. Su desaparición conlleva a un proceso de empobrecimiento biológico y desaparición del hábitat natural, sin contar con la pérdida de recursos útiles para las poblaciones humanas. Ante la situación de riesgo en la que se encuentran las cactáceas mexicanas, urge tomar medidas de protección (Jiménez-Sierra, 2011).

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados por los diferentes grupos e instituciones creados para conservar y proteger a las especies en riesgo y su

hábitat, aún no han podido asegurar la sobrevivencia de las mismas, por lo que las acciones realizadas se consideran insuficientes. De aquí surge la necesidad de seguir buscando medidas de protección para las especies amenazadas (Hernández, 2007).

Entre las medidas planteadas, se han sugerido la colecta y la preservación de semillas, el cultivo de plantas en invernaderos con el fin de propiciar su investigación y propagación intentando fomentar su comercio legal y controlado, así como la reintroducción de plantas a sus hábitats naturales. También se ha sugerido el establecimiento de áreas de exclusión, que permitan proteger a los ejemplares contenidos en ellas, tanto del daño ocasionado por el ganado, como de la extracción ilegal de sus ambientes naturales (Jiménez-Sierra, 2011).

Sin embargo, el lento crecimiento que presentan y la baja tasa de establecimiento que tienen al ser reintroducidas en su hábitat natural, principalmente si el suelo está erosionado, dificultan la propagación y supervivencia de las especies (Bashan *et al.*, 2005). Una medida que podría ser de utilidad para subsanar esta limitante sería la utilización de bacterias promotoras del crecimiento de plantas, que coadyuven en su desarrollo y reproducción (de-Bashan *et al.*, 2007).

3.4. Rizósfera.

El concepto de rizósfera fue acuñado en 1904 por Hiltner y se define como “el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz” (Figura 4), cuyas propiedades fisicoquímicas -dadas gracias a los diferentes compuestos orgánicos que contiene- generan un microambiente adecuado para el establecimiento de diversos microorganismos que aprovechan los exudados de la raíz de las plantas como fuente de energía (Mayz-Figueroa, 2004; Verma *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2011).

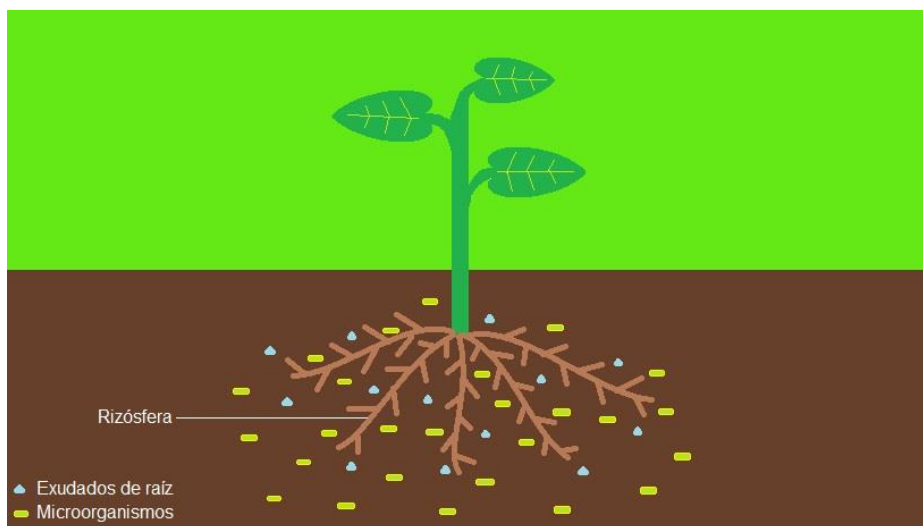


Figura 4: Rizósfera. Colonización por microorganismos atraídos por los exudados de raíz Fuente: propia.

3.4.1. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (PGPR).

Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas, **PGPR**, por sus siglas en inglés (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) son un grupo de diferentes especies de bacterias asociadas principalmente a la rizósfera de las plantas que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetales a través de diferentes mecanismos entre los que se encuentran la producción de inductores de crecimiento como las hormonas vegetales, aumento de la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno, fósforo y hierro, el biocontrol de microorganismos patógenos, etc. Las principales especies que integran el grupo pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Rodríguez y Fraga, 1999; de-Bashan *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010).

Las cactáceas, como la mayoría de las especies vegetales, se benefician de los microorganismos del suelo y dependen de su presencia y asociación para su temprano establecimiento y subsecuente desarrollo (de-Bashan *et al.*, 2007).

3.4.2. Bacterias endófitas.

Las bacterias endófitas son bacterias PGPR que, de acuerdo con su capacidad de colonizar la rizósfera y alojarse en el rizoplasma de la planta, migran a los tejidos internos sin causar infecciones sintomáticas o efectos negativos a la misma; se encuentran de forma viable y transitoria en los órganos vegetales como raíces, tallo, hojas, flores, frutas y semillas, además de ser capaces de desencadenar efectos fisiológicos beneficiosos como la regulación osmótica, regulación estomática, reducción de potenciales de membrana y cambios en el contenido de fosfolípidos en las membranas celulares, promoviendo así el crecimiento y desarrollo de la planta (Compant *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011).

3.4.3. Mecanismos de promoción del crecimiento.

Los microorganismos capaces de promover el crecimiento vegetal, inician su actividad mediante la colonización de la rizósfera -proceso dependiente de quimiotaxis (atracción química)-, para la que es necesaria la presencia de órganos de movilidad. La raíz de la planta excreta sustancias como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos (málico, succínico, aspártico, glutámico, etc.) que proporcionan una fuente de carbono para los microorganismos, quienes inician su traslado hacia el rizoplasma de la planta para dar inicio a una relación mutualista con la misma (Compant *et al.*, 2010; Camelo *et al.*, 2011).

Los mecanismos de acción de las PGPR para promover el crecimiento de las plantas son diversos. Los que se mencionan con más frecuencia en la literatura son (Holguín *et al.*, 2003; Camelo *et al.*, 2011; Castillo-Reyes *et al.*, 2014):

- 1) Fijación de nitrógeno.
- 2) Producción de sustancias reguladoras del crecimiento.
- 3) Incremento en el desarrollo de la raíz.
- 4) Incremento de la absorción de agua y nutrientes.

- 5) Producción de compuestos sideróforos que incrementan la disponibilidad de hierro en la rizósfera.
- 6) Alteraciones en el potencial de la membrana de la raíz.
- 7) Inducción de resistencia sistémica a patógenos.
- 8) Inhibición del crecimiento de organismos antagónicos.
- 9) Interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo.

3.4.3.1. Fijación de nitrógeno.

El nitrógeno (N) es un macronutriente esencial para el crecimiento de las plantas ya que interviene en diferentes procesos biológicos como la formación de aminoácidos y bases nitrogenadas, para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; además, forma parte de las paredes celulares y de la molécula de clorofila, cuya deficiencia genera clorosis (color amarillento en las hojas) que es un indicador de deficiencias nutricionales que afectan la fotosíntesis y el desarrollo de la biomasa de la planta (Islas, 2008).

Se encuentra en la atmósfera en forma de gas diatómico y en la litosfera, en rocas pequeñas y sedimentarias. Es captado de la atmósfera por acción de un grupo de microorganismos denominados diazotróficos en un proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (**FBN**), y es mineralizado para que pueda ser utilizado por las plantas, quienes lo absorben en forma de amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) (Baca *et al.*, 2000; Buzó, 2012).

La FBN es una etapa importante del ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 5) que determina la entrada del N a los ecosistemas terrestres, donde sufre diferentes transformaciones mediante la acción metabólica de microorganismos, plantas y animales, hasta su reincorporación en la atmósfera para completar el ciclo (Buzó, 2012).

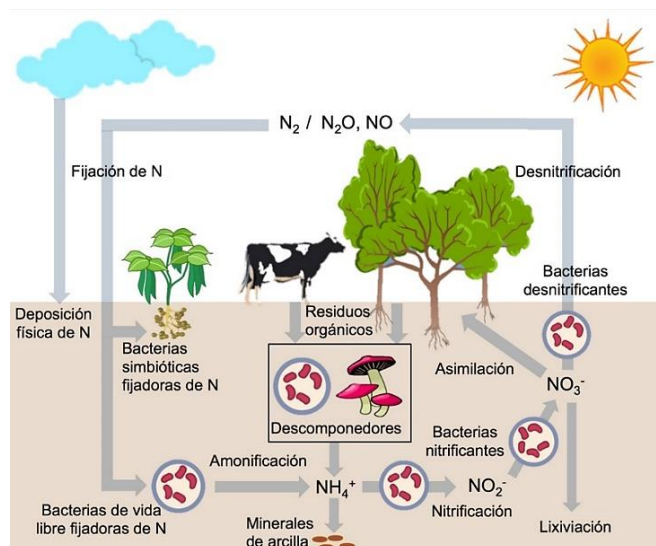


Figura 5: Ciclo biogeoquímico del nitrógeno. La fijación de nitrógeno es la captación del nitrógeno atmosférico por bacterias que lo incorporan a plantas o al suelo donde sufre diferentes transformaciones por acción de otras bacterias denominadas diazotróficas, quienes lo procesan hasta su reincorporación a la atmósfera para completar el ciclo. Fuente: Pajares, 2016.

Las bacterias diazotróficas reducen el nitrógeno molecular atmosférico a amonio, con la ayuda del complejo enzimático nitrogenasa (Figura 6), formado por dos componentes proteicos: el componente I, llamado enzima dinitrogenasa o proteína MoFe formado por dos subunidades alfa y beta, y el componente II, conformado por la enzima dinitrogenasa reductasa o proteína Fe, encargada de catalizar el proceso de reducción (Baca *et al.*, 2000; Buzó, 2012).

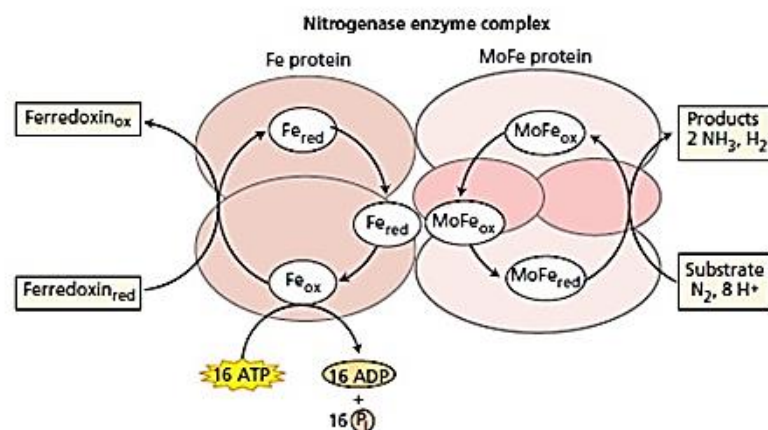


Figura 6: Complejo nitrogenasa y reducción de N_2 a NH_3 . Fuente: Buzó, 2012.

Las subunidades del complejo enzimático están codificadas por los genes, *nifD* que codifica la subunidad alfa de la dinitrogenasa, *nifK* que codifica la subunidad beta de la dinitrogenasa y el gen *nifH* que codifica la enzima dinitrogenasa reductasa, además de que ha sido ampliamente utilizado como marcador molecular para el estudio de la filogenia, diversidad y abundancia de microorganismos fijadores de nitrógeno; aunque la presencia del gen *nifH* no denota la actividad nitrogenasa (Emmyrafedziawati y Stella, 2018; Kumar *et al.*, 2019), indica la capacidad de la bacteria de producir el complejo enzimático y por ende la posibilidad de fijar nitrógeno.

La fijación de nitrógeno está considerada como uno de los procesos más importantes para el crecimiento de las plantas, por lo que el estudio de las bacterias diazotróficas es de particular interés. Algunos géneros de bacterias cuya actividad FBN ha sido ampliamente caracterizada son: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Mayz-Figueroa, 2004).

En 2014, Yadegari y colaboradores evaluaron el efecto de la co-inoculación de plantas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) con cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum lipoferum* y *Rhizobium* (Rb-133 y Rb-136) altamente efectivas y ampliamente caracterizadas como fijadoras de nitrógeno. Encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* o *Azospirillum lipoferum*, en conjunto con *Rhizobium*, en comparación con aquéllas que sólo fueron inoculadas con *Rhizobium*; reportaron un aumento del número de vainas por planta, del número de semillas por vaina, del peso de 100 semillas, del

peso de las semillas por planta, del peso de las vainas por planta, de la materia seca total en la fase de llenado de la semilla, del rendimiento de semillas y del contenido de proteínas.

Por otro lado, Santana y colaboradores (2017) observaron los resultados de inocular una plantación de café con *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum*; algunas de las variables evaluadas fueron la altura, el diámetro de la planta, el número de ramas, el número de granos y el rendimiento del cultivo. Las plantas que fueron inoculadas presentaron valores superiores de altura (alrededor de 2.5 m), diámetro de la planta (cercano a 63 cm) y número de ramas (entre 144 y 129), en comparación con el grupo control que presentó una altura máxima de 1.55 m, diámetro de 26 cm y número de ramas de 54; además, hubo un aumento del doble en el número de granos y cuatro veces más de rendimiento que el grupo control. Con esto concluyeron que la inoculación con *Azospirillum* o *Azotobacter* resultó ser efectiva para aumentar el crecimiento de la planta.

3.4.3.2. Solubilización de fosfatos.

El fósforo (P) es uno de los principales macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo biológico, ya que es componente de los ácidos nucleicos, fosfoproteínas y fosfolípidos de la membrana plasmática, también funciona como regulador en la formación de azúcares y almidón e interviene en los procesos de maduración, formación de semillas, crecimiento radical y floración, además de estar ligado al proceso de fijación de N (Rodríguez y Fraga, 1999; Islas, 2008; Corrales *et al.*, 2014; Pineda, 2014).

En el suelo está presente en una proporción de 400-1200 mg/kg de suelo, en forma de fosfato orgánico como inositol y ésteres de fosfato, que son productos de la degradación microbiana de restos animales y vegetales. El fósforo inorgánico forma parte de minerales de calcio, hierro y aluminio, que concentran la mayor parte del P y son poco solubles; la cantidad de P soluble proveniente de esta fracción es muy baja (de 1 ppm o menos), considerando que la forma en que las plantas lo asimilan es como ion monovalente H_2PO_4^- y como ion fosfato divalente HPO_4^{2-} (Rodríguez y Fraga, 1999; Islas, 2008; Corrales *et al.*, 2014; Pineda, 2014).

La absorción del fosfato es esencial para el crecimiento de las plantas y, al estar presente mayoritariamente en forma insoluble, es necesaria la acción de microorganismos solubilizadores de fosfato. Existe un gran número de géneros bacterianos capaces de solubilizar fosfato inorgánico como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. La cantidad de P solubilizado por estos microorganismos, presentes de manera natural en el suelo es deficiente para las plantas, sin embargo, se ha demostrado que la inoculación con una mayor concentración de los mismos, es suficiente para incrementar la solubilización de P y éste puede ser aprovechado para el crecimiento de la planta (Rodríguez y Fraga, 1999; Corrales *et al.*, 2014; Pineda, 2014).

Restrepo y colaboradores (2015), describieron la capacidad para solubilizar fosfato *in vitro* de diferentes especies bacterianas, utilizando medio para solubilizadores NBRIP. Algunas de las cepas descritas son *Pseudomonas putida* (144 mg P/L de medio), *Burkholderia vietnamienses* (226 mg P/L), *Bacillus thioparans* (428 mg P/L), *Paenibacillus lautus* (312 mg P/L), entre otros, y determinaron que la fertilización o inoculación de semillas con este tipo de microorganismos puede tener un efecto positivo en la disponibilidad de P para la planta (Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

Ávila y colaboradores (2015), demostraron que la inoculación de semillas de *Baccharis macrantha* (Asteraceae) con *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus firmus* (ambas con capacidad para solubilizar fosfato) de manera individual y conjunta, generó un efecto benéfico al aumentar el porcentaje de germinación de semillas, la altura de plántulas, la longitud de las raíces y el peso seco total de la planta.

El principal mecanismo de solubilización de fosfato empleado por las bacterias es la disminución del pH por medio de la producción de ácidos orgánicos, provenientes del metabolismo de carbohidratos, péptidos y lípidos, que generan la acidificación de la célula bacteriana y sus alrededores, permitiendo la liberación de P inorgánico presente en suelo, principalmente en forma de minerales de fosfato, mediante quelación y sustitución de los iones metálicos (Figura 7. Rodríguez y Fraga, 1999; Corrales *et al.*, 2014; Pineda, 2014).



Figura 7: Solubilización de fosfato inorgánico mediada por la producción de un ácido orgánico. Modificado de Corrales *et al.*, 2014.

El ácido glucónico es el principal agente involucrado en la solubilización de fosfato, el cual es producido por *Pseudomonas* sp., *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cepacia* y *Burkholderia cepacia*; otro agente importante es el ácido 2-cetoglucónico, producido por *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti* y *Bacillus firmus*; otros compuestos solubilizadores son los ácidos láctico, isovalérico, isobutírico, acético, glicólico, oxálico, malónico y succínico, que pueden ser sintetizados por diferentes microorganismos, por ejemplo *Bacillus liqueniformis* y *B. amyloliquefaciens* (Rodríguez y Fraga, 1999; Corrales *et al.*, 2014; Pineda, 2014).

Un mecanismo secundario para la solubilización de fosfato, principalmente orgánico, es la producción de enzimas fosfatasas por algunos microorganismos, estimulada por la presencia de materia orgánica como humus, estiércol, residuos vegetales, coloides, etc. El proceso consiste en la hidrólisis de enlaces éster del fosfato orgánico por acción de las enzimas monoéster fosfato hidrolasa (ácida y alcalina), di-éster fosfato hidrolasa y tri-éster fosfato hidrolasa, liberando los iones fosfato H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} (Figura 8). Algunas bacterias capaces de producir fosfatasas pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Pantoea* (Corrales *et al.*, 2014).

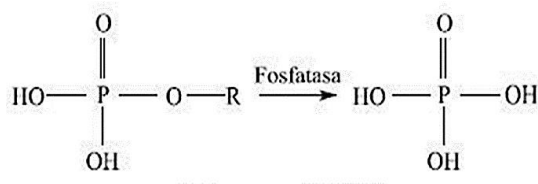


Figura 8: Hidrólisis enzimática de fosfato orgánico. Tomado de Corrales, 2014.

3.4.3.3. Producción de fitohormonas.

Las hormonas vegetales también conocidas como fitohormonas, son metabolitos capaces de promover el crecimiento vegetal debido a que activan diferentes respuestas en la célula a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico, además, incrementan la resistencia de las plantas a diversos factores de estrés, ya que pueden inducir o suprimir la expresión de genes específicos (Camelo *et al.*, 2011; Loredó-Osti *et al.*, 2016).

Cuando estos metabolitos son producidos en forma endógena por las plantas, se les denomina hormonas vegetales o fitohormonas, aunque también existe un gran número de microorganismos (como hongos y bacterias del tipo PGPR) que poseen la capacidad de producir estas sustancias a las que se les denomina entonces reguladores de crecimiento, en respuesta a la liberación de sustancias de la planta hacia la rizósfera (Camelo *et al.*, 2011; Loredó-Osti *et al.*, 2016).

Están divididas en cinco grandes grupos que se enlistan a continuación:

3.4.3.3.1 Auxinas

Son sustancias reguladoras del crecimiento que intervienen en la germinación, la formación de dominios apicales, la diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos, además de desencadenar procesos hormonales como la síntesis de proteínas, la división y el alargamiento celular. El ácido indol acético (**IAA**) es la auxina más estudiada, una gran variedad de bacterias PGPR pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, es capaz de producir IAA (Valencia *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2010; Camelo *et al.*, 2011; Cuevas, 2013).

La capacidad del IAA para mejorar el desarrollo de las plantas ha sido demostrada por diversos autores. En 2013, Luna y colaboradores, evaluaron la capacidad de cuatro cepas de *Bacillus* para producir IAA y encontraron que estaba en un rango 2.3 a 6.8 mg/L de cultivo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Wahyudi y colaboradores (2011), quienes evaluaron la capacidad de seis aislados rizosféricos del género *Bacillus* para promover el crecimiento de plántulas de *Glycine max* Merr. (soya), encontrando que producían IAA en concentraciones desde 3.02 hasta 5.45 mg/L. Además, evaluaron el efecto de la inoculación de estas bacterias en semillas de tomate y pimiento, mostrando un aumento en la germinación de éstas y en la biomasa de las plantas cuyas semillas fueron inoculadas.

Lara y colaboradores, en 2014, determinaron que *Azospirillum* sp y *Azotobacter* sp poseen la capacidad de producir IAA en altas concentraciones y que la inoculación de pasto con estas cepas influía de manera favorable en la planta, aumentando la altura del tallo hasta en un 19.12% y en la longitud de las hojas hasta en un 14.98%.

La síntesis de IAA por PGPR se lleva a cabo a partir de triptófano, obtenido de los exudados radicales mediante cuatro rutas metabólicas (Figura 9. Contreras *et al.*, 2010; Camelo *et al.*, 2011; Cuevas, 2013):

1. Vía del ácido indol-3-piruvico (IPyA): consiste en la transformación del triptófano en indol piruvato mediante la acción de la enzima aminotransferasa aromática y, posteriormente, la descarboxilación del indol piruvato por la enzima indol piruvato descarboxilasa, para la obtención de IAA.
2. Vía de la triptamina (TAM): consiste en la formación y oxidación de triptamina a partir de triptófano, por acción de las enzimas triptófano descarboxilasa y amino oxidasa, para la obtención de IAA.
3. Vía indol-3-acetamida (IAM): las enzimas triptófano 2-monooxygenasa e indol-3-acetamida hidrolasa, son las encargadas de transformar al triptófano en IAA.
4. Vía del indol-3-acetonitrilo (IAN): participan activamente enzimas como las nitrilasas, encargadas de generar el IAA a partir del indol-3-acetonitrilo.

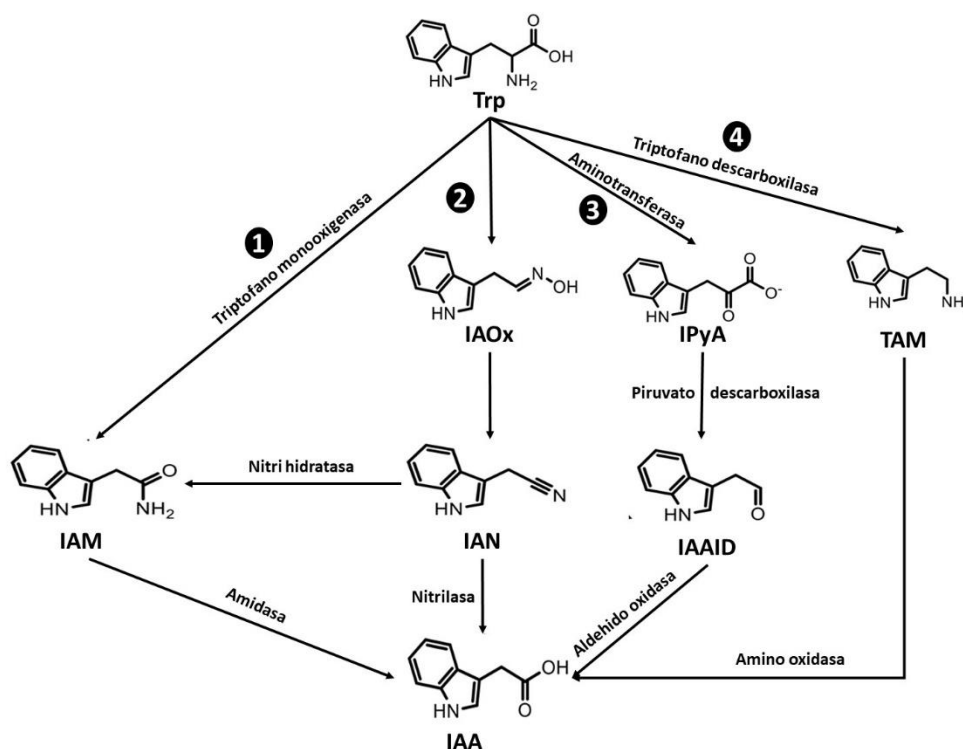


Figura 9: Síntesis de IAA a partir de triptófano. 1. Vía del IAM. 2. Vía del IAN. 3. Vía del IPyA. 4. Vía del TAM. Modificado de Hernández-Mendoza *et al.*, 2010.

3.4.3.3.2. Giberelinas.

Son fitohormonas capaces de incrementar el crecimiento de los tallos, interrumpir el periodo de latencia de las semillas para germinar, inducir el brote de yemas, promover tanto la floración como el crecimiento del tallo, además del desarrollo de los frutos. Son moléculas complejas de diterpenos tetra carboxílicos; el más importante es el ácido giberélico y se han caracterizado 136 especies químicas derivadas de éste (Mandujano *et al.*, 2007; Camelo *et al.*, 2011; Cuevas, 2013).

3.4.3.3.3. Citocininas.

Son compuestos químicos derivados de aminopurinas que se encargan de regular la citocinesis de las células vegetales, también son capaces de estimular la retención de la clorofila, promover la división y expansión celular, así como la formación de cloroplastos. La zeatina es la más estudiada, aunque también son conocidas la 6-bencilaminopurina y la furfuryl-aminopurina (Camelo *et al.*, 2011, Cuevas, 2013).

3.4.3.3.4. Etileno

El etileno es considerado una fitohormona ya que tiene la capacidad de regular el crecimiento al estimular la expansión celular, inhibir el crecimiento vegetativo y radicular, estimular la formación de flores y la maduración de frutos de la planta, inducir la caída de hojas y frutos, acelerar la senescencia y participar en la dormancia. Las altas concentraciones de auxinas, giberelinas y citosinas, inducen la síntesis de etileno por parte de las plantas y de algunas bacterias como *Rhizobium* y *Pseudomonas* (Jordán y Casaretto, 2006; Camelo *et al.*, 2011; Cuevas, 2013).

3.4.3.4. Biocontrol de fitopatógenos.

Algunas bacterias promotoras del crecimiento tienen la capacidad de ejercer control biológico, al producir una gran cantidad de sustancias que pueden reducir la proliferación de organismos patógenos para las plantas; algunos de estos compuestos son: sideróforos, enzimas líticas, bacteriocinas y antibióticos (de-Bashan *et al.*, 2007; Beneduzi *et al.*, 2012).

El principal mecanismo de biocontrol de las PGPR es la síntesis de uno o más antibióticos que son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, perjudiciales para el crecimiento o actividades metabólicas de los microorganismos patógenos, también son capaces de inducir la resistencia sistémica de las plantas a enfermedades. Entre los antibióticos conocidos destacan: Agrocina 84, Agrocina 434, 2,4-diacetilfloroglucinol, herbicolina, oomicina, fenacina, pioluteorina y pirrolnitrina, que pueden actuar inhibiendo la síntesis de las paredes celulares de patógenos, de estructuras de la membrana celular y la formación de complejos de iniciación de la subunidad pequeña del ribosoma (de-Bashan *et al.*, 2007; Beneduzi *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas son compuestos con acción bactericida que poseen un margen reducido de acción ya que sólo actúan sobre organismos relacionados con aquellos que las producen, ejemplo de ellas son las colicinas producidas por *E. coli* y que actúan únicamente sobre enterobacterias relacionadas a ella (Beneduzi *et al.*, 2012).

Los sideróforos son compuestos quelantes de bajo peso molecular que “secuestran” hierro (Fe^{3+}), generalmente encontrado en estado insoluble, volviéndolo soluble al unirse covalentemente a él, lo que lo hace accesible para los organismos que lo requieren (de-Bashan *et al.*, 2007; Camelo *et al.*, 2011; Beneduzi *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2013; Loredó-Ostí *et al.*, 2016).

La producción de sideróforos es considerada un mecanismo de biocontrol ya que permiten la reducción de la disponibilidad de hierro para los patógenos; es más efectivo para el control de hongos patógenos ya que los sideróforos de las bacterias son más afines al hierro que los producidos por los hongos. El ejemplo más conocido es la pioverdina, sideróforo fluorescente que es producido por bacterias del género *Pseudomonas* en condiciones de deficiencia de hierro o de otros metales, o en condiciones de pH bajo. La producción de pioverdina puede ser estratégica en la rizósfera, no sólo para el abastecimiento de hierro, sino también como una defensa contra otros microorganismos (de-Bashan *et al.*, 2007; Beneduzi *et al.*, 2012; Junaid *et al.*, 2013; Loredó-Ostí *et al.*, 2016).

Las enzimas líticas tienen la capacidad de hidrolizar una gran cantidad de polímeros como la quitina, proteínas, celulosa, hemicelulosa y DNA. Las enzimas producidas por las PGPR son principalmente las quitinasas que degradan la quitina de la pared celular de hongos patógenos, pero también pueden sintetizar β -glucanasas, lipasas y proteasas, capaces de lisar células fúngicas (de-Bashan *et al.*, 2007; Junaid *et al.*, 2013).

La capacidad de un gran número de especies bacterianas de ejercer control sobre organismos patógenos ha sido ampliamente explorada, estudios recientes muestran el beneficio de utilizar estas especies para el control de enfermedades en las plantas. Han y colaboradores, en 2016, emplearon una mutante de *Bacillus subtilis* para el control del vástago negro del tabaco, causado por el hongo *Phytophthora nicotianae*, y determinaron que *B. subtilis* era capaz de inhibir su crecimiento causando deformidad y ruptura de las hifas, así como fugas de protoplasma, detectadas con microscopía electrónica de barrido.

Por otro lado, Hernández-Castillo y colaboradores, en 2016, evaluaron la capacidad de tres cepas del género *Bacillus* para inhibir el crecimiento de los hongos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*, agentes causales de la marchitez del chile y determinaron que estas cepas inhibieron significativamente el crecimiento de los tres hongos fitopatógenos, además de estimular el crecimiento vegetativo, incrementar el peso de raíz y frutos, y mejorar

el rendimiento total de plantas de Chile, reduciendo la incidencia y severidad de la enfermedad.

3.4.3.5. Utilidad de las PGPR

La inoculación con PGPR como biofertilizantes o agentes de control de plagas es una práctica común en agricultura y silvicultura en países desarrollados (Rodríguez y Fraga; 1999; Bashan *et al.*, 2005), y ha tenido una amplia difusión en los últimos años debido a su efecto positivo sobre el rendimiento de diversos cultivos, sin embargo, en México su uso es limitado (Castillo-Reyes *et al.*, 2014). En la Tabla 3 se enlista una recopilación de diferentes estudios basados en la utilización de PGPR sobre diferentes cultivos para mejorar su producción.

Tabla 3: Estudios sobre el efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en diferentes cultivos.				
Bacteria	Especie vegetal	Actividad PGPR	País	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. simplex</i> , <i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> .	Kiwi.	Fijación de nitrógeno y producción de ácido indol-acético (IAA).	Turquía.	Erturk <i>et al.</i> , 2010.
<i>Agrobacterium rubi</i> , <i>B. subtilis</i> .	Almendras.	Fijación de nitrógeno y producción de ácido indol acético (IAA).	Turquía.	Orhan <i>et al.</i> , 2006.
<i>Mesorhizobium</i> sp.	Garbanzo.	Fijación de nitrógeno, síntesis de compuestos antifúngicos, fitohormonas y sideróforos, solubilización de fosfato, además de la degradación de pesticidas tóxicos.	India.	Ahemad y Khan, 2010.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. putida</i> .	Guisantes (Chícharos).	Hidrólisis de ácido aminociclopropano-1- carboxílico (ACC) para aumentar los niveles de etileno.	Pakistán.	Zahir <i>et al.</i> , 2008.
<i>Serratia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Arroz.	Fijación de nitrógeno, producción de IAA y solubilización de fosfatos.	Tailandia.	Nakbanpote <i>et al.</i> , 2014.
<i>Rhizobium</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp.	Frijol.	Producción de ACC desaminasa.	Pakistán,	Ahman <i>et al.</i> , 2013.
Cepas WPR-32, WPR-42 y WPR-51 aisladas de trigo.	Trigo.	Fijación de nitrógeno, producción de IAA y solubilización de fosfatos.	Italia.	Abbasi <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bacillus</i> sp.	Soya.	Producción de IAA, y de sideróforos, solubilización de fosfatos y biocontrol de patógenos.	Indonesia.	Wahyudi <i>et al.</i> , 2011.
<i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> sp.	Chile.	Producción de IAA, y de sideróforos, solubilización de fosfatos y biocontrol de patógenos.	Australia.	Datta <i>et al.</i> , 2011.
<i>Ochrobactrum</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>B. subtilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .	Caña de azúcar.	Biocontrol	Afganistán.	Hassan <i>et al.</i> , 2010.

<i>Azotobacter</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp.	Pasto.	Producción de IAA.	Colombia.	Lara, 2014.
<i>Herbaspirillum</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp., <i>Pseudacidovorax</i> sp., <i>Azospirillum</i> sp.	Arroz.	Producción de IAA y de sideróforos, solubilización de fosfatos.	Brasil.	de-Souza <i>et al.</i> , 2013.
<i>Azotobacter chroococcum</i> .	Maíz.	Fijación de nitrógeno, producción de IAA y solubilización de fosfatos.	Colombia.	Rojas-Tapias <i>et al.</i> , 2012.
<i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azotobacter</i> y actinobacterias.	Alfalfa, "tara" (<i>Caesalpinia spinosa</i>), "pallar" (<i>Phaseolus lunatus</i> var. sieva) y frijol	Producción de IAA y solubilización de fosfato.	Perú.	Ogata <i>et al.</i> , 2016.
<i>Arthrobacter</i> , <i>Lysinibacillus</i> , <i>Rahnella</i> y <i>Bacillus</i> .	Eucalipto.	Producción de IAA, solubilización de fosfatos y actividad ACC desaminasa.	Argentina.	Angulo <i>et al.</i> , 2014.
<i>Pseudomonas putida</i> .	Jitomate.	Biocontrol y producción de sustancias reguladoras del crecimiento.	México.	Domínguez, 2013.
Varias especies de <i>Burkholderia</i>	Tomate	Fijación de nitrógeno, producción de IAA, solubilización de fosfatos, actividad ACC desaminasa y producción de sideróforos.	México.	Caballero- Mellado <i>et al.</i> , 2007.
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Diferentes especies.	Producción de IAA, actividad ACC desaminasa. Y biocontrol de fitopatógenos.	México.	Couillerot <i>et al.</i> , 2009.
<i>Burkholderia unamae</i> , <i>B.</i> <i>tropica</i> , y <i>B. xenovorans</i>	Caña de azúcar y maíz.	Fijación de nitrógeno y reducción de acetileno.	México y Brasil.	Perin <i>et al.</i> , 2006.
<i>Azospirillum brasilense</i>	Cactus cardón.	Fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos.	México.	Bashan <i>et al.</i> , 2005.
<i>Bacillus</i> spp., rizobacterias halófilas y el hongo <i>Trichoderma</i> spp.	Biznaga.	Producción de auxinas, citocininas y giberelinas.	México.	Castillo-Reyes <i>et al.</i> , 2014.

Como se puede observar, son numerosos los estudios en donde se demuestra la capacidad de las PGPR para mejorar los cultivos de la especie vegetal a la que son adicionadas, pues la mayoría de las investigaciones mencionadas en la tabla presentan resultados positivos sobre esta actividad. De lo anterior se puede concluir que los inoculantes microbianos son un recurso biotecnológico que ayuda a mejorar la productividad de diversos cultivos, mientras promueve una agricultura sustentable (Castillo-Reyes *et al.*, 2014). También son una parte integral en los procesos de revegetación y reforestación, ya que al adicionarlos al suelo pueden reducir la erosión del mismo (Bashan *et al.*, 2005).

Aunque el estudio de las comunidades microbianas en cactáceas es un campo relativamente poco explorado, existen antecedentes a este respecto como el análisis de las comunidades bacterianas de la rizósfera de cactáceas endémicas de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012,

Torres-Cortés *et al.*, 2012); en Brasil se realizó el estudio de la fracción cultivable de bacterias asociadas a cactáceas de la región de Caatinga, capaces de crecer con baja disponibilidad de agua, para ser utilizadas en la recuperación de suelos desérticos, al brindarle a las plantas la capacidad de crecer en condiciones de estrés hídrico (Kavamura, 2012); en Perú se estudiaron las comunidades bacterianas de la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* (L.) mill (Salomon y Ayala, 2016); y en Querétaro se emplearon cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de *Coryphantha radians* y *Mammillaria magnimamma* para promover el crecimiento de *Mammillaria zeilmanniana* (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

Actualmente, en el laboratorio de Ecología Molecular de la UAM Xochimilco, se está desarrollando un amplio proyecto que involucra el análisis de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de cactáceas del semidesierto queretano, en estatus de riesgo, a través de enfoques microbiológico, metagenómico y ecológico, en el que se enmarca este trabajo, pues resulta importante hacer la caracterización de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus*, en especial aquellas que son capaces de promover el crecimiento vegetal, puesto que podrían ser útiles para mejorar el desarrollo de esta planta y contribuir a su conservación.

A pesar de que se tiene como antecedente un estudio enfocado a evaluar el efecto de las PGPR directamente sobre las biznagas (Castillo-Reyes *et al.*, 2014), éste se limita a la etapa de germinación de las semillas, puesto que el crecimiento de la planta es muy lento y sería poco viable realizar el proyecto durante el desarrollo de la planta en tiempo real, ya que podría llevar más de 10 años, por lo que resulta necesaria la utilización de un modelo experimental de rápido crecimiento, como *Arabidopsis thaliana*.

3.5. *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental.

Arabidopsis thaliana es una planta vascular, angiosperma, de la clase de las dicotiledóneas y de la familia de las Brasicáceas o crucíferas (Tabla 4). Es una planta herbácea con una altura de 10 a 30 cm, el tallo es erecto con ramificaciones un poco alejadas de la base. Las hojas son simples con forma elíptica u oval y con bordes enteros; posee dos tipos de hojas, las basales de hasta 2 × 0.5 cm, y las arrosetadas que están pegadas al suelo y formando una roseta, de cuyo centro saldrá el tallo (Becerra *et al.*, 2006; Manzano, 2008; Martínez *et al.*, 2009; Venegas, 2013; Ramones, 2016).

Las inflorescencias se presentan en racimos en el extremo de las ramas de los tallos. Las flores son hermafroditas, de 5 mm de diámetro aproximadamente, formadas de cuatro pétalos blancos, espatulados y en su centro aparece el fruto denominado silicua, de forma cilíndrica y alargada, arqueado y sin pelos, de 3 cm de largo y 1 mm de ancho, además contiene dos cavidades que contienen unas 30 semillas ovoideas dispuestas en hilera, lisas, de color anaranjado y miden 0.5 mm aproximadamente (Figura 10. Venegas, 2013).

Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Taxonomy, 2017).	
Súper reino	Eucariota
Reino	Viridiplantae
Phylum	Streptophyta
Subphylum	Streptophytina
Plantas terrestres	Embriophyta
Plantas vasculares	Tracheophyta
Plantas vasculares	Euphyllophyta
Plantas con semillas	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Mesangiospermae
Clase	Eudicotyledons
Subclase	Gunneridae
Eudicots	Pentapetalae
Orden	Rosids
Suborden	Malvids
Familia	Brassicales
Subfamilia	Brassicaceae
Tribu	Camelineae
Género	<i>Arabidopsis</i>
Especie	<i>thaliana</i>



Figura 10: Representación esquemática de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra los tipos de hoja (de roseta y de cuerpo), la disposición de las flores y las silicuas donde se alojan las semillas. Tomado de Ramones, 2016

Es una planta que a pesar de no tener un valor económico como tal, es utilizada como modelo experimental desde 1943 para estudios botánicos, citogenéticos, evolutivos y poblacionales, así como también en estudios de estructura celular y molecular, gracias a sus múltiples características que permiten una fácil manipulación como: ciclo de vida corto (6 semanas), tamaño pequeño (30 cm), es prolífica (produce hasta 10 000 semillas por planta), es autógama (se auto poliniza sin ayuda externa) y posee un genoma pequeño de 135 **Mb** aproximadamente dispuestas en 5 cromosomas (Becerra *et al.*, 2006; Manzano, 2008; Tognacca, 2012; Ramones, 2016).

Es posible considerarla como modelo experimental ya que se ha demostrado que los procesos biológicos que ocurren en ella son parecidos a los que ocurren en una gran variedad de plantas, como por ejemplo el arroz, trigo, guisantes, pepino y cualquier planta con flores, lo que permite extrapolar los resultados obtenidos en experimentos realizados con *A. thaliana* a cualquier otra especie vegetal (Berna, 1997, Marco, 2000; Ramones, 2016).

3.5.1. Ciclo vital.

Su ciclo de vida (Figura 11) se divide en cinco etapas que se describen a continuación (Becerra *et al.*, 2006; Manzano, 2008):

1. **Embriogénesis:** se establecen dos meristemos principales (el meristemo apical del tallo, que dará lugar a las partes aéreas de la planta, y el meristemo apical radicular, que originará las raíces), dando origen al eje apical-basal de la planta.
2. **Germinación:** establecimiento de la plántula con los dos meristemos principales, una radícula y dos cotiledones u hojas embrionarias.
3. **Fase vegetativa:** el meristemo apical del tallo produce hojas posicionadas a poca distancia entre una y otra, esta estructura formada se denomina entrenudo y da como resultado una roseta compacta.
4. **Fase reproductiva:** durante esta fase se forma el tallo principal debido a un aumento en la longitud de los entrenudos, a partir del meristemo de tallo; también aparecen meristemos laterales asociados a las axilas de las hojas, generando ramificaciones en cuyos extremos se forman inflorescencias.
5. **Gametogénesis** o Fase de fertilización: en esta fase la flor alcanza la madurez y tiene lugar la autopolinización y la fertilización de los óvulos, esto genera fructificación y el desarrollo de las semillas.

También es posible describir una etapa adicional que es la etapa de **senescencia** y tiene lugar al final de la fase reproductiva, en esta etapa las plantas sufren dehiscencia y escisión de órganos como las silicuas, lo que permite la liberación de las semillas contenidas en su interior (Manzano, 2008).

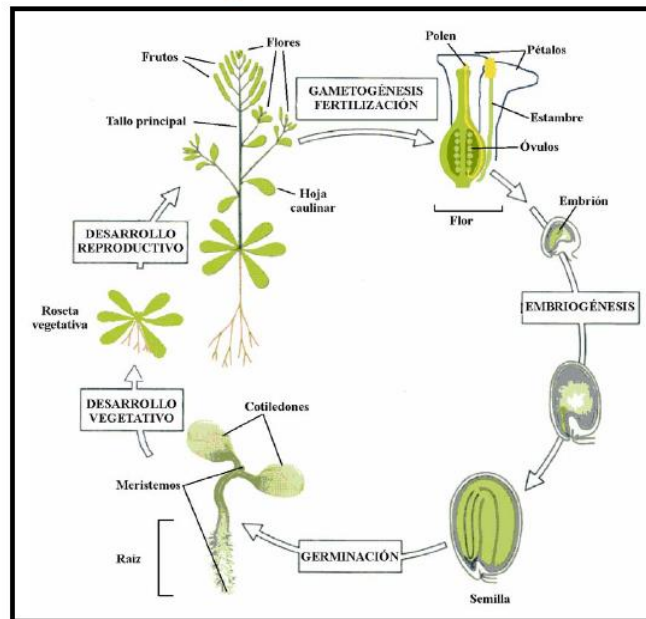


Figura 11: Ciclo de vida de *A. thaliana*. Se observan las 5 etapas de desarrollo: Embriogénesis, Germinación, Desarrollo Vegetativo, Desarrollo Reproductivo y Germinación; y las estructuras más relevantes de cada etapa. Tomado de Manzano, 2008.

3.5.2 Estudios de PGPR en *A. thaliana*.

Ha habido estudios sobre PGPR que se han realizado utilizando como modelo experimental a *Arabidopsis thaliana*; algunos de ellos se muestran a continuación:

En el 2013, Alizadeh y colaboradores, evaluaron la capacidad de *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas* sp, aislados de *Cucumis sativus* (pepino), para inducir la resistencia sistémica de *A. thaliana* contra *Botrytis cinerea*, y encontraron una reducción de la enfermedad aproximadamente del 20%, en comparación con un grupo control.

Ali, en 2015, evaluó la capacidad de algunas cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas*, productoras de ácido indol acético, para incrementar el crecimiento de *A. thaliana* silvestre y tres mutantes, una insensible a auxinas, otra insensible a auxinas y a etileno, y la tercera insensible sólo a etileno. Para el caso de *A. thaliana* silvestre, encontraron que la inoculación con *B. subtilis* generó un aumento en la longitud de los brotes (38%) y el número de silicuas (180%) y la inoculación con *P. aeruginosa* generó un incremento en el peso fresco del brote (107%). Las mutantes insensibles a auxinas obtuvieron resultados similares a los del grupo control; las mutantes insensibles a auxinas y etileno tuvieron un aumento en la longitud del brote de 10% y del número de silicuas en un 28% respecto al control, utilizando a *B. subtilis* como inoculante, y un incremento en el peso fresco del brote (40%) al ser inoculadas con *P. aeruginosa*; para el caso de las mutantes insensibles a etileno, se registraron aumentos significativos en la longitud de los brotes (5% con *B. subtilis* y 8% con *Pseudomonas* sp.), el peso fresco del brote (alrededor del 35% con ambas cepas)

y el número de silicuas (20% con *B. subtilis*). Con estos resultados concluyeron que la producción bacteriana de fitohormonas y regulación de la concentración de etileno están implicadas en el crecimiento de la planta, y que la interacción PGPR-*A. thaliana* constituye un buen modelo para entender el efecto de las rizobacterias sobre el crecimiento de plantas de cereales de importancia agronómica, como *Triticum aestivum* (trigo).

Por último, Rahmoune y colaboradores, en 2017, buscaron caracterizar la capacidad PGPR de *Pseudomonas plecoglossicida* aislada de *Arecaceae* (palmera), *Bacillus spec* aislada de *Pyrus* (pera) y *Lysinibacillus fusiformis* aislada de *Solanum lycopersicum* (jitomate), utilizando como modelo vegetal *A. thaliana*. El resultado obtenido fue que la inoculación con las tres cepas, de manera independiente, mejoró el crecimiento y desarrollo de la planta al generar una variación en el contenido de carbono y nitrógeno, mejorando la longitud de la raíz, el número de raíces laterales, el diámetro de la roseta y el peso seco de la raíz.

El estudio de las PGPR puede realizarse desde dos enfoques fundamentales, en primer lugar, se debe realizar el aislamiento y caracterización, tanto microbiológica como filogenéticamente, de las bacterias que estén asociadas a una especie vegetal de interés; y, en segundo lugar, es necesario evaluar su capacidad para promover el crecimiento en dicha especie vegetal. Esto permite conocer la composición y estructura de las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera de las plantas, identificar microorganismos ya reportados y encontrar nuevos microorganismos que puedan presentar alguna actividad de interés para ser utilizados en biotecnología agrícola (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Cheang *et al.*, 2007; Wahyudi *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2013).

3.6. Análisis filogenético

La filogenia es la ciencia encargada del estudio de la evolución y desarrollo de las especies mediante la comparación de secuencias de macromoléculas, cuyo análisis permite establecer inferencias filogenéticas a partir de distancias evolutivas (Herrera, 2005).

Por lo tanto, un análisis filogenético es la forma de estimar una historia evolutiva de un organismo en estudio mediante la obtención de un árbol o cladograma que puede ser estimado con el uso de programas bioinformáticos, mediante diferentes algoritmos de inferencia estadística como: máxima parsimonia, máxima verosimilitud, inferencia bayesiana y *neighbor joining* (Ramírez y Ramírez-Saad, 2002; del Rosario y del Carmen, 2004; Herrera, 2005; Peña, 2011; Ibáñez y Méndez, 2014).

En microbiología, el análisis filogenético se ha convertido en una herramienta importante y de gran utilidad para caracterizar microorganismos ya que permite clasificarlos de acuerdo con la relación evolutiva que tienen entre sí. Los estudios filogenéticos en las bacterias pueden realizarse mediante la secuenciación de los genes 16S rRNA, cuya comparación con una base de datos preexistente, y de

acuerdo con el grado de similitud que presente con otra secuencia, establecerá su relación evolutiva (del Rosario y del Carmen, 2004; Herrera, 2005; Peña, 2011), por ello han sido elegidos como la base molecular para reconstrucciones filogenéticas en células procariotas (Roselló-Mora y Amann, 2001).

3.6.1. Gen 16S rRNA.

El gen 16S ribosomal o **16S rRNA** es un gen bacteriano de aproximadamente 1550 pb que se ha conservado en las bacterias a través del proceso evolutivo, codifica la subunidad pequeña (16S) del RNA ribosomal. Como se muestra en la Figura 12, posee regiones conservadas comunes en todas las bacterias, pero también tiene regiones con suficiente variación para poder identificar un género y tal vez una especie particular, esto lo convierte en el marcador taxonómico-molecular más utilizado para la clasificación e identificación taxonómica y filogenética de bacterias (del Rosario y del Carmen, 2004; Herrera, 2005; Morales-García *et al.*, 2010; Yarza *et al.*, 2014^a; Yarza *et al.*, 2014b).

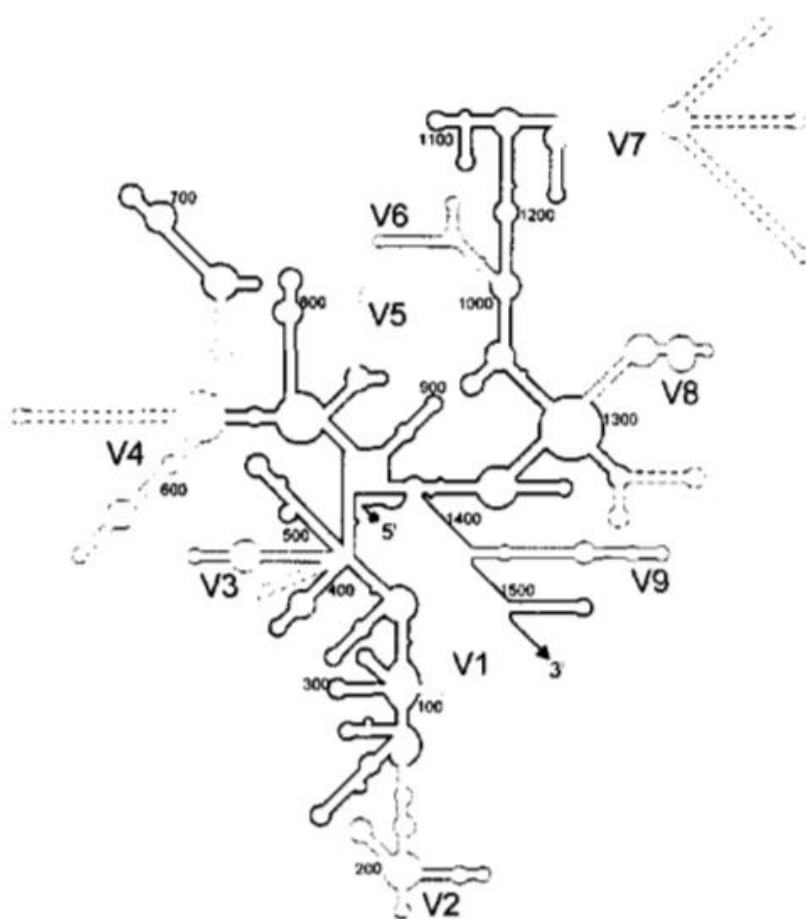


Figura 12: Estructura secundaria del gen 16S rRNA mostrando las regiones conservadas (líneas oscuras), regiones variables marcadas V1 a V9 (líneas claras), y regiones hipervariables (líneas punteadas). Tomado de Ramírez-Saad, 1999.

La identificación bacteriana se lleva a cabo mediante la secuenciación completa o parcial de este gen, para lo que es necesaria la amplificación del mismo utilizando *primers* específicos que se unen a las regiones conservadas, permitiendo la amplificación de la región variable que se localiza entre ellas (Figura 13). Una de las técnicas de secuenciación más utilizadas para este fin es la secuenciación que desarrolló Fredeick Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

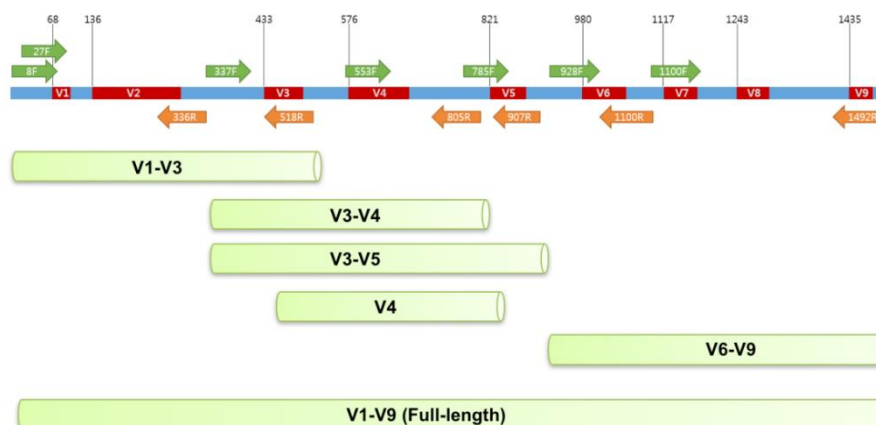


Figura 13: Sitios de unión a *primers* específicos para la amplificación del gen 16S rRNA. Los rectángulos azules representan las regiones conservadas, los rectángulos rojos las regiones variables y las flechas los *primers* específicos que se unen en la posición en la que se muestran en la imagen. Diferentes combinaciones de *primers* amplifican diferentes fracciones, o el gen completo. Tomado de EZBioCloud (<https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>).

El estudio de los genes 16S rRNA es viable para la clasificación bacteriana ya que se sabe que, además de ser un gen conservado en todas las células procariotas, no se ha producido una transferencia lateral de estos genes entre bacterias y la variación mostrada entre secuencias está relacionada con la evolución o disparidad entre un par dado de organismos, lo que se refleja en distancias evolutivas entre ellos. Por lo anterior el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se ha convertido en una técnica básica en los laboratorios de Microbiología y Biología Molecular ya que facilita la descripción de la mayoría de las especies y genera un marco estable para la clasificación e identificación bacteriana (Roselló-Mora y Amann, 2001).

4. ANTECEDENTES.

En el laboratorio de Ecología Molecular se realizó un muestreo de material rizosférico de biznagas en una población silvestre de Tolimán, Querétaro, en dos diferentes temporadas: al inicio y final de la temporada de lluvias (junio y octubre de 2015, respectivamente), asumiendo que la cantidad de agua presente en el suelo podría influir sobre la estructura y composición de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de la cactácea.

A partir de estas muestras rizosféricas de *E. platyacanthus* se aislaron las bacterias exógenas y endógenas en medio de cultivo para heterótrofos; en total se obtuvieron 268 aislados que fueron caracterizados morfológicamente, considerando la forma, color, luz transmitida y reflejada, superficie, elevación, borde y consistencia de las colonias, así como las características celulares que se definieron a través de Tinción Gram (Salinas-Virgen, 2015).

Posteriormente, se extrajo el DNA genómico de los 268 aislados y se utilizó como molde para amplificar el gen 16S ribosomal, mismo que fue utilizado para realizar un análisis de restricción enzimática (**REA**) que permitió hacer el agrupamiento de las bacterias en función de sus patrones de restricción. Con esto se obtuvieron 41 ribotipos donde se ubicaron los 268 aislados (Salinas Virgen, 2015). Este trabajo previo da la pauta para iniciar el presente proyecto.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Tendrán actividad PGPR, *in vitro* e *in planta*, las bacterias endófitas y rizosféricas, aisladas de *Echinocactus platyacanthus*?

6. HIPÓTESIS.

Si algunas de las bacterias aisladas de *E. platyacanthus* poseen actividad PGPR *in vitro*, al ser utilizadas como inoculantes de *A. thaliana* tendrán un efecto positivo en su crecimiento.

7. OBJETIVOS.

7.1 Objetivo General.

Caracterizar bajo criterios filogenéticos las bacterias rizosféricas y endófitas aisladas de *Echinocactus platyacanthus*, analizando sus capacidades como PGPR *in vitro* e *in planta*, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana*.

7.2. Objetivos específicos.

- 1) Caracterizar, mediante el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA, las cepas representantes de los 41 ribotipos obtenidos de los muestreos de *E. platyacanthus*.
- 2) Realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas de las 45 bacterias seleccionadas.
- 3) Determinar si estas bacterias poseen actividad PGPR *in vitro* (fijación de N₂, solubilización de fosfatos, producción de IAA y biocontrol de fitopatógenos), sembrándolas en medios selectivos que denoten dicha actividad.
- 4) Hacer la caracterización bioquímica de las bacterias con actividad PGPR, con el uso de galerías API.
- 5) Evaluar, *in planta*, la actividad PGPR de estos microorganismos, utilizando como modelo de rápido crecimiento a *Arabidopsis thaliana*.

8. METODOLOGÍA.

8.1. Siembra de bacterias.

Se sembró cada bacteria en medio líquido TY (Anexo I) a partir de cultivos líquidos crio-preservados en glicerol al 50% (Aguirre-Garrido, 2012), que se obtuvieron en el trabajo previo de Salinas-Virgen (2015).

8.2. Extracción de DNA.

Se realizó la extracción de DNA bacteriano usando el kit de extracción *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche; Ref: 11796828001) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo II). La obtención de DNA de alto peso molecular se observó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, teñido en solución de Bromuro de Etidio (5 µg/mL), usando como marcador de tamaño molecular DNA de fago λ digerido con *EcoRI* (Anexo III).

8.3. Amplificación y purificación del gen 16S rRNA.

Una vez obtenido el DNA genómico de cada aislado, se hizo una dilución 1:10 del mismo para poder realizar la amplificación por PCR del gen 16S ribosomal (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012) utilizando los *primers* 8F y 1492R (Anexo IV).

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, teñido en solución de Bromuro de Etidio (5 µg/mL), con el marcador de tamaño molecular de 100 a 3,000 pb de AXYGEN (ID: PID0173430) (Anexo III); se esperaba la obtención de un producto de 1,500 pb.

Al cerciorarse que se habían obtenido los productos de PCR esperados, se purificaron con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega; Ref: A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo V) y se cuantificaron en gel de agarosa al 1% (Anexo III).

8.4. Secuenciación tipo Sanger.

Los genes 16S rRNA purificados se enviaron a secuenciar, en ambos sentidos de la cadena (*Forward* y *Reverse*), a la empresa MACROGEN en Corea. Las secuencias obtenidas fueron la materia prima para realizar el análisis filogenético y la identificación molecular de las bacterias.

8.5. Análisis filogenético.

Una vez que se obtuvieron las dos secuencias correspondientes al gen 16S rRNA de cada bacteria, se realizó un análisis bioinformático (Anexo VI) en diferentes programas -*BioEdit* (Hall, 1999), *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997), *SeaView* (Galtier *et al.*, 1996; Gouy *et al.*, 2010), *JModelTest* (Darriba *et al.*, 2012) y *Mega6* (Tamura *et al.*, 2013)- y plataformas -*BLASTN* (Zhang, *et al.*, 2000), *Bellerophon* (Huber, *et al.*, 2004), *GenBank* (Benson *et al.*, 2005) y *EZTaxon* (Yoon *et al.*, 2017)-, que culminó en la identificación taxonómica y la construcción del árbol filogenético de las bacterias en estudio (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012).

Las secuencias fueron subidas a la base de datos GenBank de NCBI para su publicación y libre acceso (a partir de enero de 2020).

8.6. Determinación *in vitro* de actividades promotoras del crecimiento vegetal.

Para determinar si las bacterias son capaces de realizar una o más actividades promotoras del crecimiento, se siguió el procedimiento descrito para cada actividad.

8.6.1. Fijación biológica de nitrógeno.

Para determinar si las bacterias pudieran ser capaces de fijar nitrógeno, se hizo la amplificación del gen *nifH* (Caballero-Mellado *et al.*, 2007; Navarro-Noya, 2010; Aguirre-Garrido, 2012), que contiene la información para que la bacteria produzca la enzima nitrogenasa, parte del complejo enzimático NASA, necesario para realizar esta actividad promotora del crecimiento (Baca *et al.*, 2000).

Se utilizaron dos tipos de *primers*: universales, diseñados para detectar el gen en cualquier bacteria sin importar el grupo taxonómico al que pertenezca, y específicos diseñados para detectar el gen en bacterias de grupos taxonómicos específicos (Tabla 5).

Tabla 5: <i>Primers</i> utilizados para la amplificación del gen <i>nifH</i> (Anexo VI).		
<i>Primers</i> universales	<i>Primers</i> específicos	
	Nombre del <i>primer</i>	Grupo detectado
<i>NifH</i> FA	Azo-F	γ-Proteobacteria.
	Azo-R	
	Clos-F	Firmicutes
	Clos-R	
<i>NifH</i> R	Enter-F	γ-Proteobacteria.
	Enter-R	

Una vez que se obtuvo el fragmento del tamaño esperado para cada juego de *primers* (Anexo VII), se cargó el volumen total de 3 reacciones de PCR (por cada muestra) en un gel de agarosa al 2%, del que se cortó la banda correspondiente al tamaño esperado y se purificó el DNA contenido en cada una con el *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega; Ref: A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo V).

Los productos purificados se visualizaron y cuantificaron en geles de agarosa al 2% (Anexo III), y se enviaron a secuenciar, solo en el sentido *Forward*, a la empresa Macrogen en Corea. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos de NCBI para determinar si correspondían al gen *nifH*.

8.6.2. Solubilización de fosfato.

Para determinar si las bacterias son capaces de solubilizar fosfato se realizó una prueba cualitativa que consistió en la siembra de cada cepa en medio sólido selectivo NBRIP (Anexo I) para solubilizadores de fosfato inorgánico y se evaluó la formación de un halo de solubilización a las 72 y a las 120 h, clasificando a las bacterias en función del tiempo de formación del halo en: solubilizadoras tempranas (72 h), solubilizadoras tardías (120 h) y no solubilizadoras (no formaron halo) (Álvarez *et al.*, 2014). Además, se calculó el índice de solubilización de las bacterias con el que fueron clasificadas en función de su capacidad de solubilización como baja ($IS < 2$), media (IS entre 2 y 4) o alta ($IS > 4$), como lo describieron Angulo y colaboradores, en 2014, basándose en la técnica de Marra y colaboradores en 2011.

Por otro lado, se realizó una prueba cuantitativa para determinar la cantidad de fosfato que las bacterias fueron capaces de solubilizar, esta prueba consistió en la siembra de las bacterias en medio NBRIP líquido, para la cuantificación de fosfato soluble en el medio, a partir de la técnica de fosfomolibdato (Murphy y Riley, 1962).

Los protocolos completos de evaluación de la solubilización de fosfato se muestran en el Anexo VIII. Tanto el ensayo en sólido como el ensayo en líquido, se realizaron por triplicado para cada muestra en estudio.

8.6.3. Producción de ácido indol acético.

Para determinar si las bacterias son capaces de producir ácido indol acético, se realizó una prueba cuantitativa que consistió en la siembra de las mismas en medio Burk (Anexo I; Lara, 2014) suplementado con triptófano, precursor del ácido indolacético, y se evaluó por espectrofotometría la cantidad de IAA presente en el medio, siguiendo el protocolo descrito en el Anexo IX.

Las bacterias se clasificaron en función de la cantidad de IAA producido a partir del siguiente criterio: producción baja (de 1 a 35 $\mu\text{g/mL}$), producción media (de 36 a 70 $\mu\text{g/mL}$) y producción alta (más de 70 $\mu\text{g/mL}$); clasificación propia elaborada por la falta de una clasificación previamente reportada. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra en estudio.

8.6.4. Biocontrol de fitopatógenos.

Se evaluó la capacidad de las bacterias de ejercer biocontrol sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Ustilago maydis*, sembrando de manera simultánea a cada hongo y la bacteria correspondiente en una caja Petri (Figura 14), en la que se podía observar si hubiera interacción antagonista entre ellos (Anexo X). Se calculó el porcentaje de inhibición que ejercen las cepas en estudio sobre los hongos de prueba, lo que sirvió para clasificar a las bacterias dependiendo de su capacidad de inhibición en: poco inhibidoras ($\%I < 30\%$), inhibidoras moderadas ($30\% < \%I < 40\%$), inhibidoras fuertes ($\%I > 40\%$) y no inhibidoras (Wahyudi *et al.*, 2011). El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra en estudio.

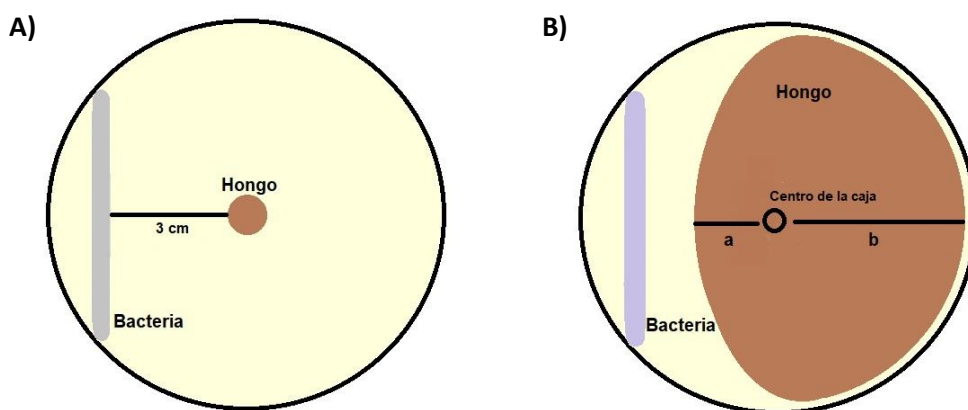


Figura 14: Representación esquemática del cultivo de un hongo y una bacteria para evaluar su relación antagonista. A) Siembra simultánea del hongo y la bacteria en estudio. B) Interacción antagonista esperada entre el hongo y la bacteria; a y b son las distancias medidas para calcular el porcentaje de inhibición.

8.7. Caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas para realizar pruebas *in planta*.

Se realizó la caracterización bioquímica de las bacterias que fueron capaces de realizar actividades promotoras del crecimiento *in vitro* y, en función de los resultados obtenidos, fueron seleccionadas para realizar pruebas *in planta*. Se usaron galerías **API 20 NE** (Nakbanpote *et al.*, 2014), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo XI.

Las galerías API 20 NE consisten en 8 ensayos de actividad enzimática que evalúan la reducción de nitratos a nitritos o nitrógeno, formación de indol, fermentación de glucosa, actividad Arginina Dihidrolasa, actividad Ureasa, hidrólisis de Esculina (actividad β -glucosidasa), hidrólisis de gelatina (actividad proteasa) y actividad β -galactosidasa, además de 12 ensayos de asimilación de los sustratos: Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Caprico, Acido Adípico, Ácido Málico, Citrato Trisódico y Ácido fenilacético. Adicionalmente, se realizaron las pruebas para catalasa y oxidasa.

8.8. Determinación de actividad *in planta*.

Se hizo la determinación de la capacidad de las bacterias para promover el crecimiento *in planta* utilizando semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0), sin modificaciones genéticas (*Wild type*).

Las semillas se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, agitando en vórtex a 5,000 rpm durante 3 minutos y haciendo cambio de solución después de la agitación, este procedimiento se realizó 3 veces; posteriormente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio (Ramones, 2015); Se sembró una alícuota del último enjuague en una caja Petri con medio enriquecido para heterótrofos totales (TY), con la intención de comprobar la eliminación de microorganismos. Por último, se resuspendieron las semillas en 1 mL de agua destilada estéril y se guardaron a 4°C durante 96 h para su vernalización (Ali, 2015).

Pasado el tiempo de vernalización, se sembraron las semillas en cajas Petri circulares (60 x 15 mm) con medio MS sólido (Anexo I), con ayuda de una micropipeta y siguiendo la distribución que se muestra en la Figura 15. Las cajas se colocaron a 4°C durante 24 h para sincronizar la germinación; pasado ese tiempo, se transfirieron a la cámara de crecimiento bajo luz de día proporcionada por lámparas General Electric de 15 watts, en un fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad, a una temperatura de $22\pm3^{\circ}\text{C}$, durante tres semanas, tiempo en el que las semillas germinaron, formaron cotiledones y hojas verdaderas.

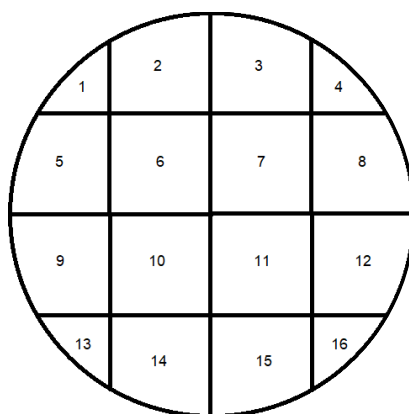


Figura 15: Patrón de distribución para la siembra de semillas de *Arabidopsis thaliana* en cajas Petri con medio MS sólido. Se sembró una semilla al centro de cada recuadro de la imagen. El esquema está a tamaño real.

Se probaron trece tratamientos, de los cuales, once (P1.1, P2.1, P6, P12, P13, P16, P23, P31, P35, P38, P40 y P1.2) correspondieron a la colección de bacterias ribotipificadas, y dos grupos control, uno positivo, inoculado con *Azospirillum brasilense* y otro negativo, inoculado con agua destilada estéril; se utilizaron 2 cajas Petri por tratamiento y se sembraron 16 semillas en cada una. Se registró el porcentaje de germinación del total de semillas a las 24, 48 y 72 h después de su siembra. Una vez que protruyeron las hojas verdaderas (tres semanas después de la siembra de las semillas), las plántulas fueron inoculadas con 5 mL de suspensión celular de cada bacteria en estudio, con una concentración de 1.6×10^7 UFC/mL, que se adicionaron directamente sobre el medio MS; permanecieron en incubación durante 2 h. Para el control negativo se utilizaron 5 mL de agua destilada estéril.

Pasado el tiempo de incubación, 12 plántulas de cada tratamiento seleccionadas al azar, se trasplantaron a macetas de polipapel de 6.5 x 6.5 x 8.5 cm (largo x ancho x alto) que contenían una mezcla de suelo compuesta por: *peat moss*, agrolita y vermiculita, en proporciones 3:1:1:1, respectivamente, misma que fue previamente tindalizada en autoclave; las macetas se mantuvieron en la cámara de crecimiento (Ali, 2015) donde fueron regadas con agua destilada y cambiadas de lugar tres veces por semana.

Para verificar que no había presencia de otros microorganismos en las plántulas, antes de la inoculación, se tomó un fragmento del medio MS y una plántula de la

caja correspondiente a cada tratamiento, que se colocaron sobre medio TY; posteriormente se procedió a la inoculación de las plántulas adicionando la suspensión bacteriana a la caja que las contenía y dejándola en incubación durante el tiempo indicado.

Después de la inoculación de las plántulas, se tomó otro fragmento del medio MS y otra plántula y se colocaron sobre medio TY, en la misma caja que se utilizó previamente, para verificar si la inoculación se llevó a cabo. Por último, las cajas de medio TY, con las plántulas antes y después de la inoculación, se dejó en incubación a 37°C por 24 h; pasado este tiempo se observó el crecimiento bacteriano en las plántulas inoculadas.

Se registraron los parámetros de crecimiento porcentaje de supervivencia, tiempo de aparición del tallo principal, tiempo de aparición de los tallos secundarios, número de tallos, tiempo de aparición de inflorescencias, número de inflorescencias, presencia de hojas caulinares, diámetro de la roseta, altura de cuerpo aéreo (Ali, 2015), cada semana, hasta la sexta semana después del trasplante. Los valores empleados para el análisis estadístico fueron los obtenidos en la última semana de medición, de todos los parámetros, salvo los tiempos de aparición de los tallos y de las inflorescencias.

El diseño experimental fue el siguiente:

Unidad experimental: 1 planta de *A. thaliana*.

Número de repeticiones: 12 para cada tratamiento.

Diseño experimental: Completamente al azar.

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media poblacional.

τ_i = Efecto del tratamiento i-ésimo (bacteria inoculante a, b, c, ...).

ε_{ij} = Error experimental.

8.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico consistió en realizar un análisis de varianza y una prueba de diferencia de medias de Tukey a los resultados obtenidos de cada prueba; el nivel de significancia fue de 0.05, utilizando el software estadístico JMP14.

9. RESULTADOS.

Se aislaron 268 bacterias a partir de muestras de rizósfera de *Echinocactus platyacanthus*, se extrajo DNA genómico de estos aislados, se amplificó su gen 16S rRNA y se agruparon por análisis de restricción enzimática (**REA**) del mismo gen, en 41 grupos de ribotipos nombrados como P1 a P41 (Salinas Virgen, 2015). Se seleccionó un representante de cada ribotipo, excepto para el caso de los ribotipos P1, P2, P18 y P26 que tienen mayor número de aislados. En estos casos se seleccionaron 2 cepas (nombradas P1.1, P1.2, P2.1, P2.2, P18.1, P18.2, P26.1 y P26.2), en total se obtuvieron 45 cepas que fueron utilizadas para este estudio. Como se verá más adelante, 36 de las 45 cepas fueron caracterizadas molecular y microbiológicamente.

9.1 Extracción de DNA.

Se realizó la extracción de DNA genómico de las 45 cepas en estudio, los resultados obtenidos se visualizaron en geles de agarosa como el que se muestra en la Figura 16.

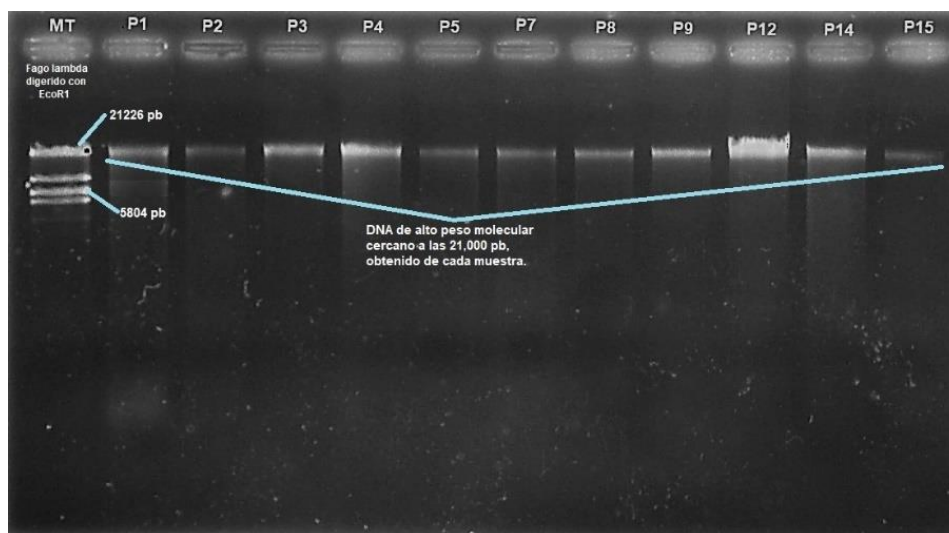


Figura 16: Gel de electroforesis, agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Se observa el DNA genómico de algunas de las cepas en estudio, extraído con el kit de Roche (Ref: 11796828001). El marcador de tamaño molecular es DNA del fago λ, digerido con *EcoRI*.

En la figura se observa la obtención de una banda de alto peso molecular que se encuentra alrededor de los 21,000 pb, de acuerdo con el marcador de tamaño molecular utilizado. El resultado obtenido fue similar para cada una de las muestras.

9.2. Amplificación por PCR del gen 16S rRNA.

Se amplificó el gen 16S rRNA a partir del DNA genómico extraído de cada muestra, los resultados obtenidos se visualizaron en geles de agarosa como el que se muestra en la Figura 17.

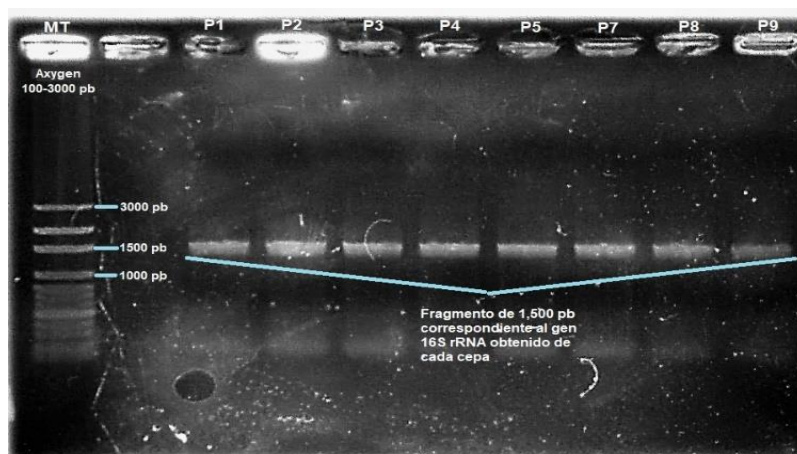


Figura 17: Gel de electroforesis, agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Se observa la obtención de una banda de 1,500 pb correspondiente al gen 16S rRNA amplificado por PCR. El marcador de tamaño molecular utilizado fue el de 100 a 3000 pb de AXYGEN (ID: PID0173430).

En la figura se observa la obtención del fragmento esperado, con un tamaño de 1500 pb de acuerdo con el marcador de tamaño molecular utilizado. Se logró la amplificación del gen 16S rRNA de todas las muestras y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a Macrogen, Corea.

9.3. Identificación bacteriana.

Se hizo la comparación de la secuencia obtenida de cada bacteria con las bases de datos GenBank de NCBI (comparación con secuencias tipo) y EZTaxon para conocer el género al que pertenecen dichas bacterias. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 donde se puede ver el nombre de la bacteria asignado en el laboratorio (determinado por el número de patrón de restricción que representa), su número de acceso en GenBank y la identificación taxonómica en ambas bases de datos, de acuerdo con la secuencia más cercana a cada cepa en estudio.

También puede verse que la identidad de las bacterias concuerda a nivel de género en las dos bases de datos, ya que a nivel de especie existen variaciones en los resultados obtenidos para cada cepa. Por lo tanto, la identidad de cada bacteria se determinó con los resultados obtenidos en EZTaxon, tomando en cuenta que esta base de datos permite realizar una identificación taxonómica precisa al poseer un algoritmo de comparación robusto e incluir únicamente secuencias correspondientes a cepas tipo. De esta manera se evita la comparación con secuencias de clones ambientales que pudieran ser erróneas o estar mal etiquetadas (Chun *et al.*, 2007) que sí son incluidas en otras bases de datos.

Los parámetros que permiten identificar taxonómicamente a las bacterias en EZTaxon son el porcentaje de exhaustividad y el porcentaje de similitud. El porcentaje de exhaustividad es una medida objetiva del grado de cobertura de la secuencia del gen 16S rRNA problema, con respecto a una secuencia utilizada como referencia -considerada como completa-, el porcentaje mínimo requerido para la identificación taxonómica es de 95%, porcentajes inferiores indican baja calidad

de las secuencias problema y podrían generar resultados erróneos (Kim *et al.*, 2012). El porcentaje de similitud indicará el género al que pertenece una secuencia problema si el valor es superior al 95% (Bou *et al.*, 2011) o la especie, si el valor es mayor al 98.7%. Este porcentaje es calculado en función de la exhaustividad y del número de diferencias totales entre la secuencia problema y una de referencia (Kim *et al.*, 2014).

Bajo estos lineamientos fue posible identificar 36 de las 45 cepas en estudio, se identificaron a nivel de género las cepas: P4, P5, P8, P11, P16, P22, P25, P26.1, P28, P35, P36 y P41, al tener un porcentaje de similitud mayor a 95% y menor al 98.7%; las cepas P1.1, P2.1, P3, P6, P7, P9, P12, P13, P14, P15, P18.1, P23, P29, P31, P32, P34, P37, P38, P39, P40, P1.2, P2.2, P18.2 y P26.2 fueron identificadas a nivel de especie al tener un porcentaje de similitud mayor al 98.7%. El resto de las cepas (P10, P17, P19, P20, P21, P24, P27, P30 y P33) no pudieron ser identificarlas debido a que poseen porcentajes de exhaustividad o de similitud menores al 95%, por lo que fueron excluidas del resto del análisis.

Con la clasificación taxonómica se observa que dos o más cepas podrían ser una misma, sin embargo, puede no ser así ya que el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA permite diferenciar organismos a nivel de género, pero carece de suficiente poder de resolución para determinar si dos organismos del mismo género pertenecen o no a la misma especie. Hay ejemplos de especies diferentes con secuencias del gen idénticas, o casi idénticas, también existe una micro heterogeneidad de los genes 16S rRNA dentro de una sola especie o divergencia de secuencias en organismos individuales con dos o más copias del gen (Roselló-Mora y Amann, 2001).

9.4. Análisis filogenético.

Las secuencias de las 36 bacterias que fueron identificadas taxonómicamente fueron sometidas a análisis en el sitio web *Bellerophon* (Huber *et al.*, 2004; <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>) para descartar la formación de secuencias quiméricas. Como resultado de este análisis, ninguna de las secuencias en estudio fue detectada como quimérica.

Posteriormente, se analizaron las secuencias con el software *JModelTest* (Darriba *et al.*, 2012) para conocer el modelo estadístico de sustitución nucleotídica con el que debía realizarse la reconstrucción filogenética, el modelo sugerido por el programa fue Jukes-Cantor.

Por último, se realizó el análisis bioinformático que dio como resultado el árbol filogenético que se muestra en la Figura 18, en el que es posible observar las relaciones filogenéticas que guardan las cepas en estudio con algunas cepas de referencia pertenecientes a los géneros que se obtuvieron de la identificación bacteriana. La construcción del árbol se realizó con el método de Máxima Verosimilitud, el modelo de sustitución nucleotídica Jukes-Cantor y un análisis de Bootstrap de 1000 aleatorizaciones.

Tabla 6: Identificación bacteriana de acuerdo con las bases de datos Gen Bank y EZTaxon

Cepa	Identificación	Números de acceso	GenBank*			EZT
			Secuencia más cercana (número de acceso)	Cobertura (%)	Similitud (%)	
P1.1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MN443613	<i>Pseudomonas koreensis</i> (KU041145.1)	99	99.51	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)
P2.1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN443614	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	100	100	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P3	<i>Paenibacillus lautus</i>	MN062927	<i>Paenibacillus lautus</i> (NR_112724.1)	99	99.72	<i>Paenibacillus lautus</i> (D78473)
P4	<i>Bacillus</i>	MN062928	<i>Bacillus aryabhatai</i> (NR_115953.1)	94	98.02	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)
P5	<i>Paenibacillus</i>	MN062929	<i>Paenibacillus harenae</i> (NR_043220.1)	96	97.71	<i>Paenibacillus harenae</i> (AY839867)
P6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062930	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	99	99.48	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062931	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	100	99.37	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P8	<i>Brevibacterium</i>	MN062932	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (MK424281.1)	93	99.7	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (AM747813)
P9	<i>Bacillus velezensis</i>	MN062933	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	98	99.72	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)
P11	<i>Staphylococcus</i>	MN062935	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (MG757632.1)	97	98.56	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (AF041361)
P12	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	MN443615	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (NR_121739.1)	99	98.65	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (CP007597)
P13	<i>Bacillus siamensis</i>	MN062936	<i>Bacillus siamensis</i> (KY643639.1)	100	99.55	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)
P14	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062937	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	100	99.86	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P15	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MN062938	<i>Bacillus aryabhatai</i> (NR_115953.1)	99	99.65	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)
P16	<i>Pseudomonas</i>	MN062939	<i>Pseudomonas mediterranea</i> (NR_028826.1)	98	98.92	<i>Pseudomonas mediterranea</i> (AUPB010000043)
P18.1	<i>Pseudomonas</i>	MN443616	<i>Pseudomonas koreensis</i> (KU041145.1)	99	97.5	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)
P22	<i>Cutibacterium</i>	MN062943	<i>Cutibacterium acnes</i> (NR_040847.1)	97	99.42	<i>Cutibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)
P23	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062944	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	100	99.57	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P25	<i>Bacillus</i>	MN062946	<i>Bacillus wiedmannii</i> (NR_152692.1)	98	98.25	<i>Bacillus wiedmannii</i> (LOB01000053)
P26.1	<i>Bacillus</i>	MN062947	<i>Bacillus subtilis</i> (MN077147.1)	100	98.73	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)
P28	<i>Bacillus</i>	pendiente	<i>Bacillus subtilis</i> (MN077147.1)	97	99.32	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)
P29	<i>Bacillus tequilensis</i>	MN062948	<i>Bacillus tequilensis</i> (NR_104919.1)	99	99.65	<i>Bacillus tequilensis</i> (AYT001000043)
P31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN062950	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (LN681567.1)	100	99.57	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JALV010000043)
P32	<i>Pseudomonas granadensis</i>	MN062951	<i>Pseudomonas</i> sp. (KT321658.1)	99	99.5	<i>Pseudomonas granadensis</i> (LT629778)
P34	<i>Bacillus velezensis</i>	MN062952	<i>Bacillus subtilis</i> (MN077147.1)	97	99.93	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)
P35	<i>Bacillus</i>	MN062953	<i>Bacillus mojavensis</i> (MH281746.1)	98	98.5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P36	<i>Stenotrophomonas</i>	MN062954	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (LN681567.1)	95	97.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JALV010000043)
P37	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062955	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	100	99.93	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P38	<i>Bacillus velezensis</i>	MN062956	<i>Bacillus tequilensis</i> (NR_104919.1)	98	99.79	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)
P39	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062957	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	99	99.17	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P40	<i>Bacillus paramycoides</i>	MN062958	<i>Bacillus cereus</i> (KY628813.1)	100	98.77	<i>Bacillus paramycoides</i> (MAO101000012)
P41	<i>Pseudomonas</i>	MN062959	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (LN681567.1)	97	99.08	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)
P1.2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MN062960	<i>Pseudomonas koreensis</i> (KU041145.1)	99	99.64	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)
P2.2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	MN062961	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (NR_104873.1)	99	99.23	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN010000043)
P18.2	<i>Pseudomonas koreensis</i>	MN062962	<i>Pseudomonas koreensis</i> (KU041145.1)	99	99.79	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)
P26.2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	MN062963	<i>Bacillus siamensis</i> (MN176482.1)	99	99.4	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (ABQL010000043)

*El valor de espectancia (e-value) en GenBank fue 0 para todas las cepas.

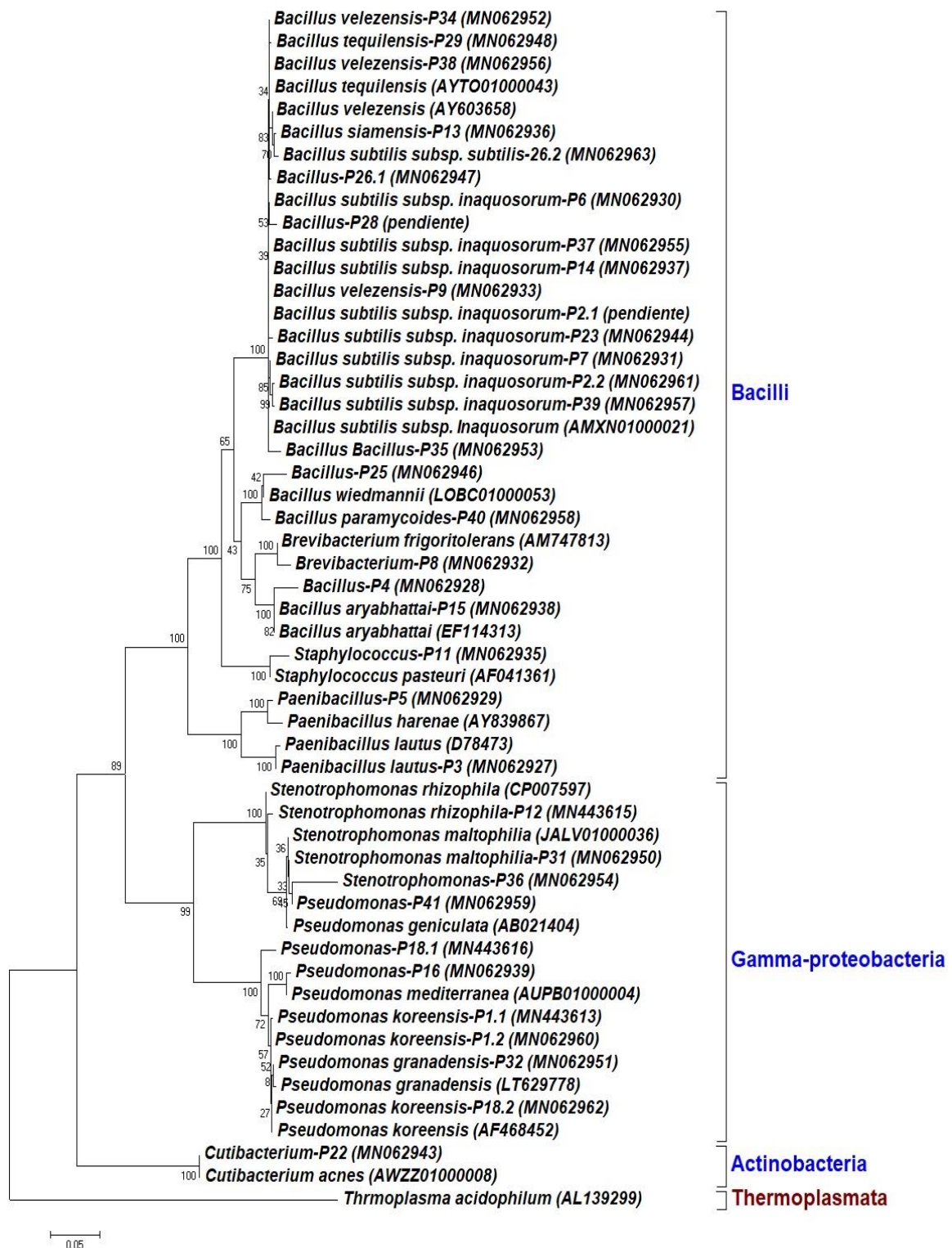


Figura 18: Árbol filogenético de las bacterias en estudio. Construido con el método de Máxima Verosimilitud, modelo de Jukes-Cantor y análisis de Bootstrap de 1000 aleatorizaciones. Enraizado con el *outgroup* *Thermoplasma acidophilum*. Se ve el valor de Bootstrap para cada nodo y una escala de distancia de 0.05.

9.5. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal *in vitro*.

9.5.1. Fijación biológica de nitrógeno.

La determinación de la capacidad de las bacterias para realizar esta actividad se hizo mediante la amplificación del gen *nifH* con *primers* universales (diseñados para detectar el gen en cualquier bacteria, sin importar el grupo taxonómico al que pertenezca) y específicos (diseñados para detectar el gen en bacterias de grupos taxonómicos específicos). Con los *primers* universales se realizó una PCR para cada una de las cepas en estudio, utilizando como control positivo dos cepas previamente reportadas como poseedoras del gen *nifH*, *Klebsiella variicola* y *Azospirillum brasilense*. Se obtuvo la amplificación de fragmentos inespecíficos en todas las cepas y el fragmento esperado, con un tamaño de 464 pb, únicamente estuvo presente en la cepa *Klebsiella variicola*, usada como positivo (Figura 19).

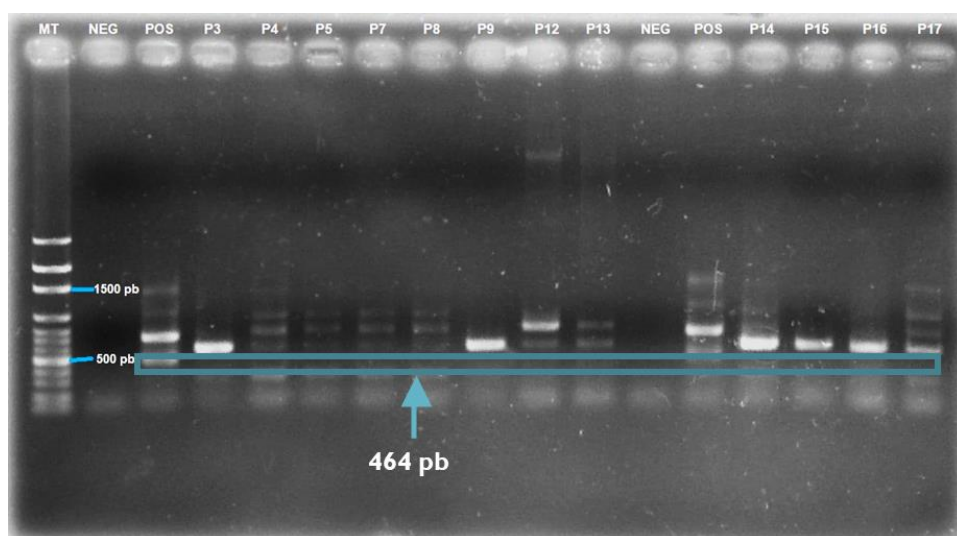


Figura 19: Gel de electroforesis para la visualización del gen *nifH* amplificado por PCR con *primers* universales. En el rectángulo azul se enmarcan los fragmentos esperados de 464 pb de acuerdo con el marcador de tamaño molecular utilizado de 100 a 3000 pb de AXYGEN (ID: PID0173430). Sólo *Klebsiella variicola* (positivo) presenta el fragmento esperado.

Con los *primers* específicos se realizó una PCR únicamente para las cepas que, de acuerdo con la identificación taxonómica, están clasificadas dentro de cada uno de los grupos detectados por estos *primers*. Las cepas que se probaron con los *primers* “Azo” fueron *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Pseudomonas* (P16), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Pseudomonas granadensis* (P32), *Stenotrophomonas* (P36), *Pseudomonas* (P41), *Pseudomonas koreensis* (P1.2), *Pseudomonas koreensis* (P18.2), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2) y como positivo *Klebsiella variicola*, no fue posible amplificar el gen en ninguna de las cepas probadas.

Las cepas que se probaron con los *primers* “Clos” fueron *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.1), *Paenibacillus lautus* (P3), *Bacillus* (P4), *Paenibacillus* (P5), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P7),

Brevibacterium (P8), *Bacillus velezensis* (P9), *Staphylococcus* (P11), *Bacillus siamensis* (P13), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P14), *Bacillus aryabhatai* (P15), *Pseudomonas* (P18.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Bacillus* (P25), *Bacillus* (P26.1), *Bacillus* (P28), *Bacillus tequilensis* (P29), *Bacillus velezensis* (P34), *Bacillus* (P35), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P37), *Bacillus velezensis* (P38), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P39) y *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.2), no fue posible amplificar el gen en ninguna de las cepas probadas.

Las cepas que se probaron con los *primers* “Enter” fueron *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Pseudomonas* (P16), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Pseudomonas granadensis* (P32), *Stenotrophomonas* (P36), *Pseudomonas* (P41), *Pseudomonas koreensis* (P1.2), *Pseudomonas koreensis* (P18.2), *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2) y, como control positivo, *Klebsiella variicola*; en este caso sólo fue posible amplificar el gen en la cepa utilizada como positivo (Figura 20).

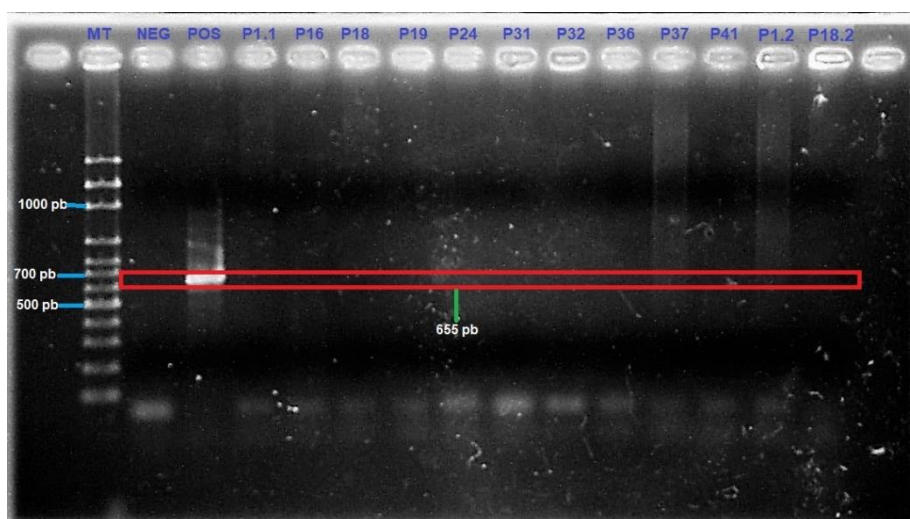


Figura 20: Gel de electroforesis para la visualización del gen *nifH* amplificado por PCR con *primers* Enter. En el rectángulo rojo se enmarcan los fragmentos esperados de 655 pb de acuerdo con el marcador de tamaño molecular utilizado de 100 a 3000 pb de AXYGEN (ID: PID0173430). Solo *Klebsiella variicola* (positivo) presenta el fragmento esperado.

No fue posible amplificar el gen *NifH* de las cepas en estudio debido posiblemente a que no sean poseedoras del gen *nifH*. Otra posibilidad es que no se pudiera amplificar el gen debido al gran número de degeneraciones que presentan los *primers* universales, que les brinda poca especificidad por el fragmento deseado; o a la elevada especificidad de los *primers* específicos por el género bacteriano para el que fueron diseñados.

9.5.2. Solubilización de fosfato.

En la evaluación cualitativa de la capacidad para solubilizar fosfato inorgánico de las bacterias aisladas de la rizósfera de *E. platyacanthus*, se pudo observar que 24 de las 36 cepas en estudio fueron capaces de solubilizarlo presentando la formación del halo característico (Figura 21-A), lo que permitió calcular el índice de solubilización correspondiente.

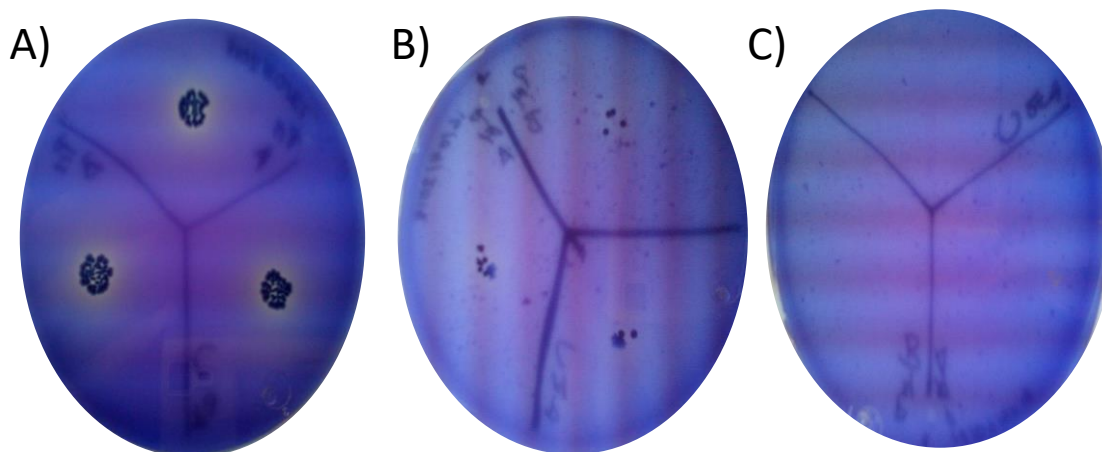


Figura 21: Solubilización de fosfato en medio NBRIP+BPB. A) Producción de halo de solubilización por *Bacillus siamensis* (P13). B) *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P14) crecimiento sin producción de halo de solubilización. C) *Stenotrophomonas maltophilia* (P31) no fue capaz de crecer en el medio selectivo.

Doce de las cepas fueron clasificadas como solubilizadoras tempranas al presentar la formación del halo a las 72 h, mientras que las otras doce fueron clasificadas como solubilizadoras tardías, puesto que presentaron la formación del halo hasta las 120 h después de la siembra en el medio selectivo. Sin embargo, todas las cepas fueron clasificadas como poco solubilizadoras al presentar un índice de solubilización menor a 2 (Angulo *et al.*, 2014), como se muestra en la Figura 22.

Las cepas: *Azospirillum brasilense* (Ab), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Bacillus velezensis* (P9), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P14), *Pseudomonas granadensis* (P32), *Bacillus velezensis* (P34), *Stenotrophomonas* (P36), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P39), *Pseudomonas* (P41) y *Pseudomonas* (P18.2) no formaron el halo de solubilización como indicador de la capacidad de realizar esta actividad, sin embargo, sí fueron capaces de crecer en el medio selectivo (Figura 21-B). Esto podría significar que, aunque no son capaces de solubilizar fosfato en grandes cantidades, sí lo pueden utilizar como sustrato para su sobrevivencia (Weselowski *et al.*, 2016).

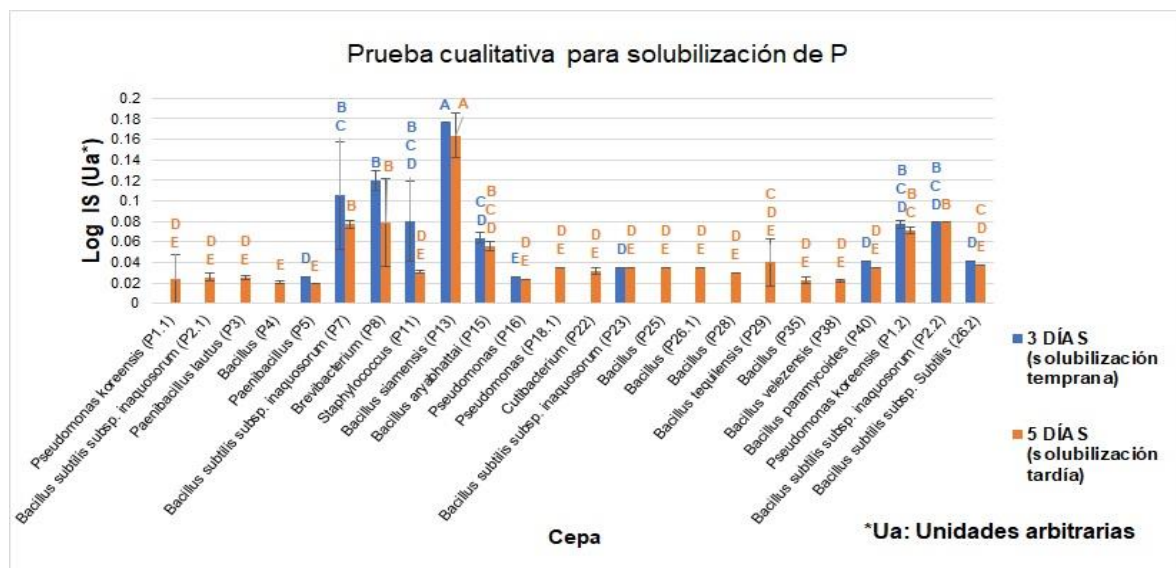


Figura 22: Capacidad de solubilización de fosfato de las 24 bacterias en estudio que dieron positivo para la prueba cualitativa, medida como el logaritmo del índice de solubilización. Doce de las cepas se clasificaron como solubilizadoras tempranas (3 días); las otras doce cepas fueron solubilizadoras tardías (5 días). Diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$).

Por último, se determinó que *Klebsiella variicola* (Kv), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31) y *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P37) podrían no ser solubilizadoras de fosfato ya que no crecieron en el medio, como se muestra en la Figura 21-C, sin embargo, en la prueba cuantitativa -cuyos resultados se muestran en la Figura 23- se puede observar que estas cepas sí son capaces de solubilizar fosfato en pequeñas cantidades; esta diferencia observada entre ambas técnicas podría deberse a la baja sensibilidad de la técnica cualitativa y a la baja disponibilidad de fosfato (que se encuentra insoluble) en el medio sólido utilizado, generando la obtención de falsos negativos y que, al ser sometidos a una prueba cuantitativa, que es más sensible, generan un resultado distinto.

En la Figura 23 también puede verse que todas las cepas en estudio, incluyendo *Azospirillum brasilense* y *Klebsiella variicola* -utilizadas en las pruebas de fijación de nitrógeno y producción de IAA como controles positivos-, fueron capaces de solubilizar fosfato en diferentes proporciones, siendo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2) la cepa con menor capacidad de solubilización (2.73 μg de fosfato soluble por mL de reacción) y *Bacillus paramycoides* (P40), la cepa con mayor capacidad (75.39 $\mu\text{g/mL}$). Otros niveles elevados de solubilización los presentaron las cepas *Pseudomonas koreensis* (P18.2), con 71.38 $\mu\text{g/mL}$; *Pseudomonas koreensis* (P1.2), con 68.86 $\mu\text{g/mL}$; *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.2), con 66.83 $\mu\text{g/mL}$, y *Pseudomonas* (P41), con 65.07 $\mu\text{g/mL}$.

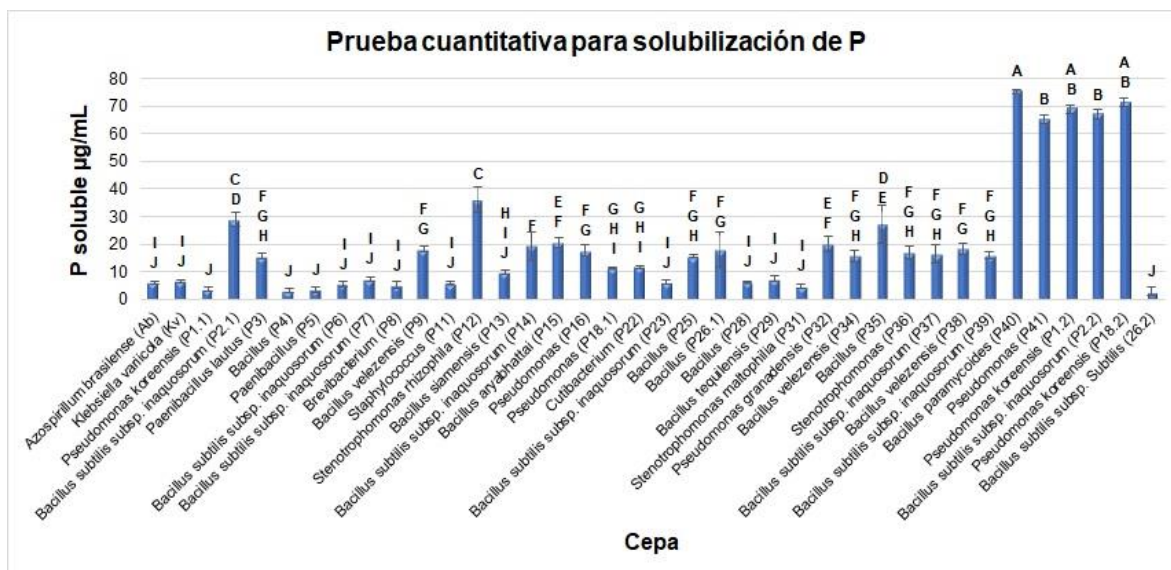


Figura 23: Cuantificación de fosfato soluble en medio líquido NBRIP producido por las cepas en estudio. La cepa con menor capacidad de solubilización es *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2) con 2.73 µg de fosfato soluble por mL de reacción; la cepa con mayor capacidad de solubilización es *Bacillus paramycoides* (P40), con 75.39 µg/mL. Diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$).

El análisis de varianza realizado indica que existen diferencias estadísticamente significativas, con una $p < 0.0001$, entre los resultados obtenidos en ambas pruebas.

9.5.3. Producción de ácido indolacético.

La cantidad de ácido indolacético producido por las cepas en estudio se muestra en la Figura 24, donde puede verse que su capacidad de producción fue variada. Dentro de las tres categorías de producción (baja, media o alta), la cepa con valores más bajos fue *Cutibacterium* (P22), con 13.42 µg/mL; las otras cepas dentro de este mismo nivel de clasificación fueron: *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.1, 33.55 µg/mL), *Paenibacillus lautus* (P3, 21.99 µg/mL), *Paenibacillus* (P5, 21.04 µg/mL), *Bacillus velezensis* (P9, 29.28 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P14, 30.33 µg/mL), *Bacillus* (P25, 21.22 µg/mL), *Bacillus* (P26.1, 13.67 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P39, 17.78 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.2, 19.23 µg/mL), *Pseudomonas koreensis* (P18.2, 24.52 µg/mL) y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2, 20.14 µg/mL).

En la categoría de producción media se encontraron las cepas *Bacillus* (P4, 48.83 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P7, 51.08 µg/mL), *Brevibacterium* (P8, 72.01 µg/mL), *Staphylococcus* (P11, 69.46 µg/mL), *Bacillus siamensis* (P13, 67.57 µg/mL), *Bacillus aryabhattai* (P15, 46.17 µg/mL), *Pseudomonas* (P16, 68.09 µg/mL), *Pseudomonas* (P18.1, 66.88 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23, 67.98 µg/mL), *Bacillus* (P28, 60.99 µg/mL), *Bacillus tequilensis* (P29, 35.57 µg/mL), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31, 58.44 µg/mL), *Bacillus velezensis* (P34, 64.27 µg/mL), *Bacillus* (P35, 57.92 µg/mL), *Stenotrophomonas* (P36, 37.05 µg/mL),

Bacillus subtilis subsp. *inaquosorum* (P37, 66.66 µg/mL), *Pseudomonas* (P41, 36.61 µg/mL) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2, 50.43 µg/mL).

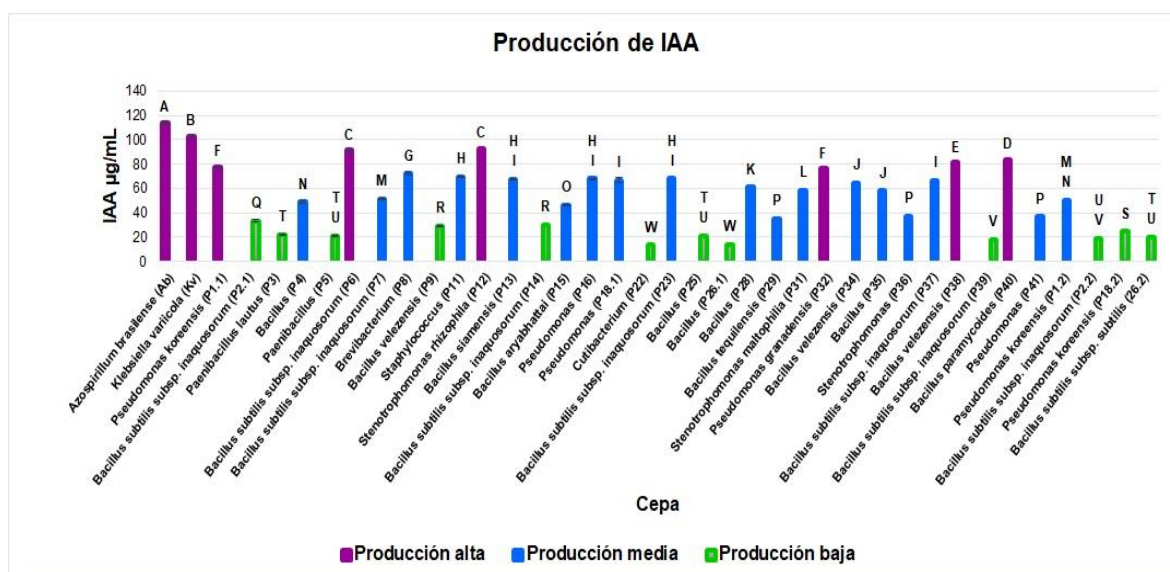


Figura 24: Producción de ácido indolacético en medio Burk sin fuente de nitrógeno. Se probaron un total de 38 cepas, incluidos los controles positivos: *Azospirillum brasilense*, *Klebsiella variicola*, representados a la izquierda. Se obtuvieron diferentes niveles de producción con los que se clasificó a las bacterias en tres grupos: producción baja (de 1 a 35 µg/mL), producción media (de 36 a 75 µg/mL) y producción alta (> 75 µg/mL). Las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Pseudomonas granadensis* (P32), *Bacillus velezensis* (P38) y *Bacillus paramycoides* (P40) estaban en el último grupo junto con las cepas utilizadas como control positivo. Diferentes letras sobre las barras significan diferencias estadísticamente significativas según las pruebas ANOVA y Tukey ($\alpha = 0.05$).

Por último, entre las cepas de producción alta se encuentran *Pseudomonas koreensis* (P1.1, 77.62 µg/mL), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6, 91.32 µg/mL), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12, 92.52 µg/mL), *Pseudomonas granadensis* (P32, 76.26 µg/mL), *Bacillus velezensis* (P38, 81.22 µg/mL) y *Bacillus paramycoides* (P40, 83.63 µg/mL), que, aunque resultan estadísticamente distintas a las cepas *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Klebsiella variicola* (Kv) -utilizadas como control positivo por los múltiples reportes que las señalan como productoras de IAA-, se encuentran en la misma categoría ya que poseen la capacidad de producir una gran cantidad del metabolito, siendo *Stenotrophomonas rhizophila* (P12) la cepa con la que se obtuvo mayor producción.

El análisis de varianza realizado indica, con una $p < 0.0001$, que existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos.

9.5.4. Biocontrol de fitopatógenos.

La evaluación de la capacidad de cada cepa para limitar el crecimiento de lo hongo fitopatógeno *Fusarium solani*, se realizó en función del porcentaje de inhibición que se calculó utilizando los patrones de crecimiento del hongo en presencia de la bacteria (Figura 25), como se detalla en la sección de materiales y métodos (8.6.4. Biocontrol de fitopatógenos).

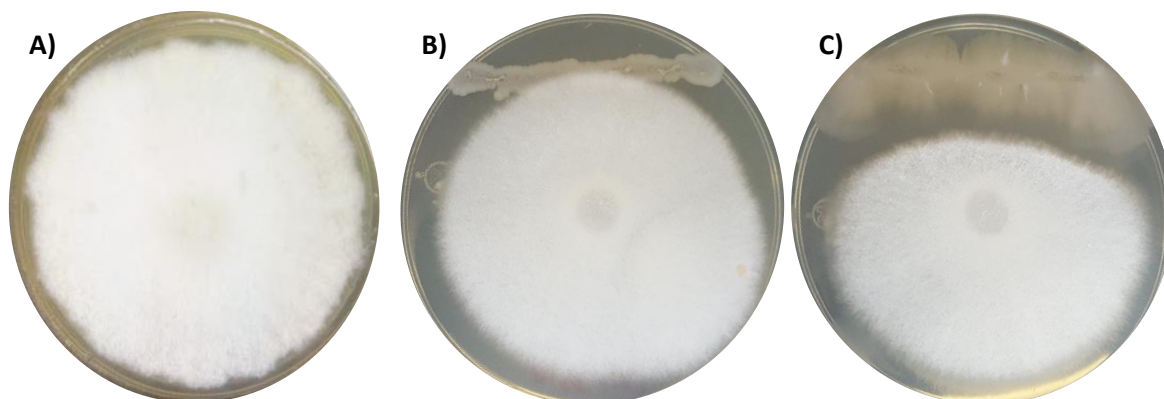


Figura 25: Biocontrol ejercido sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*. A) Crecimiento normal del hongo en medio PDA. B) Crecimiento del hongo en presencia de *Bacillus* (P15), quien no ejerce control sobre su crecimiento. C) Efecto antagónico de *Paenibacillus* (P3) sobre el hongo.

Se determinó que 22 de las 36 cepas en estudio y las dos cepas utilizadas en las pruebas de fijación de nitrógeno y producción de IAA, *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Klebsiella variicola* (Kv) ejercieron control biológico sobre *F. solani* (Tabla 7), siendo *Bacillus velezensis* (P9) la cepa con el mayor porcentaje de inhibición (78.33%). Las cepas *Pseudomonas koreensis* P1.1, *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* (P2.1), *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* (P7), *Staphylococcus* (P11), *Bacillus siamensis* (P13), *Bacillus subtilis* subsp. *Inaquosorum* (P14), *Bacillus aryabhattai* (P15), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P37), *Bacillus velezensis* (P38), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P39), *Bacillus paramycoides* (P40), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.2) y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2), no tuvieron un efecto antagónico sobre *F. solani*.

Tabla 7: Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium solani</i> por las bacterias en estudio que dieron positivo en esta prueba.		
Cepa	% Inhibición	Clasificación
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	58.33±2.89 (CDE)	+++
<i>Klebsiella variicola</i> (Kv)	69.17±2.89 (ABC)	+++
<i>Paenibacillus lautus</i> (P3)	48.67±9.42 (EFG)	+++
<i>Bacillus</i> (P4)	54.48±2.75 (DEF)	+++
<i>Paenibacillus</i> (P5)	54.21±1.39 (DEF)	+++
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P6)	41.67±3.82 (GH)	+++
<i>Brevibacterium</i> (P8)	40.83±2.89 (GH)	+++

<i>Bacillus velezensis</i> (P9)	78.33±2.89 (A)	+++
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (P12)	61.67±5.20 (CD)	+++
<i>Pseudomonas</i> (P18.1)	34.17±1.44 (H)	+++
<i>Cutibacterium</i> (P22)	47.50±0 (EFG)	+++
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P23)	45.83±7.22 (FG)	+++
<i>Bacillus</i> (P25)	39.17±2.89 (GH)	++
<i>Bacillus</i> (P26.1)	41.88±0.76 (GH)	+++
<i>Bacillus</i> (P28)	54.17±3.82 (DEF)	+++
<i>Bacillus tequilensis</i> (P29)	64.17±2.89 (BCD)	+++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (P31)	47.50±2.5 (EFG)	+++
<i>Pseudomonas granadensis</i> (P32)	34.17±1.44 (H)	++
<i>Bacillus velezensis</i> (P34)	41.67±3.82 (GH)	+++
<i>Bacillus</i> (P35)	49.17±1.44 (EFG)	+++
<i>Stenotrophomonas</i> (P36)	49.17±1.44 (EFG)	+++
<i>Pseudomonas</i> (P41)	49.17±1.44 (EFG)	+++
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1.2)	47.50±2.5 (EFG)	+++
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P18.2)	73.33±1.44 (AB)	+++
Clasificación: - no inhibidoras, + poco inhibidoras, ++ inhibidoras moderadas y +++ inhibidoras fuertes; las cepas que no aparecen en la lista no presentaron inhibición de ningún hongo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).		

En el caso de la evaluación del efecto antagónico de las cepas sobre *Ustilago maydis*, que se evaluó del mismo modo que sobre *F. solani*, los porcentajes de inhibición calculados en función de los patrones de crecimiento del hongo se ejemplifican en la Figura 26.

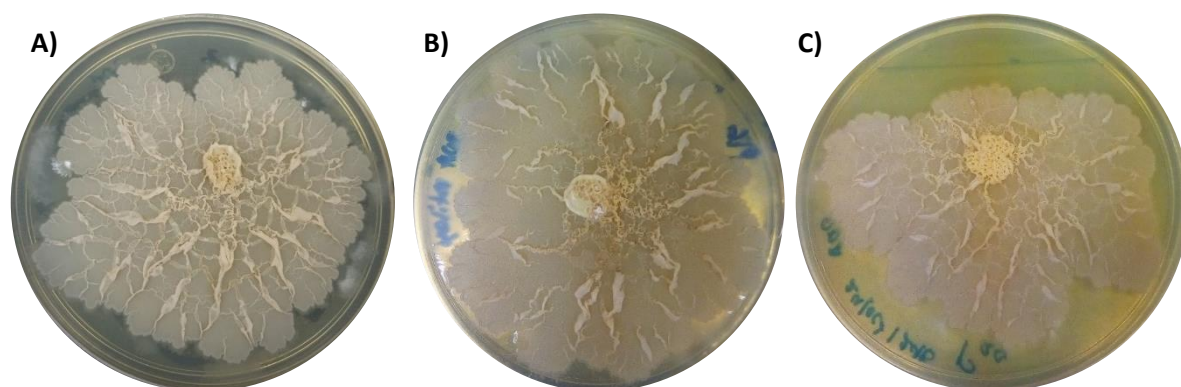


Figura 26: Biocontrol ejercido sobre el hongo fitopatógeno *Ustilago maydis*. A) Crecimiento normal del hongo en medio PDA. B) Crecimiento del hongo en presencia de *Pseudomonas* (P16), quien no ejerce control sobre su crecimiento. C) Efecto antagónico de *Bacillus* (P29) sobre el hongo.

Se determinó que 25 de las 36 cepas en estudio, *Azospirillum brasilense* (Ab) y *Klebsiella variicola* (Kv) -utilizadas como controles positivos-, ejercieron control biológico sobre *U. maydis* (Tabla 8), siendo *Staphylococcus* (P13) y *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (P26.2), las cepas con mayores porcentajes de inhibición de 67.5 ± 4.56 y $67.15 \pm 2.21\%$, respectivamente. Las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.1), *Bacillus* (P4), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P7), *Staphylococcus* (P11), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P14), *Bacillus aryabhattai* (P15), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus* (P35), *Stenotrophomonas* (P36), *Bacillus velezensis* (P38), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P39) y *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P2.2) no tuvieron un efecto antagónico sobre *U. maydis*.

Tabla 8: Inhibición del crecimiento de *Ustilago maydis* por las bacterias en estudio que dieron positivo en esta prueba.

Cepa	% Inhibición	Clasificación
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	47.78 ± 3.85 (CDEFG)	+++
<i>Klebsiella variicola</i> (Kv)	56.00 ± 2.95 (ABC)	+++
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P2.1)	36.74 ± 3.10 (EFGHI)	++
<i>Paenibacillus lautus</i> (P3)	11.36 ± 4.61 (L)	+
<i>Paenibacillus</i> (P5)	27.45 ± 5.29 (IJK)	+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P6)	43.52 ± 5.78 (CDEFGH)	+++
<i>Brevibacterium</i> (P8)	48.28 ± 4.35 (CDEF)	+++
<i>Bacillus velezensis</i> (P9)	52.18 ± 9.66 (BCD)	+++
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (P12)	34.17 ± 8.39 (CDEF)	++
<i>Bacillus siamensis</i> (P13)	67.50 ± 4.56 (A)	+++
<i>Pseudomonas</i> (P18.1)	56.57 ± 4.71 (ABC)	+++
<i>Cutibacterium</i> (P22)	18.08 ± 5.59 (KL)	+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P23)	34.03 ± 3.18 (FGHIJ)	++
<i>Bacillus</i> (P25)	31.60 ± 4.27 (GHIJK)	++
<i>Bacillus</i> (P26.1)	48.49 ± 4.46 (CDEF)	+++
<i>Bacillus</i> (P28)	32.52 ± 3.92 (GHIJK)	++
<i>Bacillus tequilensis</i> (P29)	41.61 ± 3.92 (CDEFGHI)	+++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (P31)	43.54 ± 3.07 (CDEFGH)	+++
<i>Pseudomonas granadensis</i> (P32)	44.87 ± 4.44 (CDEFGH)	+++
<i>Bacillus velezensis</i> (P34)	30.20 ± 3.04 (HIJK)	++
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P37)	37.99 ± 2.97 (DEFGHI)	++
<i>Bacillus velezensis</i> (P38)	38.01 ± 1.21 (DEFGHI)	++
<i>Bacillus paramycoides</i> (P40)	47.78 ± 3.85 (CDEFG)	+++

<i>Pseudomonas</i> (P41)	39.42±2.54 (DEFGHI)	++
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1.2)	50.67±10.07 (CDE)	++
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P18.2)	21.32±6.69 (JKL)	+
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (P26.2)	67.15±2.21 (AB)	+++
Clasificación: - no inhibidoras, + poco inhibidoras, ++ inhibidoras moderadas y +++ inhibidoras fuertes; las cepas que no aparecen en la lista no presentaron inhibición de ningún hongo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).		

Las cepas tuvieron diferente capacidad de inhibición sobre cada uno de los hongos probados y fueron clasificadas en función de dicha capacidad en no inhibidoras, poco inhibidoras, inhibidoras moderadas e inhibidoras fuertes, como se muestra en las tablas 7 y 8; puede observarse que la mayoría de las cepas que ejercen biocontrol sobre *F. solani* fueron clasificadas como inhibidoras fuertes, por el contrario, la capacidad de inhibición de las cepas en estudio sobre *U. maydis* fue variada.

9.6. Caracterización bioquímica.

Con los resultados obtenidos de las pruebas de fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de IAA y biocontrol de fitopatógenos, realizadas para determinar la capacidad PGPR *in vitro* de las bacterias en estudio, se pudo determinar que las cepas con mejores resultados fueron: *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Bacillus* (P35), *Bacillus velezensis* (P38), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2), ya que poseen la capacidad de realizar al menos dos actividades con buenos rendimientos, por lo que fueron seleccionadas para realizar las pruebas *in planta*.

En la Tabla 9 se muestra el perfil metabólico de las cepas seleccionadas; como puede verse, todas las cepas son capaces de utilizar al menos siete sustratos y realizar diferentes actividades enzimáticas como: la fermentación de lactosa (β -galactosidasa), hidrólisis de gelatina (proteasa) e hidrólisis de esculina (β -glucosidasa); además, todas las cepas son capaces de formar indol y llevar a cabo la reducción de nitratos, salvo las cepas *Bacillus* (P38) y *Pseudomonas* (P1.2).

Estas dos últimas pruebas son de particular interés ya que la capacidad de formar compuestos indólicos es una actividad estrechamente relacionada con la producción de IAA y, la reducción de nitratos, indica la capacidad de participar en el ciclo del nitrógeno.

Tabla 9: Perfil bioquímico de las cepas seleccionadas para realizar pruebas *in planta*.

Cepa	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MA	NAG	MAL	GNT	CAP
<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1.1)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. inaquosorum (P6)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (P12)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus siamensis</i> (P13)	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas</i> (P16)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. inaquosorum (P23)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (P31)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
<i>Bacillus</i> (P35)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus velezensis</i> (P38)	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus paramycoides</i> (P40)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1.2)	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+

Cabe mencionar que, aunque los perfiles metabólicos generalmente se utilizan como métodos de identificación bacteriana, en este caso fueron utilizados para la detección de actividades enzimáticas que están relacionadas con los mecanismos PGPR, dichas actividades son la producción de compuestos indólicos, la producción de enzimas líticas como la proteasa y la glucanasa, además de la asimilación de múltiples sustratos que sirven como fuentes de carbono que les permite a las bacterias sobrevivir en diferentes ambientes.

9.7. Determinación de actividad *in planta*.

Se realizó la siembra de un total de 416 semillas, distribuidas en 26 cajas Petri (16 en cada una), cuyo porcentaje de germinación a las 72 h post-siembra fue de 92.24%. Las plántulas permanecieron en la caja Petri durante tres semanas hasta alcanzar la protrusión de las hojas 6 y 7, momento adecuado para el trasplante en el sustrato preparado como se describió en la sección de Materiales y Métodos (8.8. Determinación de la actividad *in planta*). Los estadios de crecimiento de las plántulas (Boyes *et al.*, 2001) durante estas tres semanas se muestran en la Figura 27.

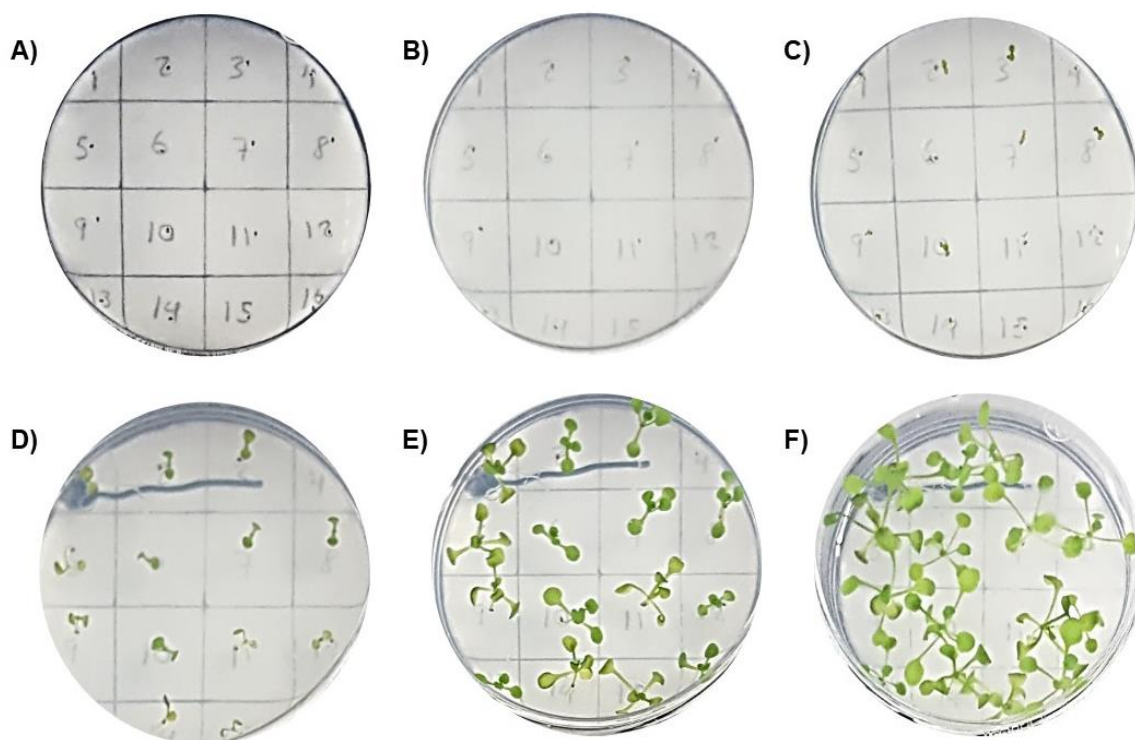


Figura 27: Desarrollo de *A. thaliana* en caja Petri (medio MS) durante las tres semanas pre-inoculación. **A)** 24 h después de la siembra, estadio 0-1 las semillas aumentan su tamaño, pero aún no hay protrusión de la radícula. **B)** 48 h después de la siembra, estadio 0-1 la mayoría de las semillas han germinado. **C)** 72 h después de la siembra, estadio 0.1, algunas plántulas presentan la protrusión de cotiledones u hojas falsas. **D)** Una semana después de la siembra en agar, la mayoría de las plántulas han desarrollado los cotiledones, estadio 1-0. **E)** Dos semanas después de la siembra, las plántulas presentan las hojas 5 y 6. **F)** Tres semanas después de la siembra, la mayoría de las plántulas presentan 7 hojas verdaderas (estadio 3) y están listas para la inoculación y el trasplante.

Previo al trasplante, se inocularon las plántulas dentro de las cajas Petri con la solución correspondiente a cada tratamiento; se tomaron una plántula y un trozo de agar de cada caja, antes y después de la inoculación, a manera de controles, como se muestran en la Figura 28. Fue posible determinar que la inoculación de las plántulas se realizó con éxito.

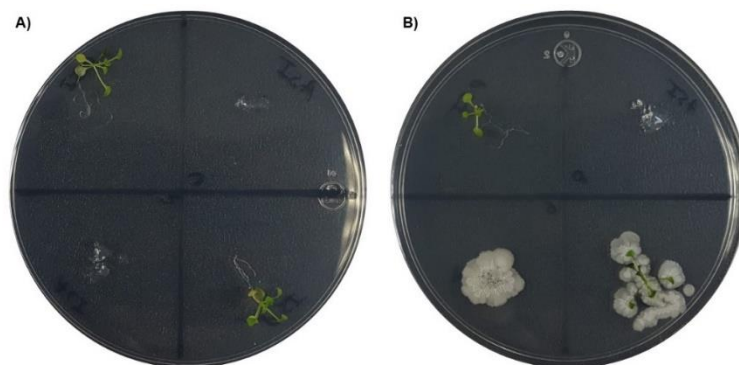


Figura 28: Controles de inoculación de *A. thaliana*. Plántulas y agar antes y después de la inoculación. A) Control negativo, inoculado con agua destilada estéril. B) Inoculación con *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6).

Una vez transcurridas las 2 h de incubación de las plántulas con la solución bacteriana, se procedió al trasplante de las mismas en macetas, en donde permanecieron por siete semanas más, hasta alcanzar el desarrollo mostrado en la Figura 29, donde se puede observar las diferencias en el crecimiento de *A. thaliana* en el control negativo y uno de los tratamientos utilizados.

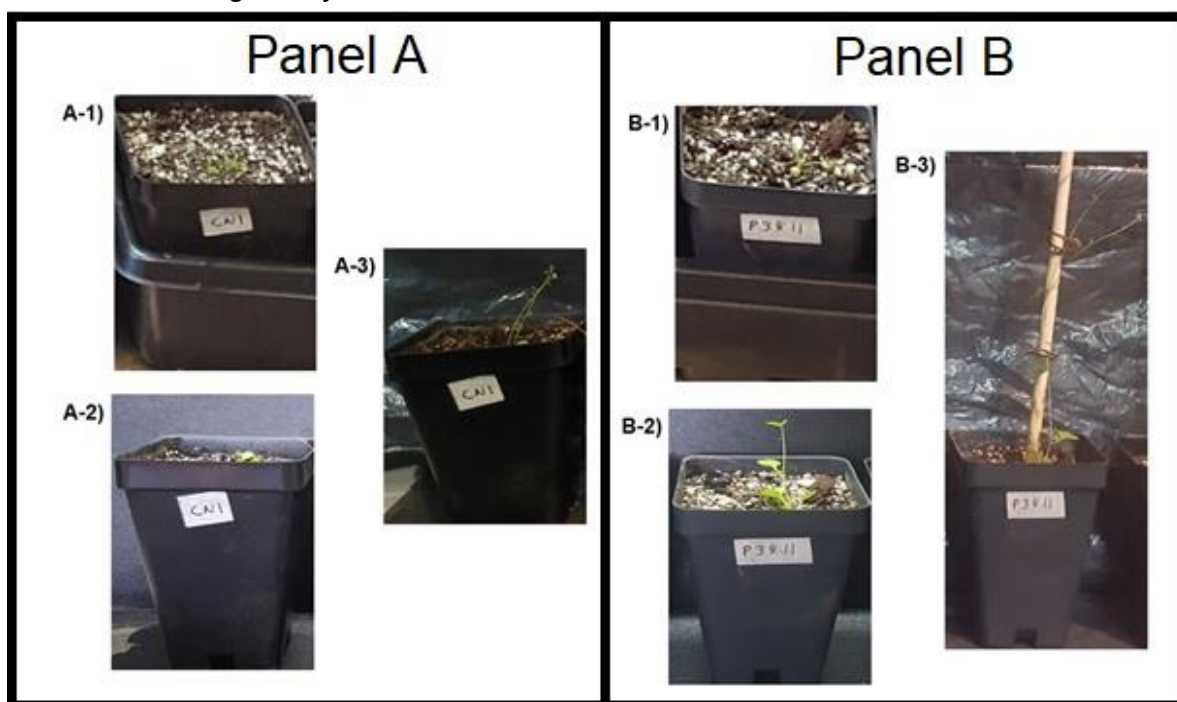


Figura 29: Desarrollo de *A. thaliana* en maceta. Panel A: Plántula inoculada con agua destilada estéril (Control negativo); **A-1)** semana 1; **A-2)** semana 4; **A-3)** semana 7. Panel B: Plántula inoculada con *Bacillus* (P38); **B-1)** semana 1; **B-2)** semana 4; **B-3)** semana 7.

Se registraron los parámetros de crecimiento cada semana, hasta la sexta semana después del trasplante. Los resultados obtenidos en la última semana de medición del porcentaje de supervivencia, número de tallos, número de inflorescencias, presencia de hojas caulinares, diámetro de la roseta y altura de cuerpo aéreo, y los tiempos de aparición de los tallos y de las inflorescencias. se muestran en la Tabla 10, donde se pueden ver los valores máximos de cada parámetro enmarcados en color verde y los valores mínimos enmarcados en color rojo, además se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos evaluados por un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

En la Tabla 10 se puede ver que, en los parámetros de supervivencia y formación de la roseta, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos; en los tiempos de aparición de los tallos no hubo diferencia de los tratamientos respecto al control negativo, pero sí entre ellos; en el **número total de tallos**, los tratamientos que resultaron ser diferentes del control negativo fueron *Pseudomonas* (P16), *Bacillus* (P35), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2); en el **diámetro de la roseta**, sólo *Bacillus paramycoides* (P40) presentó diferencias respecto al control negativo; en el **número de inflorescencias**, los tratamientos distintos al control negativo fueron: *Pseudomonas* (P16), *Bacillus* (P35) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2); en cuanto a la **altura del cuerpo aéreo**, los tratamientos que presentaron diferencias respecto al control negativo fueron: *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23) y *Bacillus paramycoides* (P40).

Los tratamientos con los que se obtuvieron los mejores resultados son *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), que generó un mayor aumento en la altura de la planta; *Bacillus* (P35) obtuvo los mejores resultados en el tiempo de aparición de los tallos principal y secundarios, el número total de tallos y el número de inflorescencias; *Bacillus paramycoides* (P40) generó un diámetro de roseta mayor; y *Pseudomonas koreensis* (P1.2) disminuyó el tiempo de aparición de inflorescencias.

Tabla 10: Parámetros de crecimiento evaluados en *Arabidopsis thaliana* sometida a los diferentes tratamientos, Control negativo, Control positivo y bacteri. capacidades PGPR.

Tratamiento	Supervivencia (%)	Tiempo de aparición del tallo principal (semanas)	Tiempo de aparición de los tallos secundarios (semanas)	Número total de tallos	Formación de roseta (%)	Diámetro de la roseta (cm)	Tiempo de aparición de inflorescencia (semanas)
Control negativo (Agua estéril)	91.67	3.27 (AB)	5.43 (ABC)	2.72 (D)	90.91	2.23 (B)	3.27 (AB)
Control Positivo (<i>Azospirillum brasilense</i>)	100	3 (AB)	5.25 (ABC)	5 (ABCD)	100	2.54 (B)	3 (AB)
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1)	100	4 (A)	6.09 (A)	3 (D)	92.31	2.79 (B)	4 (A)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P6)	100	2.83 (AB)	5.27 (ABC)	4.42 (ABCD)	83.33	2.84 (AB)	3 (AB)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (P12)	91.67	3 (AB)	4.9 (ABC)	4.18 (BCD)	81.82	2.66 (B)	3 (AB)
<i>Bacillus siamensis</i> (P13)	100	3.58 (AB)	5.73 (AB)	3.25 (CD)	100	3.07 (AB)	3.67 (AB)
<i>Pseudomonas</i> (P16)	100	2.62 (B)	5.08 (ABC)	5.69 (ABC)	92.31	2.98 (AB)	2.62 (B)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (P23)	100	2.71 (B)	4.71 (BC)	4.86 (ABCD)	100	3.02 (AB)	2.71 (B)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (P31)	100	3.08 (AB)	4.64 (BC)	5.17 (ABCD)	100	2.6 (B)	3.17 (AB)
<i>Bacillus</i> (P35)	100	2.42 (B)	4.25 (C)	7.17 (A)	100	3.18 (AB)	2.58 (B)
<i>Bacillus velezensis</i> (P38)	100	2.69 (B)	4.85 (ABC)	5.38 (ABCD)	100	2.72 (B)	3 (AB)
<i>Bacillus paramycoides</i> (P40)	100	2.85 (AB)	4.85 (ABC)	5.77 (ABC)	100	3.82 (A)	3.08 (AB)
<i>Pseudomonas koreensis</i> (P1.2)	100	2.57 (B)	4.83 (C)	6.86 (AB)	100	2.73 (B)	2.57 (B)
ANOVA		p=0.0047	p=0.0001	p<0.0001		p<0.0001	p=0.0038
X ²	p=0.7979				p=0.2089		

Se muestra el valor de p para cada prueba indicado por un ANOVA para variables cuantitativas y por X² para variables cualitativas. Letras distintas indican grupos estadísticamente significativos obtenidas por una prueba de Tukey. Los valores máximos de cada parámetro están enmarcados en color verde y los valores mínimos enmarcados en color rojo.

10. DISCUSIÓN.

En los resultados obtenidos de la identificación bacteriana se encontró que, de las bacterias representantes de los 41 ribotipos obtenidos por REA en el trabajo previo de Salinas-Virgen (2015), únicamente fue posible identificar 36 cepas que fueron principalmente asignadas a los géneros *Bacillus* (21 cepas) y *Pseudomonas* (7 cepas) pertenecientes a los filos Firmicutes y Proteobacteria, respectivamente. También fueron encontrados otros géneros bacterianos en menor proporción, estos son: *Paenibacillus* (2 cepas), *Brevibacterium* (1 cepa), *Staphylococcus* (1 cepa), *Cutibacterium* (1 cepa) y *Stenotrophomonas* (3 cepas).

Adicionalmente, se han corroborado los resultados obtenidos gracias a un análisis metagenómico realizado en nuestro grupo de trabajo (2017; datos sin publicar), donde se determinó que los géneros *Bacillus* (Abundancia relativa=0.79%), *Pseudomonas* (Abundancia relativa=0.04%), *Paenibacillus* (Abundancia relativa=0.002%) y *Stenotrophomonas* (Abundancia relativa=0.02%) están presentes en la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus*.

Los resultados obtenidos de la identificación bacteriana concuerdan con hallazgos previamente reportados en donde se encontró que *Bacillus* y *Pseudomonas* son los géneros predominantes en la rizósfera de 4 especies de cactáceas (*Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *Mammillaria fraileana* y *Opuntia cholla*), además de ser endófitos de plántulas del cardón gigante, junto con algunas especies de *Staphylococcus* (Bashan y de-Bashan, 2010). También se han aislado algunos *Bacillus* a partir de la rizósfera de *Mammillaria* spp y *Coryphanta radians*, nativas del semidesierto de Querétaro (Chávez-Ambríz, 2016).

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se han encontrado estos géneros bacterianos asociados a la rizósfera de *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, tres cactáceas nativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Aguirre *et al.*, 2012), así como a *Neobuxbaumia polylopha*, cactácea nativa del semidesierto de Querétaro, donde un análisis de la fracción cultivable de la comunidad microbiana asociada a la planta indicó la presencia de estos géneros en las muestras (Montiel-Lugo, 2017, datos sin publicar).

Aunque es posible encontrar semejanzas en la composición de las comunidades microbianas asociadas a diferentes cactáceas, como las que se muestran anteriormente, existen diferencias dadas por múltiples factores como son la especie vegetal misma, la región, la altitud, el tipo de suelo, etc. Tal es el caso de la microbiota asociada a la rizósfera de *Opuntia ficus* en Tumbes, Perú, donde los géneros encontrados (distintos a los de este estudio) son *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Pantoea*, *Salmonella* y *Vibrio* además de *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (Olaya y Fidel, 2016), encontrados en *Echinocactus platyacanthus*.

Lima y colaboradores (2015), encontraron a los géneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Burkholderia* y *Pantoea* como endófitos de dos cactus nativos de Brasil: *Cereus jamacaru* y *Melocactus zehntneri*; la única coincidencia con los resultados obtenidos en este estudio fue en el hallazgo del género *Pseudomonas* dentro de ese mismo grupo de bacterias endófitas.

Los géneros bacterianos encontrados en este trabajo tienen múltiples reportes en la literatura puesto que poseen características PGPR; con este precedente, en el caso de la FBN, era de esperarse que las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Klebsiella*, fueran poseedoras del gen *nifH*, pues su actividad nitrogenasa ha sido demostrada en otros sistemas (Rodríguez, 2008; Li *et al.*, 2017 Ortuño *et al.*, 2018).

Algunos miembros del género *Paenibacillus* han sido caracterizados como nodulantes en altramuza azul (*Lupinus angustifolius*), capaces de crecer en medios sin fuente de nitrógeno y portadores del gen *nifH*; cepas de los géneros *Bacillus* y *Stenotrophomonas* han sido caracterizadas como fijadoras de nitrógeno y algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas* fueron reportadas como poseedoras del gen *nifH*, con capacidad de reducir acetileno (Rodríguez, 2008; Li *et al.*, 2017 Ortuño *et al.*, 2018).

Sin embargo, no fue posible amplificar el gen *nifH* a partir de ninguna de las cepas en estudio; a pesar de ello, fue posible determinar, mediante caracterización bioquímica, que las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Bacillus* (P35), y *Bacillus paramycoides* (P40) tienen una participación en otra etapa del ciclo del nitrógeno, ya que son capaces de reducir nitratos a nitritos o a N₂ (Sección 9.6. Caracterización bioquímica, Tabla 9) para completar el ciclo, por lo que pueden ser clasificadas como bacterias desnitrificantes; esta cualidad les permite devolver nitrógeno reactivo excedente en el suelo, a la atmósfera (Lycus *et al.*, 2018), que puede reingresar a la biosfera por acción de bacterias fijadoras de nitrógeno.

En cuanto a la evaluación de la capacidad de las bacterias para solubilizar fosfato se encontró que, en la prueba semicuantitativa, sólo 24 (67%) de las cepas pudieron realizar esta actividad (Sección 9.5.2. Solubilización de fosfato, Figura 22), 12 (50%) de ellas fueron clasificadas como solubilizadoras tempranas y las otras 12 (50%) como solubilizadoras tardías; aunque la capacidad de solubilización de todas las cepas fue baja, al tener un índice de solubilización menor a 2 (Angulo *et al.*, 2014), los resultados obtenidos para las cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus* concuerdan con resultados previamente reportados, bajo las mismas condiciones experimentales, donde se indica que el índice de solubilización para estos géneros es menor a 2 (Liu, *et al.*, 2015; Marra *et al.*, 2015; Buono y Ulla, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Kunwar, *et al.*, 2018).

Adicionalmente, en la prueba cuantitativa se encontró que todas las cepas evaluadas fueron capaces de solubilizar fosfato en un rango de 2.73 a 75.23 $\mu\text{g/mL}$. Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* fueron capaces de solubilizar entre 3.15 y 63.83 $\mu\text{g/mL}$, las cepas del género *Pseudomonas* solubilizaron entre 3.62 y 71.38 $\mu\text{g/mL}$, el género *Paenibacillus* fue capaz de solubilizar entre 3.48 y 15.69 $\mu\text{g/mL}$, *Stenotrophomonas* pudo solubilizar entre 4.95 y 17.02 $\mu\text{g/mL}$, mientras que *Staphylococcus* sólo fue capaz de solubilizar hasta 11.75 μg de fosfato por mililitro de mezcla de reacción. Estudios previos muestran que la capacidad de solubilización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal abarca rangos muy variados que van desde 30 hasta más de 600 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de *Bacillus*, los valores reportados van de 30 a 111 $\mu\text{g/mL}$ (Behera *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017); para *Pseudomonas* van de 33 a 113 $\mu\text{g/mL}$ (Behera *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016), mientras que, para *Stenotrophomonas*, se han reportado valores de entre 10 hasta más de 600 $\mu\text{g/mL}$ de fosfato soluble (Liu *et al.*, 2017; Singh y Jha, 2017), estos valores tan variados son resultado de un mismo factor: la especie o cepa bacteriana que se esté evaluando, ya que las características metabólicas de las bacterias suelen ser distintas entre especies.

Los resultados obtenidos en las pruebas semicuantitativa y cuantitativa son claramente distintos, principalmente en aquellas cepas que dieron un resultado negativo en la prueba semicuantitativa y, en la prueba cuantitativa, el resultado fue positivo, aunque la solubilización fue baja. Lo anterior no impacta en la fiabilidad de nuestros resultados ya que se sabe que no existe una correlación directa entre la solubilización de fosfato en medio sólido y en medio líquido (Gusain, 2015), ya que la sensibilidad de las dos técnicas es distinta (es más baja en medio sólido que en medio líquido), sin embargo ambas son utilizadas debido a que la prueba cualitativa permite determinar si el mecanismo de solubilización utilizado es la producción de ácidos orgánicos y la prueba cuantitativa determina la cantidad de fosfato solubilizado por las bacterias.

En cuanto a la producción de IAA, se observó que todas las cepas evaluadas fueron capaces de producir ácido indolacético en un rango que fue de 13 a 93 $\mu\text{g/mL}$. Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* produjeron entre 13.77 y 81.25 $\mu\text{g/mL}$, las cepas del género *Pseudomonas* entre 24.52 y 76.26 $\mu\text{g/mL}$, las dos cepas representantes del género *Paenibacillus* fueron capaces de producir 21.03 $\mu\text{g/mL}$ y 21.99 $\mu\text{g/mL}$, *Stenotrophomonas* produjo entre 37.05 y 58.44 $\mu\text{g/mL}$ y *Staphylococcus* produjo 69.46 $\mu\text{g/mL}$ de IAA. La capacidad de producción de estos géneros ha sido ampliamente descrita: el género *Bacillus* ha sido reportado como productor de IAA en cantidades que van desde 11.5 hasta 44.2 $\mu\text{g/mL}$ (Reetha *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015); el género *Pseudomonas* también ha sido reportado como productor de IAA en diferentes proporciones: 15.38 (Reetha *et al.*, 2014), 21.5, 34.3, 74.9 y hasta 81.8 $\mu\text{g/mL}$ (Kamble y Galerao, 2015); para el género *Paenibacillus* se ha reportado una producción de 18.3 a 29.3 $\mu\text{g/mL}$ (Zhao *et al.*,

2015) y, para *Stenotrophomonas*, ha sido reportada con una producción de hasta 80.93 µg/mL (Nevita *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos de las cepas que se encuentran dentro de la clasificación de producción alta de IAA (>75 µg/mL) se aproximan a los resultados obtenidos para la cepa utilizada como positivo, *Azospirillum brasilense*, que fueron de 114 µg/mL, esta cepa ha sido reportada con valores altos de producción; de-Bashan y colaboradores (2008) reportan que una cepa tipo de *A. brasilense* produce 91.33 µg/mL y algunas cepas silvestres han llegado a producir hasta 160 µg/mL de IAA.

Se ha observado que existen similitudes entre algunos de los resultados de producción de IAA obtenidos en este estudio y resultados previamente reportados, sin embargo, de la misma manera que para la solubilización de fosfatos, también fue posible observar algunas diferencias atribuidas a la especie bacteriana que se esté evaluando, además las condiciones de cultivo y la disponibilidad de sustrato son otros dos factores que generan variación (Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

En la capacidad de las bacterias para ejercer control biológico sobre los dos hongos fitopatógenos utilizados para esta prueba, se observó que 22 (61%) de las cepas ejercieron control sobre el crecimiento del hongo *Fusarium solani*; de estas, 20 (91%) fueron clasificadas como inhibidoras fuertes al tener un porcentaje de inhibición mayor al 40% y 2, (el 9% restante), fueron clasificadas como inhibidoras moderadas, al inhibir entre el 30 y 40% del crecimiento del hongo.

Las cepas correspondientes al género *Bacillus* tuvieron la capacidad de inhibir a *F. solani* en un rango de 34 a 79%, las cepas de *Pseudomonas* realizaron esta actividad en un intervalo de 34 hasta 73%, mientras que los representantes de *Paenibacillus* y *Stenotrophomonas* inhibieron el crecimiento del hongo en rangos de 45 a 48% y 47 a 62%, respectivamente. Algunos estudios han reportado la capacidad de inhibición de cepas pertenecientes a estos géneros bacterianos sobre diferentes especies de *Fusarium* con valores muy similares a los obtenidos: *Bacillus* ha presentado porcentajes de inhibición de 31 a 99% sobre *Fusarium oxysporum* (Abed *et al.*, 2016), *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López *et al.*, 2016), *Fusarium tucumaniae* (Pin *et al.*, 2016) y *Fusarium* sp. (Hernández-Hernández *et al.*, 2018); *Pseudomonas* ha sido descrita con una capacidad de inhibición de 30 a 93% sobre *Fusarium oxysporum* (Abed *et al.*, 2016), *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López *et al.*, 2016) y *Fusarium* sp. (Hernández-Hernández *et al.*, 2018); *Stenotrophomonas* ha presentado valores de 30 a 92% sobre *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López *et al.*, 2016) y *Fusarium tucumaniae* (Pin *et al.*, 2016); y la capacidad de inhibición de *Paenibacillus* ha sido de 62 a 85% sobre *Fusarium verticillioides* (Figueroa-López *et al.*, 2016).

Por otra parte, 25 cepas (69.4%) fueron capaces de ejercer biocontrol sobre el hongo *Ustilago maydis*, 13 (52%) de ellas fueron clasificadas como inhibidoras fuertes, 10 (40%) como inhibidoras moderadas y 2 (el 8% restante) fueron

clasificadas como poco inhibidoras al tener un porcentaje de inhibición menor a 30%.

Bacillus tuvo la capacidad de inhibir el crecimiento de *U. maydis* dentro de un rango de 30 a 57%, *Pseudomonas* en un rango de 21 a 51%, *Paenibacillus* lo hizo entre 11 y 28% y *Stenotrophomonas* inhibió el crecimiento entre 34 y 67%. Los reportes de bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Ustilago* son escasos, aun así, revelan que algunas cepas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* son capaces de disminuir la infección de *Ustilago hordei* en cultivos de trigo (Etebarian *et al.*, 2007) y algunas cepas del género *Pseudomonas* son antagonistas de *Ustilago scitaminea*, fitopatógeno de caña de azúcar (Li *et al.*, 2017).

En el caso particular de *Ustilago maydis*, hongo fitopatógeno selectivo de teozintle y maíz, los reportes de biocontrol son aún más escasos ya que la enfermedad producida generalmente no es una plaga, sino que da como resultado el huitlacoche, un producto comestible de gran importancia económica que generalmente representa un aumento en el valor comercial de la planta infectada, por lo que no se busca erradicar la enfermedad (Herrera, 2014). Sin embargo, ya que la pared celular de *Ustilago maydis* posee características similares a la de cualquier otro hongo (Hernández, 2014), existe la posibilidad de que los mecanismos de biocontrol que ejercen las bacterias para limitar su crecimiento sean similares a los empleados sobre otros hongos.

Se sabe que las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Bacillus* (P35), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2) son productoras de proteasa, lo que puede ser considerado como un mecanismo de las bacterias para ejercer biocontrol junto con la producción de otras enzimas líticas como las quitinasas, celulasas y glucanasas (Abed *et al.*, 2016; Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

De la caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas por sus capacidades PGPR para realizar pruebas *in planta*, se obtuvo que, además de la producción de proteasa, todas las cepas a excepción de *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), son productoras de catalasa que tiene una función antioxidante y contribuye a reducir el estrés oxidativo de las plantas producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bourahla *et al.*, 2018).

Además, las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Bacillus* (P35) y *Bacillus paramycoides* (P40), son productoras de β -galactosidasa; todas las cepas salvo *Pseudomonas koreensis* (P1.2) son productoras de β -glucosidasa; y las cepas *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13),

Bacillus velezensis (P38), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2), son productoras de oxidasa.

Todas las cepas son capaces de utilizar al menos siete sustratos para su crecimiento, *Pseudomonas koreensis* (P1.1) asimila Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6) utiliza Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; *Stenotrophomonas rhizophila* (P12) emplea Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Ácido Málico y Citrato Trisódico.

Bacillus siamensis (P13) degrada Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; *Pseudomonas* (P16) asimila Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23) Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; *Stenotrophomonas maltophilia* (P31) utiliza Glucosa, Manosa, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Ácido Málico, Citrato Trisódico; *Bacillus* (P35) emplea Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico y Citrato Trisódico.

Bacillus velezensis (P38) degrada Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico, Citrato Trisódico y Ácido Fenilacético; *Bacillus paramycoides* (P40) asimila Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Adípico, Ácido Málico y Citrato Trisódico; y *Pseudomonas koreensis* (P1.2) utiliza Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Gluconato Potásico, Acido Caprico, Ácido Málico y Citrato Trisódico.

La capacidad de asimilación de diferentes sustratos antes mencionada, facilita que las bacterias puedan contribuir a un mejor desarrollo de las plantas, ya que múltiples autores concuerdan en que la promoción del crecimiento comienza con la capacidad de las bacterias para colonizar la rizosfera de las plantas, actividad que se ve influida por la clase de exudados que producen las mismas, principalmente azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, que sirven a las bacterias como quimio atrayentes y alimento (Odoh, 2017; Jeyanthi y Kanimozhi, 2018; Bhat, 2019).

Algunos de los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica concuerdan con lo reportado previamente, el género *Bacillus* ha sido reportado con actividad catalasa, oxidasa, proteasa ureasa y reducción de nitratos variable, no tiene la capacidad de fermentar glucosa, algunas cepas asimilan glucosa, manosa y citrato; el género *Pseudomonas* ha sido reportado como catalasa y oxidasa positivo, con actividad de proteasa, arginina dihidrolasa y reducción de nitratos variable, ureasa negativo y con capacidad para asimilar glucosa, manosa, ácido cáprico, ácido

málico y citrato, no asimila maltosa, ácido adípico ni fenilacético, y no puede fermentar glucosa (Álvarez-López *et al.*, 2014; Behera *et al.*, 2016; Singh y Lal, 2016); y el género *Stenotrophomonas* ha sido reportado como catalasa y oxidasa positivo, capaz de reducir nitratos y utilizar glucosa, manosa, arabinosa y citrato (Pourbabaee *et al.*, 2018).

A partir de las pruebas *in planta*, se pudo determinar que los tratamientos bacterianos utilizados mostraron diferencias estadísticamente significativas a nivel de los parámetros de crecimiento evaluados en *Arabidopsis thaliana*. Fue posible observar que en el tiempo de aparición del tallo principal, tiempo de aparición de los tallos secundarios, tiempo de aparición de inflorescencias y en el número total de inflorescencias la cepa *Pseudomonas koreensis* (P1.1) obtuvo los resultados más bajos, incluso que el control negativo, aunque no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

También fue posible observar que los resultados obtenidos de los tratamientos con las cepas *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13) y *Bacillus velezensis* (P38) no resultaron estadísticamente distintos a los obtenidos por el control negativo en ninguno de los parámetros evaluados; y el tratamiento con *Pseudomonas* (P16) solo resultó estadísticamente distinto al control negativo en el número de tallos y el número de inflorescencias.

Las planas tratadas con *Azospirillum brasilense*, utilizadas como control positivo, tampoco resultaron estadísticamente distintas a las del control negativo, tratadas con agua destilada estéril, debido posiblemente a que *A. brasilense* produce una gran cantidad de IAA (114 µg/mL) y no todas las cepas que producen grandes cantidades de IAA estimulan el crecimiento de las plantas, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens* produce hasta 78 µg/mL de IAA, lo cual induce el desarrollo de la enfermedad conocida como “agalla de la corona” que afecta una gran variedad de especies vegetales; además, el IAA a concentraciones superiores a 87 µg/mL, inhibe considerablemente el crecimiento de *Vicia faba* (haba) (Noh *et al.*, 2014; Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

El tratamiento con *Bacillus* (P35) fue el que obtuvo los mejores resultados en cuanto al tiempo de aparición del tallo principal, tiempo de aparición de tallos secundarios, número total de tallos y número de inflorescencias; el diámetro de la roseta de las plantas de este tratamiento fue mayor y el tiempo de aparición de las inflorescencias fue menor a las del control negativo, sin embargo, en estos dos últimos parámetros no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a los resultados obtenidos en el control negativo.

El tratamiento con la cepa *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23) tuvo diferencias respecto al control únicamente en la altura de la planta, resultando ser el tratamiento con mejores resultados en este parámetro. Las plantas tratadas con *Bacillus paramycoides* (P40) fueron estadísticamente distintas al control negativo

en el número total de tallos y en el diámetro de la roseta donde se obtuvieron los mejores resultados.

Existe un reporte en el que se indican diferencias significativas en el diámetro de la roseta y el tiempo de aparición de inflorescencias entre plantas de *A. thaliana* tratadas con una cepa de *Bacillus* y las usadas como control negativo, el tiempo de aparición de las inflorescencias fue durante la semana 4 después de la siembra, tiempo menor a lo obtenido en este estudio (Hu, 2005).

El tratamiento con *Pseudomonas koreensis* (P1.2) mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo en el número total de tallos, el tiempo de aparición de inflorescencias y en el número de inflorescencias, no así en el diámetro de la roseta ni en la altura del cuerpo aéreo, dos parámetros que han sido evaluados en *Arabidopsis* inoculadas con cepas del género *Pseudomonas* en dos estudios diferentes, en los que se reportó un aumento significativo de 3.4 % (Schwachtje *et al.*, 2011) y de 30.9 % (Schwachtje *et al.*, 2012) en el diámetro de la roseta, y de 200% (Schwachtje *et al.*, 2011) y de 186.6 % (Schwachtje *et al.*, 2012) en la altura de la planta, en comparación con el control negativo.

Es importante mencionar que las diferencias encontradas entre resultados de los parámetros de crecimiento previamente reportados y los obtenidos en este estudio podrían atribuirse a las condiciones de cultivo de las plantas, ya que en otros estudios se mantienen bajo condiciones estrictamente controladas, sustratos distintos a los utilizados en este estudio y, en algunos casos, las plantas fueron regadas con soluciones nutritivas que contribuyen a su mejor desarrollo, pero enmascaran el efecto de las bacterias como promotores del crecimiento vegetal.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan del todo con resultados previamente reportados para parámetros como el tiempo de aparición de inflorescencias, altura del cuerpo aéreo, número total de tallos y diámetro de la roseta, es posible observar mejorías en esos y en otros parámetros de crecimiento como el tiempo de aparición del tallo principal, tiempo de aparición de tallos secundarios, número total de tallos y número de inflorescencias, por lo que se puede determinar que las cepas *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Bacillus* (P35), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2) tienen un efecto positivo en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* bajo las condiciones experimentales en las que se trabajó.

De lo anterior es posible determinar que las cuatro cepas con las que se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento son prospectos para la realización de pruebas futuras que pudieran culminar en la elaboración de un biofertilizante que ayude al desarrollo de las plantas, particularmente de *Echinocactus platyacanthus*, con el que se esperaría un aumento del tamaño y del desarrollo de la planta, resultado del efecto sinérgico de las bacterias que compongan el biofertilizante.

Finalmente, el análisis filogenético basado en la secuenciación del gen 16S rRNA, nos permitió establecer que la agrupación por REA posiciona en el mismo patrón de restricción aislados con similitud <98.7%. Conforme los resultados de secuenciación de los patrones P1, P2, P18 y P26, en los que se seleccionaron 2 cepas de cada uno. Sin embargo, la evaluación de algunas actividades metabólicas de las 2 cepas seleccionadas de cada patrón demostró que existen diferencias.

Los análisis realizados con las 2 cepas del patrón P1, evaluaron algunas capacidades PGPR de las mismas, como: producción de ácido indol-acético, solubilización de fosfatos y biocontrol de hongos fitopatógenos. Ambas cepas mostraron valores distintos para estas actividades; en adición, en un análisis reciente de nuestro grupo de trabajo también se encontró que *P. koreensis* P1.2 tiene la capacidad de producir sideróforos que captan diferentes iones, mientras que *P. koreensis* P1.1 no es capaz de producir sideróforos (José Luis SS 2019)

Estas variaciones fisiológicas entre cepas nos indican que REA es una técnica que permite agrupar aislados con cierta cercanía filogenética, sin embargo, no tiene el suficiente poder para discriminar entre especies muy relacionadas, o entre cepas de la misma especie. La capacidad de resolución de esta técnica se podría incrementar si se analizan en paralelo restricciones de diferentes genes, aunque también incrementaría su costo como método de tipificación y agrupamiento.

11. CONCLUSIONES.

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA permitió identificar taxonómicamente 36 de las 45 cepas aisladas de la rizósfera de *Echinocactus platyacanthus*, con lo que fue posible observar que, cepas pertenecientes a los generos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus* y *Stenotrophomonas* forman parte de la comunidad bacteriana asociada a sus raíces.

Estos géneros bacterianos han sido ampliamente reportados como PGPR ya que poseen la capacidad de realizar diferentes actividades PGPR, como la solubilización de fosfatos, la producción de ácido indolacético y el control biológico de fitopatógenos, tal y como se determinó en este estudio. Las 36 cepas identificadas fueron evaluadas en las pruebas PGPR. En la prueba para determinar si las bacterias son capaces de fijar nitrógeno se obtuvo que, aunque no fue posible amplificar el gen *nifH*, algunas de las cepas podrían tener una participación importante dentro del ciclo biogeoquímico del nitrógeno ya que se determinó por pruebas bioquímicas que tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos o a N_2 .

Además, las 36 cepas (100%) fueron capaces de solubilizar fosfato y producir ácido indolacético en diferentes proporciones, con valores máximos de 75.23 $\mu\text{g/mL}$ y 93 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. 22 (61%) cepas fueron capaces de ejercer control biológico sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium solani* y 25 (69.4%) sobre el hongo *Ustilago maydis*.

11 de las bacterias en estudio fueron capaces de realizar más de una actividad PGPR con buenos rendimientos, por lo que fueron seleccionadas para realizar con ellas pruebas *in planta*: *Pseudomonas koreensis* (P1.1), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P6), *Stenotrophomonas rhizophila* (P12), *Bacillus siamensis* (P13), *Pseudomonas* (P16), *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Stenotrophomonas maltophilia* (P31), *Bacillus* (P35), *Bacillus velezensis* (P38), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2).

La caracterización bioquímica de estas cepas mostró las diferentes actividades enzimáticas que realizan, principalmente β -Glucosidasa, Proteasa, β -Galactosidasa, Catalasa y Oxidasa, intervienen en la degradación de biomoléculas complejas como polisacáridos, proteínas, glicolípidos, glioproteínas, especies reactivas de oxígeno y en la utilización de oxígeno en la cadena respiratoria; además, fueron capaces de asimilar diferentes sustratos como Glucosa, Arabinosa, Manosa, Manitol, N-Acetil-Glucosamina, Maltosa, Gluconato Potásico, Acido Caprico, Acido Adípico, Ácido Málico, Citrato Trisódico y Ácido Fenilacético, lo que les brinda a las bacterias la capacidad de crecer y sobrevivir en medios con diferentes fuentes de carbono, factor importante para que puedan realizar la promoción del crecimiento de las plantas.

La inoculación de semillas de *Arabidopsis thaliana* con las cepas bacterianas seleccionadas generó un incremento en el desarrollo de las plantas en los diferentes

parámetros evaluados. Fue posible observar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en el control negativo y los tratamientos en el diámetro de la roseta, el número de tallos, el número de inflorescencias y la altura del cuerpo aéreo, donde los tratamientos que obtuvieron mejores resultados fueron *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (P23), *Bacillus* (P35), *Bacillus paramycoides* (P40) y *Pseudomonas koreensis* (P1.2).

De lo anterior, es posible determinar que las cuatro cepas con las que se obtuvieron los mejores resultados de crecimiento son prospectos para la realización de pruebas futuras que pudieran culminar en la elaboración de un biofertilizante que ayude al desarrollo de las plantas, particularmente de *Echinocactus platyacanthus*, con el que se esperaría un aumento del tamaño y del desarrollo de la planta, resultado del efecto sinérgico de las bacterias que compongan el biofertilizante.

12. REFERENCIAS.

- ABBASI, M. K., SHARIF, S., KAZMI, M., SULTAN, T., & ASLAM, M. (2011). Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. *Plant Biosystems*, 145, 159-168.
- ABED, H., ROUAG, N., MOUATASSEM, D., & ROUABHI, A. (2016). Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Eurasian Journal of Soil Science*, 5(3), 166-182.
- AGUIRRE-GARRIDO, J. F., MONTIEL-LUGO, D., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C., TORRES-CORTES, G., MILLÁN, V., TORO, N., MARTÍNEZ-ABARCA, F., & RAMÍREZ-SAAD, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 891-904.
- AHEMAD, M., & KHAN, M. S. (2010). Ameliorative effects of *Mesorhizobium* sp. MRC4 on chickpea yield and yield components under different doses of herbicide stress. *Pesticide biochemistry and physiology*, 98, 183-190.
- AHMAD, M., ZAHIR, Z. A., NAZLI, F., AKRAM, F., ARSHAD, M., & KHALID, M. (2013). Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing *Pseudomonas* and *Rhizobium* strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 1341-1348.
- ALI, B. (2015). Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turkish Journal of Botany*, 39, 1-9.
- ALIZADEH, H., BEHBOUDI, K., AHMADZADEH, M., JAVAN-NIKKHAH, M., ZAMIOUDIS, C., PIETERSE, C. M. J., & BAKKER, P. A. H. M. (2013). Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control*, 65, 14-23.
- ALVAREZ, R., GODÍNEZ-ÁLVAREZ, H., GUZMÁN, U., & DÁVILA, P. (2004). Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 7-16.
- ÁLVAREZ-LÓPEZ, C., OSORIO-VEGA, W., DÍEZ-GÓMEZ, M. C., & MARÍN-MONTOYA, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 225-241.
- AMES DE ICOCHEA, T., (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center.
- ANGULO, V. C., SANFUEENTES, E. A., RODRÍGUEZ, F., & SOSSA, K. E. (2014). Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. *Revista Argentina de Microbiología*, 46, 338-347.
- APIWEB® [CD-ROM] BioMérieux. (2010).
- ARIAS, S., GUZMÁN, U., MANDUJANO, M. C., GALVÁN, M. S., & GOLUBOV, J. (2005). Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 50, 100-125.
- AVILA MARTÍNEZ, E. G., LIZARAZO FORERO, L. M., & CORTÉS PÉREZ, F. (2015). Growth Promotion of *Baccharis macrantha* (Asteraceae) by Phosphate Solubilizing Rhizosphere Bacteria. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 121-131.
- BACA, B., SOTO, L., & PARDO, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 38, 43-49.
- BASHAN, Y., & DE-BASHAN, L. E. (2010). Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. In *Soil biology and agriculture in the tropics* (pp. 109-137). Springer Berlin Heidelberg.
- BASHAN, Y., PUENTE, M. E., SALAZAR, B., DE-BASHAN, L. E., BACILIO, M., HERNANDEZ, J.-P., LEYVA, L. A., ROMERO, B., VILLALPANDO, R., & BETHLENFALVAY, G. J. (2005). Reforestación de tierras erosionadas en el desierto: el papel de las bacterias promotoras de crecimiento en plantas y la materia orgánica. *Suelos Ecuatoriales*, 35, 70-77.

- BHAT, M. A. (2019). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable and Eco-Friendly Agriculture. *Acta Scientific Agriculture*, 3, 23-25.
- BECERRA BAEZA, C. M. D. C., PUIGDOMÈNECH, P., & VICIENT SÁNCHEZ, C. M. (2006). Genes implicados en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* (L.), Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Ciencias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis doctoral.
- BEHERA, B. C., SINGDEVSAACHAN, S. K., MISHRA, R. R., SETHI, B. K., DUTTA, S. K., & THATOI, H. N. (2016). Phosphate solubilizing bacteria from mangrove soils of Mahanadi river delta, Odisha, India. *World journal of agricultural research*, 4(1), 18-23.
- BENEDUZI, A., AMBROSINI, A., & PASSAGLIA, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35, 1044-1051.
- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J., & WHEELER, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), D34–D38. doi:10.1093/nar/gki063.
- BERNÁ AMORÓS, G. (1997). Disección genética del desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metano sulfonato de etilo. Universidad de Alicante, División de Genética, Departamento de Genética y Microbiología. Tesis doctoral.
- BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J. A., & VALDEZATE, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- BOURAHILA, M., DJEBBAR, R., KACI, Y., & ABROUS-BELBACHIR, O. (2018). Alleviation of bleaching herbicide toxicity by PGPR strain isolated from wheat rhizosphere. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 25(2).
- BOYES, D. C., ZAYED, A. M., ASCENZI, R., MCCASKILL, A. J., HOFFMAN, N. E., DAVIS, K. R., & GÖRLACH, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.
- BUONO, N. I., & ULLA, E. L. (2016). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 36(2), 45-54.
- BUZÓ, L. N. (2012). Fijación de nitrógeno en soja (*Glycine max* L. Merr.) inoculada con cepas comerciales de *Bradyrhizobium elkanii* y *B. japonicum*. Universidad de la República de Uruguay. Montevideo, Uruguay. Tesis de licenciatura.
- CABALLERO-MELLADO, J., ONOFRE-LEMUS, J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., & MARTINEZ-AGUILAR, L. (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5308-19.
- CAMELO, R., VERA, M., BUITRAGO, S. P. B., CAMELO, R. R. M., VERA, S. P., & BONILLA, R. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria (Colombia)* V. 12 (2) p. 159-1660122-8706.
- CASTAÑEDA-ROMERO, M., LUNA-CONTRERAS, M., VELA-GODINEZ, D., MONTOYA-SANTIAGO, G., GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, A., PEÑA-MARTÍNEZ, R., & ESPERÓN-RODRÍGUEZ, M. (2016). Nota sobre la estructura poblacional de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) en la reserva de la biósfera "Barranca de Metztitlán", Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*, 115, 65-73.
- CASTILLO-REYES, F., CHAPARRO-SÁNCHEZ, J. D., ESTRADA-RANGEL, S. E., & KU, J. C. (2014). Efecto de microorganismos en la promoción de la germinación de semillas de la cactácea *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto. *Interciencia*, 39, 863-867.
- CERDA, M. E. H., ANAYA, G. C., & SÁNCHEZ, G. A. (2011). Degradación del suelo en una zona semiárida tropical de México. *Revista Geográfica de América Central*, 2, 1-14.

- CHEANG, A. J. R., CERÓN, I. D. T., & BRINGAS, Y. F. (2007). Physiological characterization of sugarcane's endophytic microbial community. *Revista Colombiana de Microbiología*, 7(1), 66.
- CHÁVEZ-AMBRIZ, L. A., HERNÁNDEZ-MORALES, A., CABRERA-LUNA, J. A., LUNA-MARTÍNEZ, L., & PACHECO-AGUILAR, J. R. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48, 333-341.
- CHUN, J., LEE, J. H., JUNG, Y., KIM, M., KIM, S., KIM, B. K., & LIM, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2259-2261.
- CINU (2008). Centro de Información de la ONU. <http://www.cinu.mx>.
- CITES. <https://www.cites.org/esp/app/index.php>.
- COMPANT, S., CLÉMENT, C., & SESSITSCH, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 669-678.
- CONAZA (2019). <https://www.gob.mx/conaza/prensa/priorizaran-atencion-a-comunidades-de-extrema-marginacion-de-las-zonas-aridas-y-en-proceso-de-desertificacion-198461>
- CONTRERAS, A. R., DORANTES, A. M. R., VILLAFÁN, S. M., PÉREZ JIMÉNEZ, S., TOVAR, A. R., & ZÚÑIGA, L. A. G. (2010). Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, 131-147.
- CORRALES RAMÍREZ, L. C., ARÉVALO GALVEZ, Z. Y., & MORENO BURBANO, V. E. (2014). Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, Vol. 12, No. 21, 67-79.
- COUILLEROT, O., PRIGENT-COMBARET, C., CABALLERO-MELLADO, J., & MOENNE- LOCCOZ, Y. (2009). *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 505-12.
- CUEVAS GONZÁLEZ, E. (2013). Producción de auxinas por bacterias solubilizadoras de fósforo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. Tesis de ingeniería.
- DARRIBA D., TABOADA G. L., DOALLO R., & POSADA D. (2012). "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8), 772.
- DATTA, M., PALIT, R., SENGUPTA, C., PANDIT, M. K., & BANERJEE, S. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria enhance growth and yield of chili (*Capsicum annum* L.) under field conditions. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 531.
- DE-BASHAN, L. E., HOLGUIN, G., GLICK, B. R., BASHAN, Y., FERRERA-CERRATO, R., & ALARCÓN, R. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. México: Editorial Trillas, 170-224.
- DE-BASHAN, L. E., ANTOUN, H., & BASHAN, Y. (2008). Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. In promoting growth of *Chlorella vulgaris* 1. *Journal of Phycology*, 44(4), 938-947.
- DENISSE, S. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- 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.
- DE SOUZA, R., BENEDUZI, A., AMBROSINI, A., DA COSTA, P. B., MEYER, J., VARGAS, L. K., SCHOENFELD, R., & PASSAGLIA, L. M. (2013). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and soil*, 366, 585-603.

- DOMÍNGUEZ ACUA, F. R. (2013). Aprovechamiento de las bacterias (*Pseudomona putida* Trv.) como promotores del crecimiento en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo sistema de producción hidropónico. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. Tesis de licenciatura.
- EMMYRAFEDZIAWATI, A. K. R., & STELLA, M. (2018). Identification of free-living nitrogen fixing bacteria isolated from EFB compost, molecular detection of *nifH* gene and measurement of the nitrogenase activity. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 46, 39-46.
- ERTURK, Y., ERCISLI, S., HAZNEDAR, A., & CAKMAKCI, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*, 43, 91-98.
- ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., MARTÍNEZ-AGUILAR, L., LÓPEZ-LARA, I. M., & CABALLERO-MELLADO, J. (2012). *Cupriavidus alkaliphilus* sp. nov., a new species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. *Systematic and applied microbiology*, 35, 310-314.
- ETEBARIAN, H. R., MOHAMMADIFAR, M., ALIZADEH, H., & ZAREEI, S. A. (2007). Biological control of barley covered smut by bacterial antagonists. *Applied Entomology and Phytopathology*. 74, 2 (82), 81-91.
- FAO. (2016). Desarrollo sostenible de tierras áridas y lucha contra la desertificación [Online]. Available: <http://www.fao.org/docrep/V0265S/v0265s01.htm> [Accessed].
- FIGUEROA-LÓPEZ, A. M., CORDERO-RAMÍREZ, J. D., MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C., LÓPEZ-MEYER, M., LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J., FÉLIX-GASTÉLUM, R., CASTRO-MARTÍNEZ, C., & MALDONADO-MENDOZA, I. E. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *Springer Plus*, 5(1), 330.
- FLORES, G. J. A., & MACÍAS, C. G. V. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Ciencia UANL*, 5-11.
- GAO, L., KONG, F., FENG, C., WANG, J., GAO, J., SHEN, G., & ZHANG, C. (2016). Isolation, characterization, and growth promotion of phosphate-solubilizing bacteria associated with *Nicotiana tabacum* (tobacco). *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(3), 993-1003.
- GONZÁLEZ MEDRANO, F. (2012). Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación., México, D. F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología.
- GOUY, M., GUINDON, S., & GASCUEL, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224.
- GALTIER, N., GOUY, M., & GAUTIER, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, 12:543-548.
- GRANADOS-SÁNCHEZ, D., HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Á., VÁZQUEZ-ALARCÓN, A., & RUÍZ-PUGA, P. (2013). Los procesos de desertificación y las regiones áridas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 19, 45-66.
- GUSAIN, Y. S., KAMAL, R., MEHTA, C. M., SINGH, U. S., & SHARMA, A. K. (2015). Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *Journal of environmental biology*, 36(1), 301.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series* 41:95-98.
- HAN, T., YOU, C., ZHANG, L., FENG, C., ZHANG, C., WANG, J., & KONG, F. (2016). Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. *Bio Control*, 61, 195-205.
- HASSAN, M. N., AFGHAN, S., & HAFEEZ, F. Y. (2010). Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth-promoting rhizobacteria. *Bio Control*, 55, 531-542.

- HERNÁNDEZ, J. G., CHÁVEZ, R. J., & SÁNCHEZ M. (2007). Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto Queretano. CONABIO. Biodiversitas, 70, 6-9.
- HERNÁNDEZ, H. M., CHÁZARO, M., & GÓMEZ-HINOSTROSA, C. (2013). *Echinocactus platyacanthus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013.
- HERNÁNDEZ-CASTILLO, F. D., LIRA-SALDIVAR, R. H., GALLEGOS-MORALES, G., HERNÁNDEZ-SUÁREZ, M., & SOLIS-GAONA, S. (2016). Biocontrol of pepper wilt with three *Bacillus* species and its effect on growth and yield. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 83(1), 49-55.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E. J., HERNÁNDEZ-RÍOS, I., ALMARAZ-SUAREZ, J. J., LÓPEZ-LÓPEZ, A., TORRES-AQUINO, M., & MORALES FLORES, F. J. (2018). Caracterización *in vitro* de rizobacterias y su antagonismo con hongos causantes del "damping off" en Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 525-537.
- HERNÁNDEZ-MAGAÑA, R., HERNÁNDEZ-ORIA, J. G., & CHÁVEZ, R. (2012). Datos para la conservación florística en función de la amplitud geográfica de las especies en el Semidesierto Queretano, México. *Acta botánica mexicana*, 105-140.
- HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L., MORENO-MEDINA, V. R., QUIROZ-VELÁSQUEZ, J. D., GARCÍA-OLIVARES, J. G., & MAYEK-PÉREZ, N. (2010). Efecto de diferentes concentraciones de ácido antranílico en el crecimiento del maíz. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 57-63.
- HERNÁNDEZ-ORIA, J. G., CHÁVEZ-MARTÍNEZ, R., & SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, E. (2007). Factores de riesgo en las Cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto chihuahuense, México. *Interciencia*, 32, 728-734.
- HERNÁNDEZ SILVA, D. J. (2014). Análisis de expresión del gen homólogo GPI1 de *Saccharomyces cerevisiae* en *Ustilago maydis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis doctoral.
- HERRERA, J. R. (2014). *Ustilago maydis*: ascenso de un hongo mexicano de la gastronomía local al mundo científico. *Nova Scientia*, 1(1), 118-135.
- HERRERA CUADRA, J. M. M. (2005). Filogenia bacteriana mediante el análisis del rRNA 16S. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- HOLGUIN, G., BASHAN, Y., PUENTE, E., CARRILLO, A., BETHLENFALVAY, G., ROJAS, A., VÁZQUEZ, P., TOLEDO, G., JIMÉNEZ, M. B., & GLICK, B. R. (2003). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. *Agricultura Técnica en México*, 29.
- HU, C. H. (2005). Induction of Growth Promotion and Stress Tolerance in *Arabidopsis* and Tomato by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Auburn University, Department Entomology and Plant Pathology. Tesis doctoral.
- HUBER, T., FAULKNER, G., & HUGENHOLTZ, P. (2004) Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments, *Bioinformatics* 20, 2317-2319. <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>
- IBÁÑEZ, C. M., & MÉNDEZ, M. A. (2014). Filogenia y método comparado: El estudio de la evolución de los rasgos. Introducción a la Biología Evolutiva. Capítulo de libro Introducción a la biología evolutiva. pp.165-173. European Society for Evolutionary Biology - Sociedad Chilena de Evolución.
- INEGI (2016). Publicaciones y mapas.
- ISLAS LÓPEZ, V. H. (2008). Crecimiento de plántulas de biznaga (*Echinocactus grusonii* Hildman) con diferentes sustratos y soluciones nutritivas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Tesis de Ingeniería.
- JIMÉNEZ-SIERRA, C. L. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*, 12 (1).
- JIMÉNEZ-SIERRA, C. L., & EGUIARTE, L. E. (2010). Candy Barrel Cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto): A traditional plant resource in Mexico subject to uncontrolled extraction and browsing. *Economic Botany*, 64, 99-108.

- JEYANTHI, V., & KANIMOZHI, S. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)– Prospective and Mechanisms: A Review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 733-749.
- JORDÁN, M., & CASARETTO, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile.
- JUNAID, J. M., DAR, N. A., BHAT, T. A., BHAT, A. H., & BHAT, M. A. (2013). Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences*, 1, 39-57.
- KAMBLE, K. D., & GALERAO, D. K. (2015). Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology and Chemistry*, 4(1), 2277-4688.
- KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., DA SILVA, J. L., PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A., ZUCCHI, T. D., TAKETANI, R. G., ANDREOTE, F. D., & DE MELO, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191.
- KIM, O. S., CHO, Y. J., LEE, K., YOON, S. H., KIM, M., NA, H., PARK, S. C., JEON, Y. S., LEE, J. H., YI, H., WON, S., & CHUN, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721.
- KIM, M., OH, H. S., PARK, S. C., & CHUN, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2), 346-351.
- KIT DE EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE ROCHE®. <https://shop.roche.com/shop/products/dna-isolation-kit-for-cells-and-tissues>.
- KIT DE PURIFICACIÓN WIZARD® DE PROMEGA. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/wizard-sv-gel-and-pcr-cleanup-system-protocol/>.
- KUMAR, K., OTA, M., TATON, A., & GOLDEN, J. W. (2019). Excision of the 59-kb fdxN DNA element is required for transcription of the *nifD* gene in *Anabaena* PCC 7120 Heterocysts. *New Zealand Journal of Botany*, 57(2), 76-92.
- KUNWAR V. S., CHIMOURIYA S., LAMICHHANE J., & GAUCHAN D. P. (2018). Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Rhizosphere of Coffee Plant and Evaluating Their Effects on Growth and Development of Coffee Seedlings. *Biotechnology: An Indian Journal*;14(5):173.
- LANDA, R., CARABIAS, J., & MEAVE, J. (2014). Environmental deterioration, a conceptual proposal for rural zones in Mexico. *Ecological Applications*, 7 (1), 316-329.
- LARA, C. (2014). Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar los pastos. *Zootecnia Tropical*, 29.
- LI, H. B., SINGH, R. K., SINGH, P., SONG, Q. Q., XING, Y. X., YANG, L. T., & LI, Y. R. (2017). Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1268.
- LIMA, J. V. L., WEBER, O. B., CORREIA, D., SOARES, M. A., & SENABIO, J. A. (2015). Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. *Plant and Soil*, 389(1-2), 25-33.
- LIU, Z., LI, Y. C., ZHANG, S., FU, Y., FAN, X., PATEL, J. S., & ZHANG, M. (2015). Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*, 96, 217-224.
- LIU, M., LIU, X., CHENG, B. S., MA, X. L., LYU, X. T., ZHAO, X. F., JU., Y. L., MIN, Z., & FANG, Y. L. (2017). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(4), 1106.

- LLORENTE-BOUSQUETS, J., & OCEGUEDA, S. (2008). Estado del conocimiento de la biota. Capital natural de México, 1, 283-322.
- LOREDO-OSTI, C., LÓPEZ-REYES, L., & D., E.-V. (2016). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. Terra Latinoamericana, 22, 225-239.
- LUNA MARTÍNEZ, L., MARTÍNEZ PENICHE, R. A., HERNÁNDEZ ITURRIAGA, M., ARVIZU MEDRANO, S. M., & PACHECO AGUILAR, J. R. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. Revista fitotecnia mexicana, 36, 63-69.
- LYCUS, P., SORIANO-LAGUNA, M. J., KJOS, M., RICHARDSON, D. J., GATES, A. J., MILLIGAN, D. A., FROSTEGÅRD, Å., BERGAUST, L., & BAKKEN, L. R. (2018). A bet-hedging strategy for denitrifying bacteria curtails their release of N₂O. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(46), 11820-11825.
- MA, Y., PRASAD, M. N., RAJKUMAR, M., & FREITAS, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. Biotechnology Advances 29, 248-58.
- MANDUJANO, M. C., GOLUBOV, J., & ROJAS-ARÉCHIGA, M. (2007). Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. Cactáceas y succulentas mexicanas, 52, 7.
- MANZANO, S. S. (2008). Función del ácido salicílico en la floración acelerada por estrés en *Arabidopsis thaliana*. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Tesis doctoral.
- MARCO PICÓ, F. (2000). Regulación de la S-adenosilmetionina descarboxilasa durante el desarrollo de *Pisum Sativum* y *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Valencia, Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Tesis Doctoral.
- MARRA, L. M., OLIVEIRA, S. M. D., SOARES, C. R. F. S., & MOREIRA, F. M. D. S. (2011). Solubilization of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. Scientia Agricola, 68(5), 603-609.
- MARRA, L. M., OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. D., SOARES, C. R., LIMA, J. M. D., OLIVARES, F. L., & MOREIRA, F. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. Brazilian Journal of Microbiology, 46(2), 367-375.
- MARTÍN, M., GRANERO, M., & RIVILLA, R. (2011). Colonización de la rizósfera por *Pseudomonas*. In: M. MEGÍAS, R. RIVILLA, M.J. SOTO, M. J. DELGADO, E. GONZÁLEZ, P. F. MATEOS, M. LEÓN, Y. B. R. & BEDMAR, E. J. (eds.) Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. España: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).
- MARTÍNEZ, N. M., MAYO, V. M. Z., OLALDE, J. I. R., MOYA, O. R. S., & DE FOLTER, S. (2009). Genómica Funcional de Plantas: Estudio del Desarrollo de Flores y Frutos. Acta Universitaria, 19, 21-29.
- MAYZ-FIGUEROA, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. Revista Científica UDO Agrícola, 4, 1-20.
- MEZA-NIVÓN, M. V. (2011). Segundo informe referente a la realización de la asesoría número INE/ADA - 026/2011 denominada "cactáceas mexicanas: usos y amenazas". Instituto Nacional de Ecología.
- MONTES, S. A., GAMA-LÓPEZ, S., GUZMÁN-CRUZ, L. U., & VÁZQUEZ-BENÍTEZ, B. (2012). Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Cactaceae Juss, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Ciudad de México, México.
- MORALES-GARCÍA, Y., DUQUE, E., RODRÍGUEZ-ANDRADE, O., DE LA TORRE, J., MARTÍNEZ-CONTRERAS, R., PÉREZ-TERRÓN, R., & MUÑOZ-ROJAS, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. BioTecnología, 14, 11-29.
- MURPHY J. & RILEY H. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytical Chemistry. Acta 27: 31-36.
- NAKBANPOTE, W., PANITLURTUMPAI, N., SANGDEE, A., SAKULPONE, N., SIRISOM, P., & PIMTHONG, A. (2014). Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd

- contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*, 9, 379-387.
- NAUTIYAL, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- NAVARRO-NOYA, Y. E., JAN-ROBLERO, J., DEL CARMEN GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M., HERNÁNDEZ-GAMA, R., & HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xylopoda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 97(4), 335-349.
- NEVITA, T., SHARMA, G. D., & PANDEY, P. (2018). Composting of rice-residues using lignocellulolytic plant-probiotic *Stenotrophomonas maltophilia*, and its evaluation for growth enhancement of *Oryza sativa* L. *Environmental Sustainability*, 1(2), 185-196.
- NOH MEDINA, J., YAM CHIMAL, C., BORGES GÓMEZ, L., ZÚÑIGA AGUILAR, J. J., & GODOY HERNÁNDEZ, G. (2014). Aislados bacterianos con potencial biofertilizante para plántulas de tomate. *Terra Latinoamericana*, 32(4), 273-281.
- ODOH, C. K. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiology. A review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 4, 123-142.
- OGATA, K., ARELLANO, C., & ZÚÑIGA, D. (2016). Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies de vegetales cultivados. *Zonas áridas*, 12, 137-153.
- OLAYA, C., & FIDEL, J. (2016). Caracterización por metagenómica de la microbiota rizosférica nativa de *Opuntia ficus indica* var. inermis y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus Tumbes, Perú, 2014–2015. Informe de Investigación.
- ORHAN, E., ERCISLI, S., ESITKEN, A., & SAHIN, F. (2006). Lateral root induction by bacteria, radicle cut off and IBA treatments of almond CVS. Texas and nonpareil seedlings. *Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture Sodrininkystė ir Daržininkystė*, 25, 71-76.
- ORTUÑO, N., CÓRDOBA, M., CLAROS, M., & CASTILLO, J. A. (2018). Evaluación de bacterias endófitas de papa nativa (*Solanum tuberosum* L.) y el desarrollo de un biofertilizante. *Revista Latinoamericana de la papa*, 22(1), 12-37.
- PAJARES, S., (2016). La cascada del nitrógeno ocasionada por actividades humanas. *Revista OIKOS*, editada por el Instituto de Ecología de la UNAM, 16: 14-17.
- PARK, M., KIM, C., YANG, J., LEE, H., SHIN, W., KIM, S., & SA, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* 160: 127-133.
- PERIN, L., MARTÍNEZ AGUILAR, L., CASTRO GONZÁLEZ, R., ESTRADA DE LOS SANTOS, P., CABELLOS AVELAR, T., GUEDES, H. V., REIS, V. M., & CABALLERO MELLADO, J. (2006). *Diazotrophic Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3103–3110.
- PEÑA, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18, 265-267.
- PIN VISO, N. D., SAUTUA, F., SCANDIANI, M. M., LUQUE, A., SIMONETTI, E., & CARMONA, M. A. (2016). In vitro antagonistic activity of native bacteria isolated from soils of the Argentine Pampas against *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium virguliforme*. *Academic Journals; African Journal Of Microbiology Research*; 10; 27; 7-2016; 1031-1035
- PINEDA, M. E. B. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15, 101-113.
- POURBABAEE, A. A., SOLEYMANI, S., FARAHBAKHSH, M., & TORABI, E. (2018). Biodegradation of diazinon by the *Stenotrophomonas maltophilia* PS: pesticide dissipation kinetics and breakdown characterization using FTIR. *International journal of environmental science and technology*, 15(5), 1073-1084.
- RAHMOUNE, B., MORSLI, A., KHELIFI-SLAOUI, M., KHELIFI, L., STRUEH, A., ERBAN, A., KOPKA, J., PRELL, J., & VAN DONGEN, J. T. (2017). Isolation and characterization of three new

- PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. *Journal of Plant Interactions*, 12, 1-6.
- RAMONES, C. J. C. (2016). Análisis de variación somacional en plantas regeneradas de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Secale cereale*. Universidad de León. León, España. Tesis doctoral.
- RAMÍREZ, M. C. C. (2005). Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. Anais do X Encontro de Geógrafos de América Latina, Universidad de São Paulo, 3388-3407. Sao Paulo, Brazil.
- RAMÍREZ-SAAD, H. (1999). Molecular Ecology of *Frankia* and other soil bacteria under natural and chlorobenzoate-stressed conditions. Universidad Agrícola de Wageningen. Wageningen, Holanda. Tesis doctoral.
- RAMÍREZ ZAVALA, B.; RAMÍREZ-SAAD, H. (2002). Construcción de árboles filogenéticos basados en secuencias de DNA. En: Apuntes del IV Curso Internacional de Microbiología Industrial, pp 3-11. Oscar Monroy Hermosillo (Ed). U.A.M. Iztapalapa/IRD-Francia.
- REETHA, S., BHUVANESWARI, G., THAMIZHINIYAN, P., & MYCIN, T. R. (2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 568-574.
- RESTREPO-FRANCO, G. M., MARULANDA-MORENO, S., DE LA FE-PÉREZ, Y., DÍAZ-DE LA OSA, A., BALDANI-VERA, L., & HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46, 63-76.
- RIVES, NAROVIS, ACEBO, YANELIS, ALMAGUER, M, GARCÍA, J.C., & HERNÁNDEZ, ANNIA. (2009). Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev.). *Revista de Protección Vegetal*, 24(2), 106-116.
- RODRÍGUEZ, H., & FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, 17(4-5), 319-339.
- RODRÍGUEZ, M. R. (2008). Análisis de la población bacteriana endófito presente en nódulos de *Lupinus*: interacción y localización *in situ*. Salamanca: Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. España. Tesis doctoral.
- ROJAS-TAPIAS, D., MORENO-GALVÁN, A., PARDO-DÍAZ, S., OBANDO, M., RIVERA, D., & BONILLA, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272.
- ROSSELLÓ-MORA, R., & AMANN, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- ROYO-MÁRQUEZ, M. H., MELGOZA-CASTILLO, A., & QUINTANA-MARTÍNEZ, G. (2014). Especies vegetales en peligro, su distribución y estatus de conservación de los ecosistemas donde se presentan. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5, 86-103.
- SALINAS CHÁVEZ, J. Á. (2015). Tensiones, significados e intereses de las actividades económicas de los integrantes una organización de protección al medio ambiente en el semidesierto queretano. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. Tesis de maestría.
- SALINAS-VIRGEN, L. I. (2015). Aislamiento y caracterización mediante técnicas microbiológicas y de biología molecular de bacterias promotoras del crecimiento obtenidas de la rizósfera de la cactácea *Echinocactus platyacanthus* (biznaga dulce) del semidesierto de Querétaro. Departamento de Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco, México. Reporte de servicio social.
- SALOMON, B., & ALAYA, L. (2016). Identificación molecular de bacterias cultivadas y no cultivadas asociadas a la rizósfera de *Opuntia ficus-indica* (L.) mll. (Cactaceae) en Ecosistemas Áridos. Universidad Nacional de Tumbes. Lima, Perú. Tesis de maestría.
- SANGER, F., NICKLEN, S., & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- SANTANA-ARAGONE, D., COLINA-NAVARRETE, E., CASTRO-ARTEAGA, C., CADENA-PIEDRAHITA, D., SOTOMAYOR-MORÁN, A., GALARZA-CENTENO, E., & LÓPEZ-

- VILLACRÉS, M. (2017). Microorganismos fijadores de nitrógeno y su acción complementaria a la fertilización química en el cultivo de *Coffea arabica* L. European Scientific Journal, ESJ, 13(3), 2-11.
- SCHWACHTJE J., KAROJET S., THORMÄHLEN I., BERNHOLZ C., KUNZ S., BROUWER, S., SCHWOCHOW, M., KÖHL, K., & VAN DONGEN, J. T. (2011) A Naturally Associated Rhizobacterium of *Arabidopsis thaliana* Induces a Starvation-Like Transcriptional Response while Promoting Growth. PLOS ONE 6(12): e29382.
- SCHWACHTJE, J., KAROJET, S., KUNZ, S., BROUWER, S., & VAN DONGEN, J. T. (2012). Plant-growth promoting effect of newly isolated rhizobacteria varies between two *Arabidopsis* ecotypes. Plant Signaling & Behavior, 7(6), 623-627.
- SINGH, R. P., & JHA, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. Frontiers in Microbiology, 8, 1945.
- SINGH, Y., & LAL, N. (2016). Isolation and characterization of PGPR from wheat (*Triticum aestivum*) rhizosphere and their plant growth promoting traits in vitro. Indian Journal of Biology, 3(2), 139-144.
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., & KUMAR S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729.
- TAXONOMY. (2017). Taxonomy browser (*Echinocactus platyacanthus*) [Online]. NCBI. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> [Accessed].
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIK, F., JEANMOUGIN, F., & HIGGINS, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25:4876-4882.
- TOGNACCA, R. (2012). Análisis de la función de DOG1 en el control de la germinación por luz en las semillas de *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Belgrano. Buenos Aires, Argentina. Tesis de licenciatura.
- TORRES-CORTÉS, G., MILLÁN, V., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J., AGUIRRE-GARRIDO, J. F., RAMÍREZ-SAAD, H. C., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., TORO, N., & MARTÍNEZ-ABARCA, F. (2012). Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. Plant and Soil, 357, 275-288.
- VALENCIA, H., SÁNCHEZ, J., & VALERO, N. (2005). Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfato presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del Páramo el Granizo. Estrategias adaptativas de plantas de páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Unibiblos, Bogotá, 177-193.
- VAN DEN BROEK, D., CHIN-A-WOENG, T. F., BLOEMBERG, G. V., & LUGTENBERG, B. J. (2005). Molecular nature of spontaneous modifications in gacS which cause colony phase variation in *Pseudomonas* sp. strain PCL1171. Journal of bacteriology, 187(2), 593-600.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, M., TERRAZAS, T., & ARIAS, S. (2012). El hábito y la forma de crecimiento en la tribu *Cacteae* (*Cactaceae*, *Cactoideae*). Botanical Sciences, 90, 97-108.
- VENEGAS MOLINA, J. J. (2013). Evaluación de inductores de resistencia, para el control de lepidópteros y tolerancia a estrés hídrico en brócoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) y en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Cumbaya, Pichincha. Universidad Central de Ecuador. Quito, Ecuador. Tesis de ingeniería.
- VERBIST, K., SANTIBAÑEZ, F., GABRIELS, D., & SOTO, G. (2010). Atlas de zonas áridas de América Latina y el Caribe. Dentro del marco del proyecto Elaboración del mapa de zonas áridas, semiáridas y subhúmedas de América Latina y el Caribe. Centro del Agua para Zonas Áridas de América Latina y el Caribe (CAZALAC). Oficina Regional de Ciencia para América Latina y el Caribe de la UNESCO.
- VERMA, J. P., YADAV, J., TIWARI, K. N., & LAVAKUSH, S. V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. International Journal of Agricultural Research, 5, 954-983.
- WAHYUDI, A. T., ASTUTI, R. P., WIDYAWATI, A., MERY, A., & NAWANGSIH, A. A. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their

- use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 34-40.
- WESELOWSKI, B., NATHOO, N., EASTMAN, A. W., MACDONALD, J., & YUAN, Z. C. (2016). Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC microbiology*, 16(1), 244.
- YADEGARI, M. (2014). Inoculation of bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria. *Advances in Environmental Biology*, 419-425.
- YARZA, P., YILMAZ, P., PRUESSE, E., GLÖCKNER, F. O., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K., & ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2014a). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-45.
- YARZA, P., YILMAZ, P., PRUESSE, E., GLÖCKNER, F. O., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.-H., WHITMAN, W. B., EUZÉBY, J., AMANN, R., & ROSSELLÓ-MÓRA, R. (2014b). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 635-645.
- YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H., & CHUN, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67:1613-1617.
- ZAHIR, Z., MUNIR, A., ASGHAR, H., SHAHAROONA, B., & ARSHAD, M. (2008). Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 958-963.
- ZHANG, J., WANG, P., FANG, L., ZHANG, Q. A., YAN, C., & CHEN, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1), 57-65.
- ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L., & MILLER, W. (2000). "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *Journal of Computational Biology*; 7(1-2):203-14.
- ZHAO, L., XU, Y., LAI, X. H., SHAN, C., DENG, Z., & JI, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 977-989.

13. ANEXOS.

ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones.

Medio de cultivo para heterótrofos TY (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012).

Composición: Triptona 5 g/L, Extracto de levadura 3 g/L y CaCl_2 1 g/L.

Se ajustó el pH a 7; se colocaron 5 mL en tubos con tapa de rosca y se esterilizaron 15 minutos en autoclave a $^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión.

Medio de cultivo para solubilizadores de fosfato inorgánico NBRIP (Nautiyal, 1999).

Composición: Glucosa 10 g/L, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.35 g/L, KCl 0.2 g/L y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L.

Se ajustó pH a 7. Para medio sólido se adicionó agar 1.2% y fue suplementado con 0.025 g/L azul de bromofenol como indicador de pH, que además permitió la visualización de los halos de solubilización (Restrepo-Franco *et al.*, 2015).

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y se vertió en cajas Petri de 90x15 mm (sólido) o en matraces estériles de 125 mL (líquido).

Medio de cultivo Burk para producción de IAA (Park *et al.*, 2005).

Composición: Glucosa 10 g/L, KH_2PO_4 0.41 g/L, K_2HPO_4 0.52 g/L, NaCl 0.05 g/L, CaCl_2 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L y FeSO_4 0.005 g/L.

Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 1N; se tomaron alícuotas de 5 mL en tubos de ensayo con tapa de rosca, o 25 mL en matraces de 125 mL. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio PDA para hongos (Ames de Icochea, 2004).

Composición: Agar papa-dextrosa BD Bioxon 39 g/L.

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y se vertió en cajas Petri de 90x15 mm.

Medio YPD para hongos.

Composición: Glucosa 20 g/L, Peptona 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L y Agar 1.2%.

Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión y se vertió en cajas Petri de 90x15 mm.

Medio Murashige y Skoog (MS) para *Arabidopsis thaliana*.

Composición: medio basal Murashige y Skoog con vitaminas 2.215 g/L, Glucosa 10 g/L y Agarosa 0.8%.

Se ajustó el pH a 6.5, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión y se vertió en cajas Petri de 60x15 mm.

Buffer PBS 10X.

Composición: KCl 2 g/L, KH_2PO_4 2.4 g/L, NaCl 80 g/L y Na_2HPO_4 14.4 g/L.

Se disolvió el Na_2HPO_4 en 16 mL de agua destilada con agitación y calor, el resto de los reactivos se disolvieron en 520 mL de agua destilada; se mezclaron ambas soluciones, se aforó a 1 L, se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión.

La concentración de trabajo del buffer fue de 1X por lo que se realizó la dilución correspondiente en agua destilada estéril.

Buffer TAE 10X.

Composición: Tris base 48.4 g/L, ácido acético glacial 11.42 mL/L, EDTA 0.5M pH 8 100mL/L.

Se aforó a 1 L, la concentración de trabajo del buffer fue de 1X por lo que se hizo la dilución correspondiente en agua destilada.

Solución Stock de fosfato (Lasso *et al.*, 2007).

Se preparó una solución Stock de fosfato con una concentración de 50 mg(P- PO_4)/L disolviendo 0.2195 g de KH_2PO_4 anhidro en 1 L de agua destilada. Se almacenó a 4°C.

Reactivo para cuantificación de fosfato soluble (Lasso *et al.*, 2007).

Para preparar 100 mL de reactivo se requieren 50 mL de H_2SO_4 5N (70 mL de H_2SO_4 concentrado para 500 mL), 5 mL de solución de tartrato de amonio y potasio (0.6858 g de $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ para 250 mL), 15 mL de solución de molibdato de amonio (20 g de $(\text{NH}_4)_5\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para 500 mL) y 30 mL de ácido ascórbico 0.1 M (1.76 g de ácido ascórbico para 100 mL).

Las soluciones fueron preparadas con agua destilada, se disolvieron los reactivos en una fracción del volumen y posteriormente se aforaron para alcanzar el volumen final. Todas las soluciones se almacenaron en recipientes de vidrio a temperatura ambiente a excepción del ácido ascórbico que se almacenó en un frasco de vidrio ámbar a 4°C para evitar su degradación.

Solución de triptófano.

Se preparó una solución de triptófano con una concentración de 11.4 mg/mL disolviendo 11.4 g de triptófano en 100 mL de agua destilada. La solución se esterilizó por filtración en membranas estériles de ésteres mixtos de celulosa (MCE; 0.22 µm. Millipore, Ref: SLGS033SB).

Solución Stock IAA.

Se preparó una solución Stock de IAA con una concentración de 100 µg/mL disolviendo 10 mg en 100 mL de etanol absoluto.

Reactivo de Salkowski (Rives *et al.*, 2009).

Composición: para preparar 1L de reactivo se agregan H₂SO₄ 375 mL y FeCl₃ 0.5 M 18.75 mL; se aforó con H₂O destilada.

ANEXO II. Protocolo de extracción de DNA.

El protocolo de extracción de DNA con el kit de extracción *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Ref: 11796828001) es el siguiente:

1. Se tomó 1.5 mL de cultivo líquido de cada aislado y se colocó en un microtubo de 1.5 mL estéril.
2. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante y se reservó el *pellet* formado por células bacterianas.
4. Se resuspendió el *pellet* en 200 µL de buffer PBS 1X.
5. Se adicionaron 20 µL de lisozima (50 mg/mL).
6. Se incubó a 37°C durante 15 minutos en *termoblock*.
7. Se añadieron 200 µL de buffer de unión a membrana (*Binding buffer*) y 40 µL de proteinasa K.
8. Se incubó a 70°C durante 10 minutos en *termoblock*.
9. Se añadieron 100 µL de isopropanol y se mezcló por inversión.
10. Se ensambló una micro columna de filtración en un tubo colector.
11. Se pasó la muestra a la micro columna.
12. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
13. Se removió la micro columna, se desechó el líquido del tubo colector y se volvió a montar la micro columna en el tubo.
14. Se añadieron 500 µL de buffer de eliminación de inhibidores (*inhibitor removal buffer*).
15. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
16. Se removió la micro columna, se desechó el líquido del tubo colector y se volvió a montar la micro columna en el tubo.
17. Se añadieron 500 µL de buffer de lavado (*wash buffer*).
18. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
19. Se repitieron los pasos 17 y 18.
20. Se removió la micro columna, se desechó el líquido del tubo colector y se volvió a montar la micro columna en el tubo.
21. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 segundos.
22. Se desechó el tubo colector.
23. Se insertó la micro columna en un microtubo de 1.5 mL limpio y estéril.
24. Se agregaron 200 µL de buffer de elución (*elution buffer*).
25. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto.
26. Se desechó la micro columna.
27. Se añadieron 5 µL de RNAsa.
28. Se incubó a 37°C durante 15 minutos en *termoblock*.
29. Se almacenó a 4°C hasta su uso.

ANEXO III. Electroforesis de DNA.

Se prepararon geles de agarosa al 1% para conocer la integridad del DNA extraído y de los productos de PCR obtenidos, además de determinar si se obtuvieron los fragmentos deseados en ésta última y realizar su cuantificación para secuenciar (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). Se preparó cada gel de la siguiente manera:

1. Se prepararon 30 mL de gel de agarosa al 1% p/v (agarosa / buffer TAE 1X).
2. Se calentó la mezcla en horno de microondas hasta disolver la agarosa.
3. Se colocó la solución en la charola para hacer geles y, dentro de ella, se situó el peine para formar los pozos.
4. Se dejó gelificar durante 20 min.
5. Una vez que se solidificó el gel, se retiró el peine y se colocó dentro de la cámara de electroforesis, a la que se le adicionó buffer TAE 1X.
6. Se cargaron 3 µL de marcador de tamaño molecular. Los marcadores de tamaño molecular utilizados fueron DNA de fago λ digerido con *EcoRI* (en el caso de visualizar DNA de alto peso molecular) y marcador de 100 a 3,000 pb (Axygen, IDPIDO185432), en el caso de analizar productos de PCR (gen 16S rRNA o *nifH*).
7. Se mezclaron 3 µL de cada muestra con 2 µL de buffer de carga de DNA; se cargó la mezcla en pozos independientes del gel (5 µL en total en cada pozo).
8. Se corrió el gel a 100 volts durante 30 min.
9. Se colocó el gel en buffer de tinción de bromuro de etidio con una concentración de 0.5 µg/mL, durante 15 min.
10. Se reveló el gel en un transiluminador KODAK EDAS 290 con lámpara UV y se guardó la fotografía con el software K1D.

Para la cuantificación de DNA en gel se realiza el siguiente procedimiento:

1. Se capturó la fotografía del gel con el software K1D.
2. Se seleccionó el área de la fotografía correspondiente a los carriles del gel donde corrieron las muestras durante la electroforesis.
3. Se le indicó al programa que detectara los carriles donde corrieron las muestras.
4. Se le indicó al programa que detectara las bandas de DNA que se encontraban en cada carril.
5. Se delimitó el contorno y el pico máximo de intensidad de las bandas.
6. Se registraron la intensidad neta y el área de cada banda.
7. Se calculó la concentración de DNA contenida en cada banda con la siguiente ecuación:

$$X = \frac{A * B}{C}$$

Dónde **X** es la concentración de DNA contenida en la banda, **A** es el producto de la intensidad neta y el área de la banda problema, **B** es la concentración conocida de una banda del marcador que tiene un tamaño comparable con la banda problema, y **C** es el producto de la intensidad neta y el área de una banda del marcador.

ANEXO IV. Amplificación de genes por PCR.

Amplificación del gen 16S por PCR.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

1. Se preparó la mezcla de reacción (Tabla 11), se mezcló bien y se colocó en un tubo para PCR.

Tabla 11: Mezcla de reacción para amplificación del gen 16S rRNA por PCR.	
Reactivo	μL (1X)
H ₂ O grado MQ.	17.3
Buffer 10x.	2.5
MgCl ₂ .	1.5
dNTPs.	0.5
Primer 8F.	1.0
Primer 1492R.	1.0
Polimerasa (Taq).	0.2
Total.	24

2. Se agregó 1 μL de la dilución de DNA genómico para tener un volumen final de reacción de 25 μL.
3. Se centrifugó 30 segundos.
4. Se colocaron los tubos en el termociclador con las condiciones necesarias para la amplificación (Tabla 12).

Tabla 12: Programa de amplificación de gen 16S rRNA para termociclador.			
Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	} 35 ciclos.
Desnaturalización inicial	5	94	
Desnaturalización	0.5	94	
Alineamiento	0.5	52	
Elongación	0.5	72	
Elongación final	1	72	
Conservación	∞	4	

Al finalizar el programa, se mezclaron 3 μL de la reacción con 2 μL de buffer de carga de DNA y se corrieron en gel de agarosa al 2% (ver Anexo III).

Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del gen 16S rRNA son:

8F: 5' AGA CTT TGA TCM TGG CTC AG 3'

1492R: 5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

Amplificación del gen *nifH*.

Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

1. Se preparó la mezcla de reacción (Tablas 13 y 14) sin el DNA, se homogeneizó bien y se colocó en un tubo para PCR.

Tabla 13: Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR con <i>primers</i> universales.	
Reactivo	μL (1X)
H ₂ O grado MQ.	14.8
Buffer 10x.	2.5
MgCl ₂ .	1.5
dNTPs.	2.0
Primer <i>nifH</i> 1 F.	1.0
Primer <i>nifH</i> 1 R.	1.0
<i>Taq</i> polimerasa	0.2
Total.	23.0

Tabla 14: Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR con <i>primers</i> específicos.	
Reactivo	μL (1X)
H ₂ O grado MQ.	14.8
Buffer 10x.	2.5
MgCl ₂ .	1.5
dNTPs.	1.0
Primer <i>nifH</i> 1 F.	1.0
Primer <i>nifH</i> 1 R.	1.0
<i>Taq</i> polimerasa	0.2
Total.	23.0

2. Se agregaron 2 μL de la dilución de DNA genómico para tener un volumen final de reacción de 25 μL .
3. Se centrifugó 30 segundos.
4. Se colocaron los tubos en el termociclador con las condiciones necesarias para cada juego de *primers* (Tablas 15 y 16).

Tabla 15: Programa de amplificación del gen <i>nifH</i> para termociclador con <i>primers</i> generales.						
Paso	Primer <i>fwrA</i>			Primer <i>fwrB</i>		
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	30	5	94	35
Desnaturalización	1	94		1	94	
Alineamiento	1	48		1	52	
Elongación	1	72		1	72	
Elongación final	10	72		10	72	
Conservación	∞	4		∞	4	

Tabla 16: Programa de amplificación del gen <i>nifH</i> para termociclador con <i>primers</i> específicos.						
Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)				
		Primers Azo	Primers Clos	Primers Entero	Primers RFZ	
Desnaturalización inicial	10	94	94	94	94	35 ciclos
Desnaturalización	1	94	94	94	94	
Alineamiento	1	58	45	61	53	
Elongación	1	72	72	72	72	
Elongación final	10	72	72	72	72	
Conservación	∞	4	4	4	4	

Al finalizar el programa, se mezclaron 3 μ L de la reacción con 2 μ L de buffer de carga de DNA y se corrieron en gel de agarosa al 2% (ver Anexo III). Los *primers* utilizados para la amplificación del gen *nifH* se muestran en las Tablas 17 y 18.

Tabla 17: *Primers* universales utilizados para la amplificación del gen *nifH*.

Nombre del primer	Organismo relacionado.	Secuencia	Sitio de unión.	Tamaño del fragmento.	Referencia.
<i>NifH</i> fA	<i>Azotobacter vinelandii</i>	5' – GCI WTI TAY GGN AAR GGN GG – 3'	N19- N38	460 pb	Zahkia <i>et al</i> , 2005.
<i>NifH</i> R		5' – GCR TAI ABN GCC ATC ATY TC – 3'	N463- N482		

Tabla 18: *Primers* específicos utilizados para la amplificación del gen *nifH*.

Nombre del primer	Organismo relacionado	Grupo detectado.	Secuencia	Sitio de unión.	Tamaño del fragmento.	Referencia.
Azo-F	<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ -proteobacteria	5' – GAC TCC ACC CGC CTG ATC CT – 3'	N130- N152	567 pb	Navarro- Noya, 2009.
Azo-R			5' – ATG ACC GTG ATC GAA TAC GAT C – 3'	N676- N697		
Clos-F	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Firmicutes	5' – GCT ATT TAY GGA AAR GTT G – 3'	N13- N26	457 pb	
Clos-R			5' – AAT GAT GGC AHT RTA TGC – 3'	N454- 470		
Enter-F	<i>Klebsiella pneumonie</i>	γ -proteobacteria	5' – ACA CCA TTA TGG AGA TGG – 3'	N167– N184	655 pb	
Enter-R			5' – GAT GCC GAA CTC CAT CAG – 3'	N805– N822		
RFZ-F	<i>Azospirillum brasilense</i>	α -proteobacteria/ Actinobacteria	5' – TYG GCA AGT CCA CC – 3'	N41– N57	431 pb	
RFZ-R			5' – GCG CCA TCA TCT CRC CGG A – 3'	N454– N472		

ANEXO V. Protocolo de purificación de productos de PCR.

El protocolo de purificación de productos de PCR con el kit de purificación *Wizard* de PROMEGA es el siguiente:

1. Se agitó el tubo con la reacción de PCR del gen 16S ribosomal de cada muestra.
2. Se agregaron 5 volúmenes de la reacción de PCR en el *Spin Bind*.
3. Se mezcló bien utilizando la micropipeta.
4. Se transfirió la mezcla a la unidad de filtración *Spin Filter*.
5. Se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm.
6. Se removió la canastilla y se descartó el líquido por decantación.
7. Se volvió a colocar la canastilla y se adicionaron 300 µL de buffer *Spin Clean* al filtro.
8. Se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm.
9. Se removió la canastilla y descartó el líquido por decantación.
10. Se volvió a colocar la canastilla y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm.
11. Se transfirió la canastilla con el filtro a un microtubo de 1.5 mL nuevo.
12. Se agregaron 50 µL de buffer de elución (Tris 10 mM) en el centro de la membrana de filtración.
13. Se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm.
14. Se retiró la canastilla del tubo, que contendría el producto de PCR purificado.
15. Se almacenó el producto de PCR a -20°C.

Se visualizaron los productos de PCR puros en un gel de agarosa al 1% (Anexo III) y se cuantificó en el mismo gel haciendo una regla de tres usando como factores para hacer el cálculo el área y la intensidad luminosa de una banda del marcador de tamaño molecular (de concentración conocida) y el área e intensidad luminosa de la banda de la muestra.

ANEXO VI. Análisis bioinformático.

El análisis bioinformático que se realizó consistió en lo siguiente:

1. Se obtuvo el reverso complementario de la secuencia *Rev* y se guardó en formato FASTA.
2. Se realizó un BLAST en las bases de datos de NCBI o RDP para verificar que las dos secuencias de una muestra correspondieran a la misma bacteria.
3. Se descargaron 2 o 3 secuencias de la base de datos de NCBI, con una longitud ≥ 1400 pb, que se parecían a la secuencia problema (con mayor porcentaje de similitud) y que sirvieron de referencia para editar las secuencias.
4. Se colocaron en un documento de texto la secuencia *Fwd*, el reverso complementario de la secuencia *Rev* y las secuencias de referencia, se guardó este documento en formato FASTA.
5. Se realizó un alineamiento de las secuencias del paso anterior con el software *ClustalX*.
6. Se editaron las secuencias con el software *SeaView*, para obtener la secuencia completa del gen 16S rRNA, revisando la calidad de las mismas, tomando en cuenta las regiones de baja calidad y la similitud con las secuencias de referencia.
7. Una vez que se obtuvo la secuencia completa, se eliminaron las secuencias que fueron tomadas como referencia y se guardó el archivo en formato FASTA.
8. Por un lado, se hizo una comparación de cada secuencia obtenida con la base de datos de EZTaxon para identificar a la bacteria a la que pertenece y se creó una tabla de identidad a partir de la información obtenida.
9. Por otro lado, se creó un archivo de texto que contenía todas las secuencias obtenidas y se guardó en formato FASTA.
10. Se abrió el archivo anterior en el software *ClustalX* y se hizo el alineamiento de las secuencias.
11. Se removieron los *gaps* de todas las secuencias con el software *SeaView* y se guardó el archivo en formato FASTA.
12. Se cargó el archivo resultante del paso anterior en la página de *Bellerophon*, utilizando la corrección de Kimura y una ventana de 300 pb, para determinar si alguna de las secuencias era una secuencia quimérica.
13. Se eliminaron del archivo aquellas secuencias que resultaron ser quiméricas.
14. Se creó un nuevo archivo de texto con las secuencias problema y con algunas secuencias obtenidas de la base de datos de EZTaxon y se guardó en formato FASTA.
15. Se abrió el archivo anterior en el software *ClustalX* donde se realizó el alineamiento de las secuencias.
16. El archivo con las secuencias alineadas se abrió en el software *SeaView* donde se eliminarán los *gaps* y los extremos no alineados de las secuencias, para obtener secuencias de la misma longitud.

17. Se analizó este nuevo archivo con el software *JModelTest* para determinar cuál modelo estadístico de sustitución nucleotídica es el que mejor se ajusta a las secuencias analizadas y elaborar el árbol filogenético correspondiente.
18. Se elaboró el árbol filogenético en el software Mega6 con el método de Máxima Verosimilitud, el modelo indicado por *JModelTest* y un análisis de *bootstrap* con 1,000 aleatorizaciones.

ANEXO VII. Cuantificación celular en cultivos.

La cuantificación de las células en cultivo líquido se realizó por espectrofotometría, a partir de un mililitro del cultivo líquido, a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de UFC/mL se calculó con la siguiente fórmula:

$$C = \frac{Abs - 0.094}{1.218 \times 10^{-9}}$$

Dónde **C** es la concentración celular en UFC/mL y **Abs** es la Absorbancia de las muestras.

Una vez que se conoció la concentración de células en el cultivo se preparó una suspensión bacteriana en agua destilada o solución salina 0.9% estériles, con una concentración de 1.6×10^7 UFC/mL utilizando la siguiente fórmula:

$$Vi = \frac{Cf * Vf}{Ci} = \frac{(1.6 \times 10^7 \text{ UFC/mL}) Vf}{Ci}$$

Dónde **Vi** es el volumen inicial, es decir el volumen de cultivo bacteriano requerido, **Cf** es la concentración final de la suspensión bacteriana, **Vf** es el volumen final de la suspensión bacteriana y **Ci** es la concentración inicial del cultivo bacteriano calculada con la fórmula anterior.

ANEXO VIII. Solubilización de fosfato.

Para activar las células bacterianas se sembraron 100 µL del cultivo criopreservado de cada bacteria en 5 mL de medio TY y se incubaron a 30°C con agitación orbital a 220 rpm durante 24 h. Posteriormente, se cuantificó el número de Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC/mL) por espectrofotometría y se preparó una suspensión bacteriana con una concentración de 1.6×10^7 UFC/mL (Anexo VII).

Prueba cualitativa.

Se sembraron 20 µL de la suspensión bacteriana al centro de una caja con medio NBRIP que se incubó a 28°C por 120 h (Álvarez *et al.*, 2014). Se midieron halos de solubilización en las cajas que lo contenían a las 72 h y a las 120 h de incubación; con esto se clasificaron las bacterias como solubilizadoras tempranas (formación del halo a las 72 h), solubilizadoras tardías (formación del halo a las 120 h) y no solubilizadoras (no formaron halo).

Se calculó el índice de solubilización (IS) con la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{\text{Diametro del halo (mm)}}{\text{Diametro de la colonia (mm)}}$$

La capacidad de solubilización se categorizó en tres niveles: baja ($IS < 2$), media (IS entre 2 y 4) o alta ($IS > 4$) como lo describieron Angulo y colaboradores, en 2014, basándose en la técnica de Marra y colaboradores en 2011.

Prueba cuantitativa.

Se realizó la cuantificación de fosfato soluble producido por las bacterias en medio NBRIP líquido a partir de la técnica de fosfomolibdato (Murphy y Riley, 1962), de la siguiente manera:

1. Se preparó el inóculo bacteriano sembrando 1 mL del cultivo en medio TY, en tubos que contenían 10 mL de medio NBRIP; se incubaron a 28°C con agitación orbital a 220 rpm, durante 120 h.
2. Pasado el tiempo de incubación, se hizo la cuantificación de células del inóculo y se ajustó la concentración a 1.6×10^7 UFC/mL con solución salina 0.9% (Anexo VII).
3. Se prepararon matraces con 29 mL de medio NBRIP, sin colorante ni indicador de pH, que fueron inoculados con 1 mL de la suspensión de células bacterianas antes preparada. El volumen final en cada matraz fue de 30 mL.
4. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación orbital a 220 rpm, durante 120 h.
5. La cuantificación de fosfato soluble se hizo a partir de 12.5 mL de cada cultivo, que se centrifugaron durante 10 minutos a 14,000 rpm; los sobrenadantes se filtraron con papel filtro Whatman número 4 y se transfirieron a tubos de ensayo de vidrio con capacidad para 10 mL.

6. Se les agregaron 2 mL del reactivo de molibdato/ácido ascórbico (Anexo I), guardando una proporción de 5:1; las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 50 minutos y posteriormente se determinó su absorbancia a 880 nm.

Para conocer la concentración de fosfato soluble de las muestras en estudio, se realizó una curva patrón a partir de una solución stock de fosfato (50 mg(P-PO₄)/L, en agua; Anexo I); las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 18. Se graficó la curva patrón y se hizo la respectiva regresión con las absorbancias de las muestras para conocer la concentración de P-PO₄ contenida en las mismas.

ANEXO IX. Producción de IAA.

Se sembraron 100 μL del cultivo criopreservado de cada bacteria en 5 mL de medio TY y se incubaron a 30°C con agitación orbital a 220 rpm, durante 24 h, para activar las células bacterianas.

Posteriormente, se preparó el inóculo bacteriano sembrando 1 mL del cultivo en medio TY en tubos que contenían 10 mL de medio Burk (Anexo I; Lara, 2014); se incubaron a 28°C con agitación orbital a 220 rpm, durante 120 h. Pasado el tiempo de incubación, se hizo la cuantificación de células del inóculo (Anexo VII).

En matraces de 125 mL (con medio Burk suplementado con 5mL de triptófano) se agregó el volumen necesario de inóculo para obtener una concentración celular final de 1.6×10^7 UFC/mL, obteniendo un volumen final de 30 mL en cada matraz. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación orbital a 220 rpm, durante 144 h, en ausencia de luz.

Pasado el tiempo de incubación, se hizo la cuantificación de IAA producido a partir de 1 mL de cada cultivo, mismo que se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm; los sobrenadantes se transfirieron a tubos de ensayo de vidrio con capacidad para 10 mL y se les agregó 1 mL del reactivo de Salkowski (Anexo I), guardando una proporción de 1:1 (Rives *et al.*, 2009). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad, posteriormente se determinó su absorbancia a 530 nm (Angulo *et al.*, 2014).

Para conocer la cantidad de IAA producido por cada bacteria se realizó una curva patrón, a partir de una solución stock con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de IAA, en etanol (Tabla 19); se graficó la curva patrón y se hizo la respectiva regresión con las absorbancias de las muestras.

Tabla 19: Soluciones de la curva patrón para la producción de IAA.		
IAA (μg)	IAA (μL)	H₂O (μL)
0	0	1000
2	20	980
4	40	960
6	60	940
8	80	920
10	100	900
15	150	850
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400
80	800	200
100	1000	0

ANEXO X. Biocontrol de fitopatógenos.

La evaluación de la capacidad de las bacterias para ejercer control sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos se realizó de la siguiente manera:

1. Se preparó una suspensión de esporas del hongo fitopatógeno con una concentración de 1.6×10^7 esporas/mL. La cuantificación de esporas se realizó por conteo en cámara de Neubauer. El ajuste de la concentración se realizó utilizando la fórmula que se muestra en el Anexo VII.
2. Se sembraron 20 μ L de la suspensión de esporas del hongo en el centro de una caja Petri con medio PDA (Agar Papa-Dextrosa. Anexo I) (Wahyudi *et al.*, 2011).
3. Se sembró la bacteria por estría a 3 cm de distancia del hongo, en uno de los extremos de la caja, como se indica en la Figura 30-A (Wahyudi *et al.*, 2011).

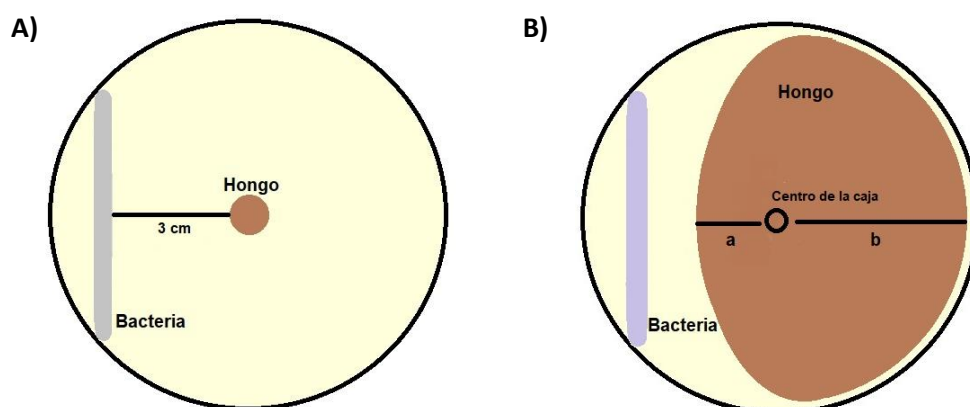


Figura 30: Representación esquemática del cultivo de un hongo y una bacteria para evaluar su relación antagonista. A) Siembra simultánea del hongo y la bacteria en estudio. B) Interacción antagonista esperada entre el hongo y la bacteria; a y b son las distancias medidas para calcular el porcentaje de inhibición.

4. Las cajas se incubaron de 4 a 7 días a temperatura ambiente. La barrera entre el crecimiento bacteriano y el hongo indicó la interacción antagonista entre ellos (Wahyudi *et al.*, 2011).
5. Se calculó el porcentaje de inhibición a partir de la siguiente fórmula:

$$\%I = \left(1 - \left(\frac{a}{b}\right)\right) \times 100$$

Dónde %I es el porcentaje de inhibición, **a** es la distancia entre el hongo al centro de la caja y la estría bacteriana y **b** es la distancia entre el hongo al centro de la caja y el extremo donde no hay crecimiento bacteriano como se muestra en la figura 29-B.

ANEXO XI. Caracterización bioquímica.

Una galería API 20NE consta de un fondo y una tapa que forman una cámara de incubación de la galería, la galería misma y una ampolla con medio auxiliar, que es utilizado para inocular las pruebas de asimilación. La preparación de la galería consistió en lo siguiente:

1. Se colocaron 5 mL de agua destilada estéril en el fondo de la cámara de incubación procurando rellenar todos los alveolos del fondo.
2. Se sacó la galería de su empaque individual y se colocó sobre el fondo.
3. Se inocularon los tubos (y no las cúpulas) de los ensayos enzimáticos (de NO₃ hasta PNPG) con una suspensión bacteriana (1.6×10^7 UFC/mL) en solución salina 0.85% (Anexo VII), evitando la formación de burbujas y sin tocar la cúpula del tubo.
4. Las cúpulas de las pruebas GLU, ADH y UREA se rellenaron con parafina para crear anaerobiosis, condición necesaria para la realización de estas actividades enzimáticas.
5. Se inoculó la ampolla con medio auxiliar con 200 µL de la suspensión bacteriana y se homogeneizó evitando la formación de burbujas.
6. Se inocularon los tubos correspondientes a los ensayos de asimilación con la preparación anterior, rellenando en su totalidad los tubos y las cúpulas.
7. Se colocó la tapa a la cámara y se dejó en incubación a $29^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h.
8. Pasadas las 24 h, se colocaron una gota de reactivo NIT 1 y otra de NIT 2 en el tubo de la prueba NO₃; pasados cinco minutos, si la prueba resultó negativa, se agregó una pizca de zinc.
9. También se agregó al tubo de la prueba TRP, una gota de reactivo JAMES.
10. Se retiró por aspiración el contenido de las pruebas NO₃ y TRP, se rellenaron los tubos con aceite de parafina y se dejó en incubación por 24 h más.
11. Se realizaron lecturas a las 24 h y a las 48 h después de la inoculación de la galería. Las pruebas NO₃, TRP y GLU solo se leen a las 24 h después de la inoculación.

En la Figura 31 se ejemplifica la forma en la que se deben ver los resultados si salen negativos y/o positivos.

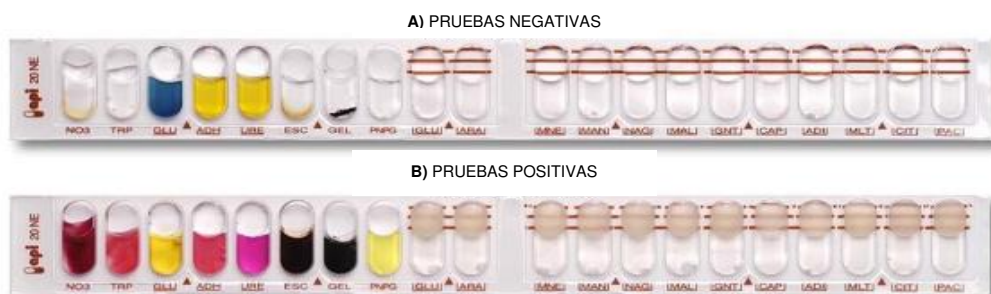


Figura 31: Forma en que se observan los resultados de las pruebas de la galería API 20NE. A) Pruebas negativas. B) Pruebas positivas. Apiweb® BioMérieux. 2010.

ARTÍCULO.

Caracterización molecular de una colección de bacterias rizosféricas asociadas a *Echinocactus platyacanthus* silvestres y cultivadas.

Leilani Itzel Salinas Virgen¹

María Eugenia de la Torre Hernández^{1*}

José Félix Aguirre Garrido²

Hugo César Ramírez Saad¹

(1) Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960, CDMX, México (lisv.nani@gmail.com; hurasa@correo.xoc.uam.mx).

(2) Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Av. Hidalgo Pte. 46, Col. Lerma de Villada, 52006, Edo. de Mex., México (j.aguirre@correo.ler.uam.mx).

*** Autor para correspondencia: mdelatorre@correo.xoc.uam.mx**

Resumen

La biznaga dulce (*Echinocactus platyacanthus*), cactácea endémica de México, se caracteriza por su lento crecimiento y baja tasa de reproducción, que, junto a una alta presión de recolección, ponen en riesgo a esta. Dado que el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a cactáceas es escaso, actualmente se desconoce que bacterias cultivables están presentes en la rizosfera de las biznagas dulces, que crecen en la naturaleza y se cultivan en viveros. Se recolectó material rizosférico de biznagas silvestres y cultivadas, más suelo no rizosférico para este estudio. Se aisló un total de 268 morfotipos y se agruparon en 41 ribotipos diferentes, a través de un Análisis de Restricción Enzimática. Las bacterias que representan cada ribotipo se identificaron en base a la secuenciación del gen 16S rRNA. La fracción cultivable de la comunidad bacteriana asociada con *E. platyacanthus* está compuesta principalmente por miembros de los géneros *Bacillus* (21 cepas), *Pseudomonas* (6 cepas), *Stenotrophomonas* (4 cepas), *Paenibacillus* (2 cepas), *Brevibacterium*, *Staphylococcus* y *Cutibacterium* (1 cepa, cada una), siendo *Bacillus* el género predominante. Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido reportados previamente por llevar a cabo actividades beneficiosas para las plantas a las que están asociados.

Palabras clave: *Echinocactus platyacanthus*, rizósfera, filogenia.

Abstract

The sweet biznaga (*Echinocactus platyacanthus*) a Mexican endemic cactus, is characterized by its slow growth and low reproduction rate, which, coupled with a high collection pressure, place this species at risk. The study of bacterial communities associated with cacti is scarce, currently it is unknown which cultivable bacteria are present in the rhizosphere of the sweet biznagas, growing in the wild and cultivated in nurseries. Rhizospheric material from wild and cultivated biznagas, plus non-rhizospheric soil were collected for this study. A total of 268 morphotypes were isolated and grouped into 41 different ribotypes, through Enzyme Restriction Analysis. Bacteria representing each ribotype were identified based on 16S rRNA gene sequencing. The cultivable fraction of the bacterial community associated with *E. platyacanthus* is mainly composed by members of the genera *Bacillus* (21 strains), *Pseudomonas* (6 strains), *Stenotrophomonas* (4 strains), *Paenibacillus* (2 strains),

Brevibacterium, *Staphylococcus* and *Cutibacterium* (1 strain, each), with *Bacillus* being the predominant genus. The genera *Bacillus* and *Pseudomonas* have been previously reported for carrying out beneficial activities for plants to which they are associated.

Keywords: *Echinocactus platyacanthus*, rhizosphere, phylogeny.

Introducción

En las zonas áridas y semi-áridas, que constituyen alrededor del 60% del territorio mexicano (CONAZA, 2019), habita un gran número de especies vegetales pertenecientes a la familia Cactaceae, uno de los grupos más representativos de la diversidad biológica mexicana, provocando que México sea considerado el principal centro de diversidad cactológica de América y el mundo (Hernández-Oria *et al.*, 2007). Una de las regiones donde se encuentra ampliamente representada esta diversidad, es el cuadrante de Toluquán, localizado en el semidesierto de Querétaro, extremo sur del desierto de Chihuahua. Ahí es posible encontrar 55 especies de cactáceas, 13 endémicas y 17 en alguna categoría de riesgo a su supervivencia (Hernández, 2007).

Las cactáceas, en general, son ampliamente utilizadas por las comunidades humanas como material de construcción, alimento humano y de ganado, así como para usos medicinales y ornamentales (Meza-Nivón, 2011), provocando el consumo desmedido y la extracción directa de ejemplares de su hábitat. Estos factores, aunados al alto endemismo, especificidad ambiental de sus poblaciones, el lento crecimiento y ciclos de vida largos (Álvarez *et al.*, 2004), hacen que sus poblaciones se recuperen muy lentamente de los disturbios poblacionales ocasionados de manera natural o como consecuencia de la actividad humana (Arias *et al.*, 2005), generando la condición de riesgo de extinción que presentan un gran número de ellas.

Echinocactus platyacanthus, también conocida como “biznaga dulce”, es una cactácea de cuerpo globular, endémica de México que se distribuye en los estados de Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (González-Medrano, 2012); actualmente está en condición de riesgo puesto que tiene alta demanda de ejemplares para consumo humano (con ella se elabora el tradicional dulce de acitrón).

Está considerada en el Apéndice II de la Convención sobre Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES, por sus siglas en inglés), por la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría “sujeta a protección especial” (Denisse, 2010) y, por la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), en la categoría “casi amenazada” (Castañeda-Romero *et al.*, 2016).

El estudio de las comunidades microbianas asociadas a cactáceas es un campo relativamente poco explorado. Algunos antecedentes a este respecto son: el análisis de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de cactáceas endémicas de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012, Torres-Cortés *et al.*, 2012); el estudio de la fracción cultivable de bacterias asociadas a cactáceas de la región de Caatinga, que pudieran ser tolerantes a la sequía, para ser utilizadas en la recuperación de suelos desérticos (Kavamura, 2012); y el empleo de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de *Coryphantha radians* y *Mammillaria magnimamma* para promover el crecimiento de *Mammillaria zeilmanniana* (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

Actualmente se desconoce la comunidad bacteriana asociada a la rizósfera de biznaga dulce, por lo que resulta interesante conocer qué microorganismos son capaces de asociarse con *E. platyacanthus*, siendo de particular interés aquellos que representen un beneficio para su desarrollo. Para tener una mejor representación de las bacterias asociadas a la biznaga dulce, es necesario el análisis de muestras de rizósfera de diferentes procedencias como suelo rizosférico silvestre, suelo no rizosférico silvestre y suelo de vivero, ya que existen variaciones nutricionales en cada uno de ellos que promueven la proliferación de diferentes microorganismos.

Con el propósito de conocer la composición de la comunidad de bacterias cultivable presente en la rizosfera de la biznaga dulce de la zona del semidesierto queretano, se creó una colección de bacterias aisladas de la rizosfera de *Echinocactus platyacanthus*, tanto silvestres como cultivadas. Los aislados fueron caracterizados bajo criterios moleculares, agrupados mediante ensayos de restricción enzimática de amplicones del gen 16S rRNA, y posteriormente identificados por secuenciación del mismo gen.

Material y métodos.

Obtención del material biológico.

En 2017, se realizó un muestreo no invasivo del material rizosférico de 20 biznagas en una población silvestre de Tolimán, Querétaro. Adicionalmente, se colectaron muestras de la rizósfera de 2 plantas cultivadas en vivero y de suelo no rizosférico (tomadas de suelo silvestre, libre de la presencia de cualquier planta), con la finalidad de tener representada toda la comunidad bacteriana asociada o cercana a la biznaga, la cual se ve influenciada por las variaciones nutricionales de los diferentes tipos de suelo.

Las muestras se guardaron en bolsas herméticas, rotuladas con el origen de la planta de la que fueron tomadas y se trasladaron en una hielera al laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco, para su procesamiento tres días después de su recolección.

Cuentas viables y aislamiento.

Se prepararon mezclas de suelo provenientes de las muestras de un mismo origen (silvestres, vivero o suelo no rizosférico). Se prepararon soluciones 1:10 de cada pool con 1 gramo de cada uno y 9 mL de solución salina (NaCl 0.9%) y; a partir de ellas, se hicieron diluciones seriadas y con estas soluciones se realizó el conteo de UFC por el método de extensión en placa (Bonilla *et al.*, 2016) en medio de cultivo para heterótrofos TY (triptona 5 g L⁻¹, extracto de levadura 3 g L⁻¹, CaCl₂ 1 g L⁻¹, pH7, agar 1.2%). Una vez realizadas las cuentas viables, de las mismas cajas se aislaron bacterias con morfotipos coloniales diferentes. La morfología celular de cada aislado y su afinidad a los colorantes de Gram se determinaron por esta técnica de tinción (Gram, 1884).

Obtención del material genético.

Se obtuvo DNA genómico de todos los aislados para su posterior caracterización, para lo cual se utilizó el kit de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche (Cat.# 11 796 828 001), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se amplificó por PCR el gen 16S ribosomal con los primers 8F y 1492R; el producto obtenido se purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up Systema de Promega (Cat. A9281), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tanto la integridad del DNA genómico, como el tamaño de los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹), conforme a un reporte previo (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012),

Agrupamiento por REA.

Para el Análisis de Restricción Enzimática (REA por sus siglas en inglés), se utilizaron las enzimas de restricción *Hae*III (GG/CC) y *Msp*I (C/CGG), bajo las condiciones descritas por Kowalchuk *et al.*, (2004). Las reacciones de restricción se analizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹). A partir de los patrones de restricción obtenidos se hizo el agrupamiento de la colección de bacterias rizosféricas.

Análisis filogenético.

Representantes de cada uno de los patrones de restricción (ribotipos) obtenidos fueron sometidos a análisis filogenético. Bajo las mismas condiciones de amplificación y purificación descritas arriba, se obtuvieron los amplicones para ser sometidos a secuenciación tipo Sanger, en la empresa MacroGen (Corea). A partir de estas secuencias se realizaron análisis bioinformáticos con los softwares y plataformas: *BioEdit* (Hall, 1999), *ClustalX* (Thompson *et al.*, 1997), *SeaView* (Galtier *et al.*, 1996; Gouy *et al.*, 2010), *JModelTest* (Darriba *et al.*, 2012), *Mega6* (Tamura *et al.*, 2013), *Bellerophon* (Huber, *et al.*, 2004) y *EZTaxon* (Yoon *et al.*, 2017), para la identificación taxonómica de las bacterias y el establecimiento de sus relaciones filogenéticas (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012).

Resultados y discusión.

Cuentas viables y Aislamiento bacteriano.

Las cuentas viables del material rizosférico, de plantas silvestres y de vivero; así como de suelo no rizosférico, se muestran en el Cuadro 1. Las muestras de *E. platyacanthus* silvestres y las de suelo no rizosférico dieron valores de UFC muy altos, que se encuentran por encima de los conteos previamente reportados para muestras de rizósfera de otras cactáceas (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). En adición, los valores de estos dos grupos de muestras, son cuatro órdenes de magnitud más altos que las muestras de vivero, sin embargo, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de muestras.

Cuadro 1: Conteo de UFC de bacterias aisladas a partir de las diferentes muestras.

Muestra	UFC/g de rizósfera	Desviación estándar
Silvestres	4.27E+10	6.25E+10
Vivero	1.06E+06	5.12E+05
No rizosférico	7.23E+10	5.13E+09

Se aislaron en total 268 cepas bacterianas; 261 de material rizosférico y 7 de suelo no rizosférico. De la colección total; 201 cepas fueron agrupadas en 41 ribotipos obtenidos por REA, los que fueron nombrados P1 a P41 (Cuadro 2). Las 67 cepas restantes no rindieron patrones de restricción fiables que permitieran ubicarlas en alguno de los ribotipos obtenidos, por lo que quedaron excluidas del análisis.

Cuadro 2: Número total de aislados de la rizósfera de *E. platyacanthus* y su agrupamiento por REA.

Patrón de restricción	Número de aislados	Origen de los aislados*			Patrón de restricción	Número de aislados	Origen de los aislados*		
		C	S	Nr			C	S	nr
P1	42		42		P22	3	2	1	
P2	47	6	41		P23	1	1		
P3	4	4			P24	4	1	3	
P4	4	4			P25	1		3	
P5	4	2	1		P26	8	1	5	2
P6	1	1			P27	1	1		
P7	5	4	1		P28	2	2		

P8	2	2		P29	1	1	
P9	4	1	3	P30	10	7	3
P10	1	1		P31	1	1	
P11	2	2		P32	1	1	
P12	4	2	2	P33	1	1	
P13	2	1	1	P34	3	3	
P14	4	1	3	P35	1	1	
P15	1	2		P36	1	1	
P16	1		1	P37	4	4	
P17	1		1	P38	5	5	
P18	15		13	P39	2	2	
P19	3		3	P40	1	1	
P20	1	1		P41	1	1	
P21	1	1					

*C=Cultivadas; S=Silvestres; nr=no rizosféricas.

Las cepas agrupadas en los ribotipos P1, P16, P17, P18, P19, P25, P30, P31, P32, P33, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40 y P41 se encuentran sólo en las muestras silvestres. Mientras que las cepas de los ribotipos P3, P4, P6, P10, P11, P15, P20, P21, P23, P27, P28 y P29 se aislaron de las muestras de vivero; las cepas agrupadas en el resto de los ribotipos (P2, P5, P7, P8, P9, P12, P13, P14, P22, P24 y P26) se encontraron en ambos tipos de muestras, en el caso de los patrones P2 y P26 el mayor número de aislados provienen de las muestras silvestres. Los aislados de las muestras de suelo no rizosférico se agruparon en los ribotipos P18, P26 y P30, mismos que comparte con las muestras silvestres.

Identificación y Análisis filogenético.

Para establecer la identidad y las relaciones filogenéticas de la colección, se seleccionó un representante de cada ribotipo, excepto para el caso de los ribotipos P1, P2, P18 y P26 que tienen mayor número de aislados. En estos casos se seleccionaron 2 cepas, a fin de corroborar mediante secuenciación del gen 16S rRNA, que nuestra forma de agrupamiento por REA era adecuada.

Las dos secuencias del gen 16SrRNA obtenidas para cada aislado fueron ensambladas, de esta forma se obtuvieron secuencias casi completas de dicho gen (>1350 nt); las secuencias ensambladas fueron analizadas en *Bellerophone* (Huber *et. al.*, 2004), para descartar la formación de quimeras. Posteriormente, se trabajaron en la plataforma EZTaxon (Chun *et. al.*, 2007), que permite realizar una identificación taxonómica precisa ya que posee un algoritmo de comparación robusto y sólo incluye secuencias del gen 16S rRNA pertenecientes a cepas tipo. Las secuencias P10, P17, P19, P20, P21, P24, P27, P30 y P33 resultaron con porcentajes de cobertura (exhaustividad) menores al 95%, por lo que se consideraron de baja calidad (Kim *et. al.*, 2012), y fueron excluidas del análisis filogenético. De las 32 secuencias restantes, 10 fueron identificadas a nivel taxonómico de género, con un porcentaje de similitud mayor al 95% (Bou *et. al.*, 2011), y 22 a nivel de especie, con un porcentaje de similitud mayor al 98.7% (Kim *et. al.*, 2014), como se muestra en el Cuadro 3. En los cuatro casos que seleccionamos dos cepas por ribotipo, ambos aislados de cada patrón produjeron resultados similares.

Cuadro 3: Identificación bacteriana de acuerdo con la base de datos de EZTaxon.

Cepa	Identificación	Secuencia más cercana (número de acceso)	Cobertura (%)	Similitud (%)
P1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)	99.52	99.7
P2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	100
P3	<i>Paenibacillus lautus</i>	<i>Paenibacillus lautus</i> (D78473)	95.8	99.42
P4	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus aryabhattai</i> (EF114313)	100	95.23
P5	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus harenae</i> (AY839867)	100	96.22
P6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	99.55	100
P7	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	99.65
P8	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (AM747813)	100	95.77
P9	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)	95.4	99.14
P11	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (AF041361)	96.2	96.85
P12	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> (CP007597)	99.2	100
P13	<i>Bacillus siamensis</i>	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	100	99.55
P14	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	99.86
P15	<i>Bacillus aryabhattai</i>	<i>Bacillus aryabhattai</i> (EF114313)	100	99.65
P16	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i> (AUPB01000004)	100	98.65
P18	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)	97.4	99.7
P22	<i>Cutibacterium</i>	<i>Cutibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	100	97.89
P23	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	99.57
P25	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i> (LOB01000053)	100	97.57
P26	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)	95.4	99.56
P28	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)	95.4	97.98
P29	<i>Bacillus tequilensis</i>	<i>Bacillus tequilensis</i> (AYTO01000043)	100	99.51
P31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JALV01000036)	100	99.57
P32	<i>Pseudomonas granadensis</i>	<i>Pseudomonas granadensis</i> (LT629778)	100	99.08
P34	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)	95.4	98.72
P35	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	98.13
P36	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JALV01000036)	100	95.17
P37	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	99.93
P38	<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i> (AY603658)	95.4	99.36
P39	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> (AMXN01000021)	100	99.3
P40	<i>Bacillus paramycoides</i>	<i>Bacillus paramycoides</i> (MAOI01000012)	100	99.66
P41	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas geniculata</i> (AB021404)	97.1	98.45

Las relaciones filogenéticas de los representantes de nuestra colección y las cepas tipo de cada género o especie asignados, se muestran en la Figura 1.

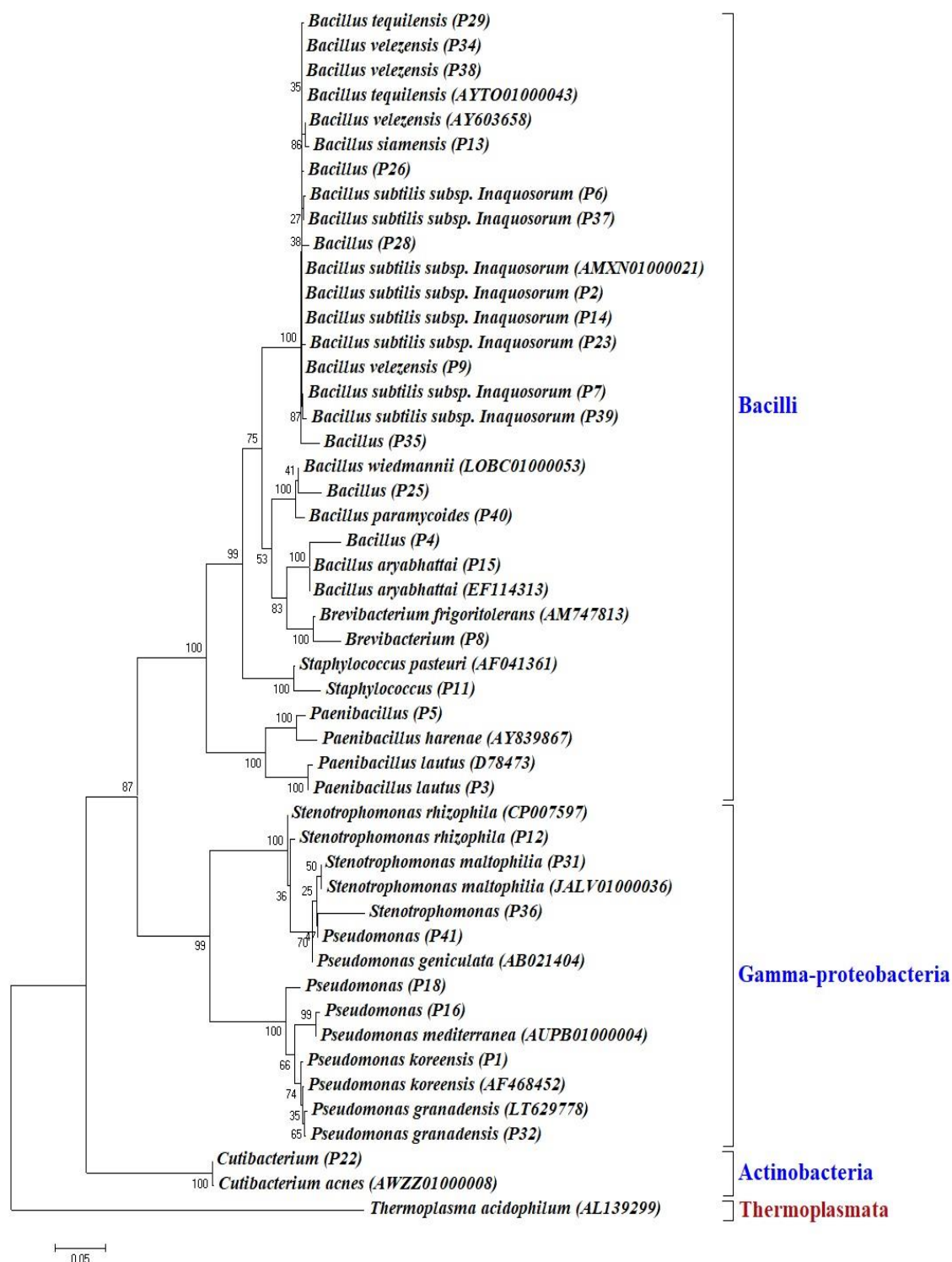


Figura 1. Árbol filogenético de las bacterias en estudio. Construido con el método de Máxima Verosimilitud, modelo sustitución de Jukes-Cantor, enraizado con *Thermoplasma acidophilum* y análisis de Bootstrap con 1000 réplicas aleatorizadas, se muestra el valor de Bootstrap en cada nodo.

Con estos resultados fue posible observar que las cepas identificadas fueron asignadas principalmente a los géneros *Bacillus* (21 cepas) y *Pseudomonas* (6 cepas), aunque también se encontraron otros géneros como *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium* y *Stenotrophomonas*, pero de forma menos abundante. Esto concuerda con hallazgos previos, en donde se reportó que *Bacillus* y *Pseudomonas* son los géneros predominantes en la rizosfera de las cactáceas: *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *Mammillaria fraileana* y *Opuntia cholla* (Bashan y de-Bashan, 2010). Además, se han aislado representantes del género *Bacillus* de las rizósferas de *Mammillaria* spp. y *Coryphanta radians*, nativas del semidesierto de Querétaro (Chávez-Ambríz, 2016). También se han encontrado estos géneros bacterianos asociados a las rizósferas de *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, tres cactáceas nativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Aguirre *et al.*, 2012).

Conclusiones.

La comunidad de bacterias rizosféricas cultivables asociada a *E. platyacanthus* silvestres es más diversa que la de plantas cultivadas, al presentar mayor número de ribotipos (géneros o especies), aunque la estructura de la comunidad es menos homogénea ya que sólo dos patrones; P1 y P2 (*Pseudomonas koorensis* y *Bacillus subtilis*, respectivamente) poseen el 54.6% de los aislados. Mientras que la comunidad de bacterias cultivables asociada a las plantas cultivadas posee solo 23 géneros, pero las abundancias relativas de cada uno son más homogéneas, variando entre 2.3 y 13.6%.

De las bacterias representantes de los 41 ribotipos obtenidos por REA fue posible identificar taxonómicamente 32 cepas; 13 fueron identificadas a nivel de género y el 19 a nivel de especie.

La fracción cultivable de la comunidad bacteriana asociada a la biznaga dulce está conformada principalmente por miembros de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium* y *Stenotrophomonas*.

El género predominante en la rizósfera de *E. platyacanthus* es *Bacillus*, ya que 19 de las cepas caracterizadas por técnicas moleculares pertenecen a este género.

Perspectivas.

Existen reportes de bacterias pertenecientes a los géneros encontrados, principalmente *Bacillus* (Zhao *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016; Pin *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017) y *Pseudomonas* (Reetha *et al.*, 2014; Kamble y Galerao, 2015; Abed *et al.*, 2016; Buono y Ulla, 2016; Li *et al.*, 2017), que demuestran que son capaces de establecer relaciones benéficas para las plantas, ya que están clasificadas dentro del grupo de las PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Por esta razón se debe continuar con estudios de caracterización microbiológica de la colección de bacterias asociadas a la biznaga dulce, enfocándose en aquéllos aislados que puedan presentar uno o más mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

Literatura citada.

- Abed, H., Rouag, N., Mouatassem, D., & Rouabhi, A. (2016). Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. *Eurasian Journal of Soil Science*, 5(3), 166-182. <https://doi.org/10.18393/ejss.2016.3.182-191>
- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F. & Ramírez-Saad, H. C. 2012. Bacterial community structure

- in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 891-904. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9705-3>
- Álvarez, R.; Godínez, H.; Guzmán, U. y Dávila, P. 2004. Aspectos ecológicos de dos cactáceas mexicanas amenazadas: implicaciones para su conservación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75, 7-16.
- Arias, S.; Guzmán, U.; Mandujano, M. C.; Galván, M. S. y Golubov, J. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México), La lista Roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 50, 100-125.
- Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2010). Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. In *Soil biology and agriculture in the tropics* (pp. 109-137). Springer Berlín Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_6
- Bonilla, M., Pajares, S., Vigueras, G., Sigala, J. C., & Le Borgne, S. (2016). Manual de prácticas de microbiología básica. Ingeniería biológica. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Cuajimalpa. ISBN: 978-607-28-0975-8.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Buono, N. I., & Ulla, E. L. (2016). Efectos de la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato en tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) en condiciones controladas. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 36(2), 45-54. ISSN 2314-369X
- Castañeda-Romero M.; Luna-Contreras, M.; Vela-Godínez, D.; Montoya-Santiago, G.; González-Bermúdez, A.; Peña-Martínez, R. y Esperón-Rodríguez, M. 2016. Nota sobre la estructura poblacional de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) en la reserva de la biósfera “Barranca de Metztitlán”, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*, 115, 65-73. ISSN 2448-7589
- Chávez-Ambríz, L. A.; Hernández-Morales, A.; Cabrera-Luna, J. A.; Luna-Martínez, L. y Pacheco-Aguilar, J. R. 2016. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48, 333-341. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., & Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2259-2261. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64915-0>
- CONAZA, 2019. <https://www.gob.mx/conaza/prensa/priorizaran-atencion-a-comunidades-de-extrema-marginacion-de-las-zonas-aridas-y-en-proceso-de-desertificacion-198461>
- Darriba D, Taboada GI, Doallo R And Posada D. 2012. "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Denisse, S. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*, 12:543-548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>
- Gao, L., Kong, F., Feng, C., Wang, J., Gao, J., Shen, G., & Zhang, C. (2016). Isolation, characterization, and growth promotion of phosphate-solubilizing bacteria associated with *Nicotiana tabacum* (tobacco). *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(3), 993-1003. <https://doi.org/10.15244/pjoes/61820>
- González Medrano, F. 2012. Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación., México, D. F., Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales - Instituto Nacional de Ecología. ISBN 607790869X

- Gouy, M. Guindon, S. & Gascuel, O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27(2):221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Hernández, J. G.; Chávez, R. J. y Sánchez E. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto Queretano. *Biodiversitas*, 70, 6-9.
- Hernández-Oria, J. G.; Chávez-Martínez, R. y Sánchez-Martínez, E. 2007. Factores de riesgo en las Cactáceas amenazadas de una región semiárida en el sur del desierto chihuahuense, México. *Interciencia*, 32, 728-734.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series* 41:95-98.
- Huber, T.; Faulkner, G. y Hugenholtz, P. 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments, *Bioinformatics* 20, 2317-2319. <http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>
- Kamble, K. D., & Galerao, D. K. (2015). Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *International Journal of Advances of Pharmacy, Biology and Chemistry*, 4(1), 2277-4688. ISSN: 2277 - 4688
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., Da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani, R. G, Andreote, F. D. & De Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Kim, O. S.; Cho, Y. J.; Lee, K.; Yoon, S. H.; Kim, M.; Na, H.; Park, S. C.; Jeon, Y. S.; Lee, J. H.; Yi, H.; Won, S. y Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(3), 716-721. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>
- Kim, M.; Oh, H. S.; Park, S. C. y Chun, J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(2), 346-351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>
- Kowalchuk, G. A., de Bruijn, F., Akkermans, A. D., Head, I. M., & Van Elsas, J. D. (Eds.). 2004. *Molecular microbial ecology manual* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Li, H. B., Singh, R. K., Singh, P., Song, Q. Q., Xing, Y. X., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2017). Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01268>
- Liu, M., Liu, X., Cheng, B. S., Ma, X. L., Lyu, X. T., Zhao, X. F., Ju., Y. L., Min, Z. & Fang, Y. L. (2017). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(4), 1106. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016144-9714>
- Meza-Nivón, M. V. 2011. Segundo informe referente a la realización de la asesoría número INE/ADA - 026/2011 denominada “cactáceas mexicanas: usos y amenazas”. Instituto Nacional de Ecología.
- Pin Viso, N. D., Sautua, F., Scandiani, M. M., Luque, A., Simonetti, E., & Carmona, M. A. (2016). In vitro antagonistic activity of native bacteria isolated from soils of the Argentine Pampas against *Fusarium tucumaniae* and *Fusarium virguliforme*; *Academic Journals; African Journal Of Microbiology Research*; 10; 27; 7-2016; 1031-1035. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.7915>
- Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P., & Mycin, T. R. (2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and

- enhance growth of onion (*Allium cepa* L.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(2), 568-574. ISSN 2319-7692
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., And Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution:30 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. And Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25:4876-4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Torres-Cortés, G., Millán, V., Fernández-González, A. J., Aguirre-Garrido, J. F., Ramírez-Saad, H. C., Fernández-López, M., Toro, N. & Martínez-Abarca, F. (2012). Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. Plant and Soil, 357, 275-288. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1152-4>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. And Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. <http://doi.org/67:1613-1617>. 10.1099/ijsem.0.001755
- Zhang, J., Wang, P., Fang, L., Zhang, Q. A., Yan, C., & Chen, J. (2017). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. Polish Journal of Microbiology, 66(1), 57-65.
- Zhao, L., Xu, Y., Lai, X. H., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. Brazilian Journal of Microbiology, 46(4), 977-989. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140024>

Enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.

Fecha: Wed, 4 Sep 2019 02:18:25 +0000  Todos los encabezados

Remitente: Dra. Dora M. Sangerman-Jarquín <cienciasagricolas@inifap.gob.mx>   

Destinatario: María Eugenia de la Torre Hernández <mdelatorre@correo.xoc.uam.mx>

Asunto: [Remexca] Acuse de recibo del envío  Todos los archivos adjuntos

María Eugenia de la Torre Hernández:

Gracias por enviar el manuscrito "Caracterización molecular de una colección de bacterias rizosféricas asociadas a *Echinocactus platyacanthus* silvestres y cultivadas" a Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito: <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/ingresar>

Nombre de usuario/a: mdelatorre

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su trabajo.

Dra. Dora M. Sangerman-Jarquín

Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

<https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Otorga la presente

a: Salinas Virgen Leinali Itzel

Constancia

Educación Continua

ECCBS

Por participar como Asistente del *Curso Desarrollo Sostenible*,
realizado en esta Universidad con duración de 15 horas del 7 al
11 de noviembre del 2016.


Mtro. Rafael Díaz García
Director
División CBS


Dra. Laura Rodríguez Cardozo
Coordinadora del Curso

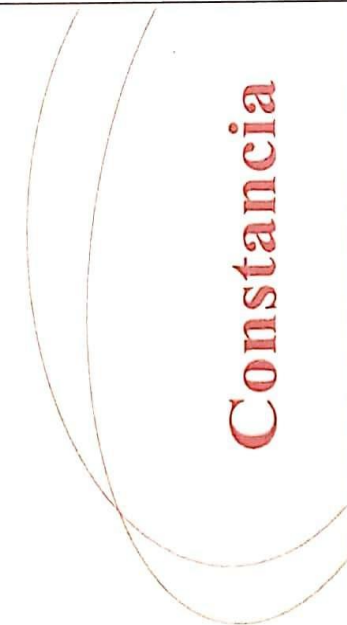




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO



Constancia

Educación Continua

ECCBS

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Otorga la presente

a: Leilani Itzel Salinas Virgen

Por participar como Asistente en el Curso: "**Herramientas Bioinformáticas para el análisis de datos genéticos**",
realizado en esta Universidad del 24 al 28 de abril del 2017 con
duración de 20 horas .

Dr. Humberto González Márquez
Coord. del Doctorado de Ciencias
Biológicas y de la Salud

Dra. Alma Amparo Piñeyro Nelson
Coordinadora del Evento y miembro
del Comité Organizador

Dra. Daniela Sosa Peredo
Coordinadora del Evento y miembro
del Comité Organizador



The Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering

- AND -

IV CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

Certificate of Participation to:

Leilani Itzel Salinas Virgen

As:

ASSISTANT

During "The 6th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering & IV Congreso Nacional de Tecnologías y Ciencias Ambientales"

held on November 5-9, 2018 in Ciudad Obregón, Sonora, México.



PhD. Sonia B. Echeverría Castro
ITSON Academic Vice-rector

PhD. Héctor Mario Poggi Varaldo
ABIAER President

ISEBE-CNCTA-A-171



The Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering

- AND -

IV CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍAS Y CIENCIAS AMBIENTALES



Certificate of Participation to:

ME de la Torre-Hernández, LI Salinas-Virgen, JF Aguirre-Garrido, HC Ramírez-Saad.

For invited oral presentation entitled:

Composition and structure of the rhizospheric bacterial communities associated to wild and greenhouse "sweet biznagas"

During "The 6th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering & IV Congreso Nacional de Tecnologías y Ciencias Ambientales" held on November 5-9, 2018 in Ciudad Obregón, Sonora, México.

PhD. Sonia B. Echeverría Castro
ITSON Academic Vicerector

PhD. Héctor Mario Poggi Varaldo
ABIAER President

ISEBE-CNCTA-OP-020



The Sixth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering

- AND -

IV CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍAS Y CIENCIAS AMBIENTALES



Certificate of Participation to:

LI Salinas-Virgen , ME de la Torre-Hernández , JF Aguirre-Garrido , HC Ramírez-Saad.

For poster presentation entitled:

PGPR traits of isolates obtained from the rhizospheric bacterial community of Echinocactus platyacanthus

During "The 6th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering & IV Congreso Nacional de Tecnologías y Ciencias Ambientales" held on November 5-9, 2018 in Ciudad Obregón, Sonora, México.

PhD. Sonia B. Echeverría Castro
ITSON Academic Vicerector

PhD. Héctor Mario Poggi Varaldo
ABIAER President

ISEBE-CNCTA-PS-029