

Caracterización molecular de bacterias rizosféricas asociadas a *Echinocactus platyacanthus* en invernadero y silvestres

Leilani Itzel Salinas Virgen¹
María Eugenia de la Torre Hernández^{1§}
José Félix Aguirre Garrido²
Hugo César Ramírez Saad¹

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100, Ciudad de México, México. CP. 04960. (lisv.nani@gmail.com; hurasa@correo.xoc.uam.mx). ²Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma. Av. Hidalgo Pte. 46, Col. Lerma de Villada, Estado de México, México. CP. 52006. (j.aguirre@correo.ler.uam.mx).

§Autor para correspondencia: mdlatorre@correo.xoc.uam.mx.

Resumen

La biznaga dulce (*Echinocactus platyacanthus*) es una cactácea endémica de México caracterizada por su lento crecimiento y baja tasa de reproducción, lo que aunado a una alta presión de recolecta, coloca a las poblaciones silvestres en una situación de riesgo. Actualmente, el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a cactáceas es escaso y se desconoce qué bacterias cultivables están presentes en la rizósfera de las biznagas dulces que crecen en la naturaleza y en las que se cultivan en viveros. Para este estudio se recolectó material rizosférico de biznagas silvestres y cultivadas, además de suelo no rizosférico. Se aislaron en total de 268 morfotipos y se agruparon en 41 ribotipos diferentes por RFLP. Representantes de cada ribotipo se identificaron mediante 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* (seis cepas), *Stenotrophomonas* (cuatro cepas), *Paenibacillus* (dos cepas), *Brevibacterium*, *Staphylococcus* y *Cutibacterium* (una 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*, filogenia, rizósfera.

Recibido: febrero de 2020

Aceptado: abril de 2020

Introducción

Las zonas áridas y semi-áridas constituyen alrededor de 60% del territorio mexicano (CONAZA, 2019). En ellas habita un gran número de especies vegetales pertenecientes a la familia Cactaceae, cuyos miembros conforman varios de los grupos más representativos de la diversidad biológica mexicana, colocando al país como el principal centro de diversidad cactológica en el mundo (Hernández-Oria *et al.*, 2007).

El cuadrante de Tolimán, ubicado en el extremo sur del desierto de Chihuahua, es una de las regiones donde se encuentra ampliamente representada la diversidad de cactus. Ahí es posible encontrar 55 especies de cactáceas, de las cuales 13 son endémicas; sin embargo, 17 de ellas están en alguna categoría de riesgo para su supervivencia (Hernández *et al.*, 2007).

Las cactáceas son ampliamente utilizadas por las comunidades humanas como material de construcción, alimento humano y de ganado, además de darles usos medicinales y ornamentales (Meza-Nivón, 2011). Adicionalmente, el consumo desmedido, la extracción directa de ejemplares de su hábitat, el alto endemismo, la especificidad ambiental de sus poblaciones, el lento crecimiento, la poca resiliencia y los ciclos de vida largos, provocan que muchas cactáceas estén en condición de riesgo de extinción (Álvarez *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005).

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 debido a la 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 la fracción cultivable de bacterias asociadas a cactáceas es un campo relativamente poco explorado. En la región de Caatinga, Brasil, se aislaron bacterias que pudieran ser tolerantes a la sequía, para ser utilizadas en la recuperación de suelos desérticos (Kavamura *et al.*, 2013), por su parte Chávez-Ambriz *et al.* (2016), emplearon bacterias aisladas de la rizósfera de *Coryphantha radians* y *Mammillaria magnimamma* para promover el crecimiento de *Mammillaria zeilmanniana*.

Otros estudios utilizaron enfoques metagenómicos para 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) y recientemente, se analizó el efecto de la contaminación del suelo por Zn, sobre la diversidad de la microbiota asociada a *Echinocactus platyacanthus*, para explicar su alta tolerancia al estrés ambiental (Sarria-Carabali *et al.*, 2019).

A partir de la rizósfera de plantas de *Echinocactus platyacanthus* silvestres y cultivadas en invernadero se obtuvo una colección de bacterias, que permitió conocer la composición de la comunidad de bacterias cultivables presente en la rizósfera de la biznaga dulce de la zona del semidesierto queretano. Los aislados fueron caracterizados bajo criterios moleculares, mediante ensayos de restricción enzimática de amplicones del gen 16S rRNA y posteriormente identificados por secuenciación del mismo gen.

Materiales 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. Se rotularon 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

Las muestras de un mismo origen (silvestres, vivero o suelo no rizosférico) se mezclaron y se realizaron suspensiones con un factor de dilución 1:10 con 1 gramo de suelo y 9 mL de solución salina (NaCl 0.9%). A partir de las suspensiones se hicieron diluciones seriadas para realizar 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 microscópica de cada aislado se determinó por la tinción de Gram (Gram, 1884).

Obtención del material genético

El DNA genómico de todos los aislados se obtuvo con el kit de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche (Cat. # 11 796 828 001), siguiendo las indicaciones del fabricante. El gen 16S ribosomal se amplificó por PCR 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 RFLP

Para el análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) por sus siglas en inglés, se utilizaron las enzimas de restricción de corte frecuente *Hae*III (GG/CC) y *Msp*I (C/CGG), bajo las condiciones descritas por Massol-Deya *et al.* (1995). Las reacciones de restricción se analizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). 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); *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 bacterian

Las cuentas viables de la rizósfera tanto de plantas silvestres, como de vivero y 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.

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

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

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, el análisis de varianza y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) correspondiente, indicaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tipos de muestras.

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 RFLP, 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 y fueron excluidas del análisis.

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

Patrón de restricción	Núm. de aislados	Origen de los aislados			Patrón de restricción	Núm. 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	2	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 son exclusivas de 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 del ribo tipos (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 el ribo tipos 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 ribo tipo, excepto para el caso de los ribotipos P1, P2, P18 y P26 que tienen mayor número de aislados. En estos casos se seleccionaron dos cepas con el fin de corroborar el agrupamiento por RFLP.

Las dos secuencias del gen 16SrRNA obtenidas para cada aislado fueron ensambladas y se obtuvieron secuencias casi completas de dicho gen (>1350 nr). 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% y fueron excluidas del análisis filogenético por ser consideradas de baja calidad (Kim *et al.*, 2012). 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 a 98.7% (Kim *et al.*, 2014), como se muestra en el Cuadro 3.

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 aryabhatai</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 aryabhatai</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i> (EF114313)	100	99.65
P16	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mediterranea</i> (AUPB01000004)	100	98.65

Cepa	Identificación	Secuencia más cercana (número de acceso)	Cobertura (%)	Similitud (%)
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> (LOBC01000053)	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

En los cuatro casos en los que se seleccionaron dos cepas por ribotipo, ambos aislados de cada patrón produjeron resultados similares. 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.

Construido con el método de máxima verosimilitud ($-\ln= 15,318.8991$), utilizando el modelo sustitución nucleotídica de Jukes-Cantor ($Ts/Tv= 0.5$). Se utilizó la secuencia del gen 16S rRNA de *Thermoplasma acidophilum* como *outgroup*. El análisis de Bootstrap se hizo con 1 000 réplicas aleatorizadas y se muestran sólo los valores $\geq 50\%$. La barra de escala indica 5% de divergencia estimada entre las secuencias.

Las cepas aisladas se asignaron principalmente a los géneros *Bacillus* (21 cepas) y *Pseudomonas* (6 cepas), aunque también se encontraron otros géneros como *Paenibacillus*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus*, *Cutibacterium* y *Stenotrophomonas*, de forma menos abundante. Esto concuerda con hallazgos previos, en donde se reportó que *Bacillus* y *Pseudomonas* son los géneros predominantes en la rizósfera de las cactáceas *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *Mammillaria fraileana* y *Opuntia cholla* (Bashan y de-Bashan, 2010).

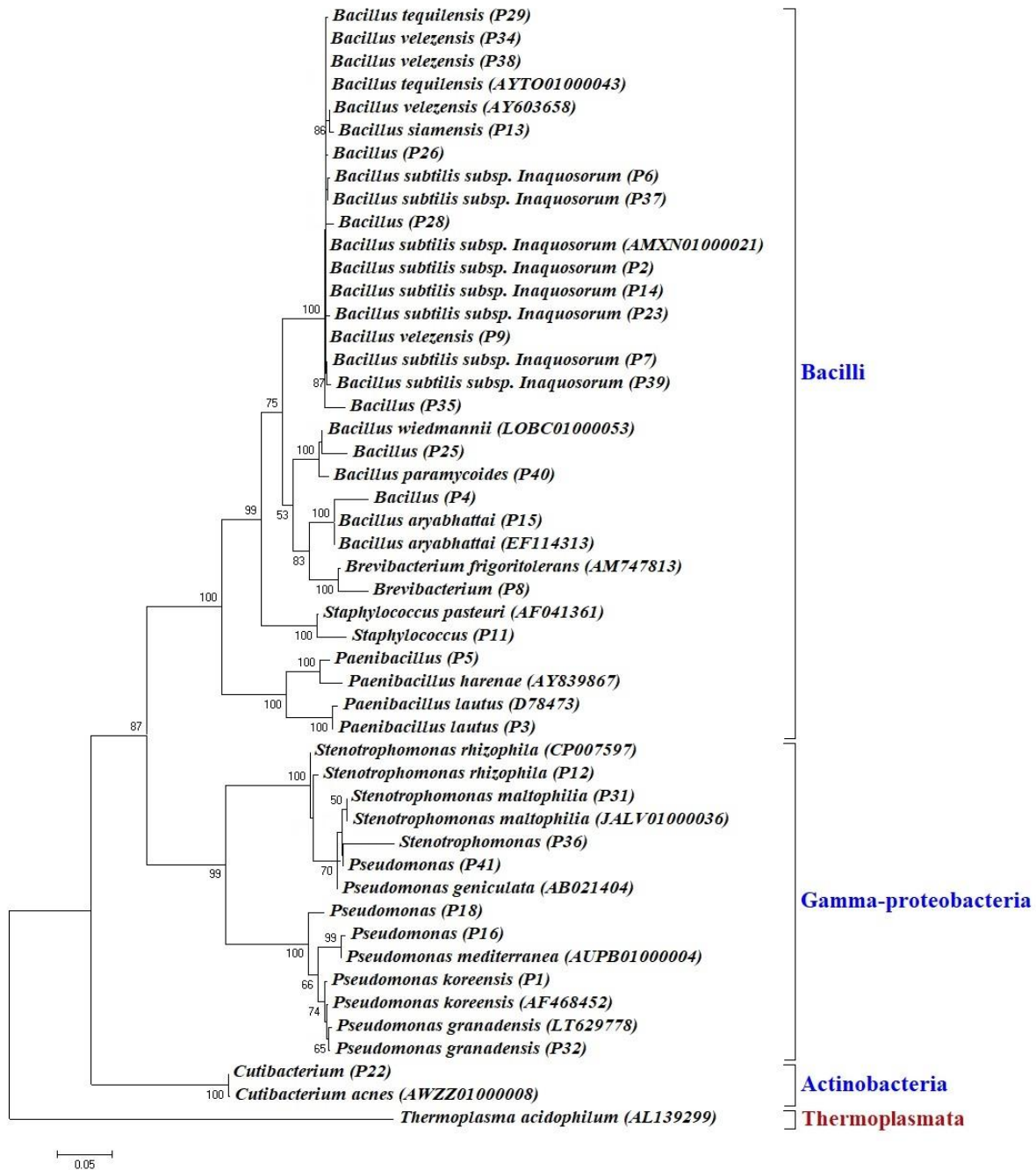


Figura 1. Árbol filogenético de la comunidad bacteriana cultivable asociada con *Echinocactus platyacanthus*.

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).

En un trabajo reciente, Sarria-Carabali *et al.* (2019), donde también utilizaron como modelo la rizósfera de *E. platyacanthus* cultivadas, reportaron una abundancia de secuencias relacionadas al género *Bacillus*, en respuesta a suelos contaminados con diferentes dosis de zinc.

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 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 RFLP 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 Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR).

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.; Mouatasssem, D. and Rouabhi, A. 2016. Screening for *Pseudomonas* and *Bacillus* antagonistic rhizobacteria strains for the biocontrol of *Fusarium* wilt of chickpea. Eurasian J. Soil Sci. 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. and 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(4):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* núm. 75. 7-16 pp.
- 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(4):100-125.
- Bashan, Y. and 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*. Springer Berlín Heidelberg. 109-137 pp. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_6.
- Bonilla, M.; Pajares, S.; Viguera, G.; Sigala, J. C. y Le Borgne, S. 2016. Manual de prácticas de microbiología básica. Ingeniería biológica. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)-Unidad Cuajimalpa. 91 p.
- Bou, G.; Fernández-Olmos, A.; García, C.; Sáez-Nieto, J. A. y 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. y 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. *Rev. Agronómica del Noroeste Argentino*. 36(2):45-54.
- 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 biosfera "Barranca de Metztitlán", Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. 115:65-73.
- 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). *Rev. Argentina de Microbiología*. 48(4):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. and Lim, W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Inter. J. Sys. Evol. Microbiol.* 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, G. L.; Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. 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. and Gautier, C. 1996. Seaview and phylo-win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics*. 12(6):543-548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>.
- Gao, L.; Kong, F.; Feng, C.; Wang, J.; Gao, J.; Shen, G. and Zhang, C. 2016. Isolation, characterization, and growth promotion of phosphate-solubilizing bacteria associated with *Nicotiana tabacum* (tobacco). *Polish J. Enviro. 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. 192 p. ISBN 607790869X.
- Gouy, M.; Guindon, S. and Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 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(6):185-189.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hernández, J. G.; Chávez, R. J. y Sánchez, E. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto Queretano. *Biodiversitas* núm. 70. 6-9 pp. ISSN: 1870-1760.
- 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. *Interciencia.* 32(11):728-734.
- Huber, T.; Faulkner, G. and Hugenholtz, P. 2004. Bellerophon; a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics.* 20(14):2317-2319.
- Kamble, K. D. and Galerao, D. K. 2015. Indole acetic acid production from *Pseudomonas* species isolated from rhizosphere of garden plants in Amravati. *Inter. J. Adv. Pharmacy Biol. Chem.* 4(1):23-31.
- 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. and De Melo, I. S. 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol. Res.* 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. and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Inter. J. Sys. Evol. Microbiol.* 62(3):716-721. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>.
- Kim, M.; Oh, H. S.; Park, S. C. and Chun, J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Inter. J. Sys. Evol. Microbiol.* 64(2):346-351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>.
- Li, H. B.; Singh, R. K.; Singh, P.; Song, Q. Q.; Xing, Y. X.; Yang, L. T. and Li, Y. R. 2017. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology.* 8:1268, 20 p. <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. and Fang, Y. L. 2017. Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Spanish J. Agric. Res.* 14(4), e1106, 10 p. <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016144-9714>.
- Massol-Deya, A. A.; Odelson, D. A.; Hickey, R. F. and Tiedje, J. M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). *In: molecular microbial ecology manual.* Springer, Dordrecht. 289-296 pp.

- 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. 234-244 pp.
- Pin Viso, N. D.; Sautua, F.; Scandiani, M. M.; Luque, A.; Simonetti, E. and 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. Afr. J. Microbiol. Res. 10(27):1031-1035. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2016.7915>.
- Reetha, S.; Bhuvaneshwari, G.; Thamizhiniyan, P. and 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.). Inter. J. Current Microbiol. Appl. Sci. 3(2):568-574.
- Sarria-Carabalí, M. M.; García-Oliva, F.; Cortes-Páez, L. E. and López-Lozano, N. E. 2019. The response of candy barrel cactus to zinc contamination is modulated by its rhizospheric microbiota. Rhizosphere. (12):100177. 9 p. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2019.100177>.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30(12):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(24):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. and 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(1-2):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. Inter. J. Sys. Evol. Microbiol. 67(5):1613-1617. <http://doi.org/67.10.1099/ijsem.0.001755>.
- Zhang, J.; Wang, P.; Fang, L.; Zhang, Q. A.; Yan, C. and Chen, J. 2017. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. Polish J. Microbiol. 66(1):57-65.
- Zhao, L.; Xu, Y.; Lai, X. H.; Shan, C.; Deng, Z. and 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 J. Microbiol. 46(4):977-989. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83824642014002.4>.