

ORIGINAL

Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae)



Lluvia A. Chávez-Ambriz^a, Alejandro Hernández-Morales^b, José A. Cabrera-Luna^c,
Laura Luna-Martínez^a y Juan R. Pacheco-Aguilar^{a,*}

^a Laboratorio de Plantas y Biotecnología Agrícola, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

^b Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

^c Herbario Dr. Jerzy Rzedowski, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

Recibido el 25 de febrero de 2016; aceptado el 8 de septiembre de 2016

Disponible en Internet el 19 de noviembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Inoculantes
microbianos;
Ácido indolacético;
Antesis;
Coryphantha radians;
Zonas áridas

Resumen Las cactáceas son la vegetación característica de las zonas áridas en México, donde las lluvias son escasas, la evapotranspiración es elevada y la fertilidad de los suelos es baja. Las plantas han desarrollado estrategias fisiológicas como la asociación con microorganismos en la zona de la rizósfera para incrementar la captación de nutrientes. En el presente trabajo se obtuvieron 4 aislados bacterianos de la rizósfera de *Mammillaria magnimamma* y *Coryphantha radians*, los que fueron nombrados como QAP3, QAP19, QAP22 y QAP24 e identificados genéticamente como pertenecientes al género *Bacillus*. Estos aislados exhibieron *in vitro* propiedades bioquímicas como solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético y actividad ACC deaminasa, que se relacionan con la promoción del crecimiento de las plantas. Dicha promoción fue ensayada inoculando semillas de *M. magnimamma* y evaluando luego algunos parámetros. Se encontró que todos los aislados incrementaron la germinación desde un 17% hasta un 34,3% (con respecto a las semillas testigo sin inocular); el aislado QAP24 fue el que presentó el mayor efecto en este sentido y permitió la germinación de todas las semillas viables (84,7%) 3 días antes que en el testigo. La inoculación de este aislado en plantas de *Mammillaria zeilmanniana* mostró un efecto positivo sobre la floración: en 2 meses dentro del período de un año se detectó un incremento en el número de plantas en floración con respecto a las plantas testigo, de hasta el 31,0% en uno de ellos. Se concluye que los aislados de *Bacillus* spp. caracterizados poseen potencial para ser empleados en programas de conservación de especies vegetales de zonas áridas.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juanramiro29@yahoo.com.mx (J.R. Pacheco-Aguilar).

KEYWORDS

Microbial inoculants;
Indoleacetic acid;
Anthesis;
Coryphantha radians;
Arid zones

***Bacillus* isolates from rhizosphere of cacti improve germination and bloom in *Mammillaria* spp. (Cactaceae)**

Abstract Cacti are the most representative vegetation of arid zones in Mexico where rainfall is scarce, evapotranspiration is high and soil fertility is low. Plants have developed physiological strategies such as the association with microorganisms in the rhizosphere zone to increase nutrient uptake. In the present work, four bacterial isolates from the rhizosphere of *Mammillaria magnimamma* and *Coryphantha radians* were obtained and named as QAP3, QAP19, QAP22 and QAP24, and were genetically identified as belonging to the genus *Bacillus*, exhibiting *in vitro* biochemical properties such as phosphate solubilization, indoleacetic acid production and ACC deaminase activity related to plant growth promotion, which was tested by inoculating *M. magnimamma* seeds. It was found that all isolates increased germination from 17 to 34.3% with respect to the uninoculated control seeds, being QAP24 the one having the greatest effect, accomplishing the germination of viable seeds (84.7%) three days before the control seeds. Subsequently, the inoculation of *Mammillaria zeilmanniana* plants with this isolate showed a positive effect on bloom, registering during two months from a one year period, an increase of up to 31.0% in the number of flowering plants compared to control plants. The characterized *Bacillus* spp. isolates have potential to be used in conservation programs of plant species from arid zones.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La mayoría del territorio mexicano está constituido por zonas áridas y semiáridas, donde las lluvias son escasas y la evapotranspiración supera la precipitación, con poca cobertura vegetal y condiciones que favorecen la erosión del suelo¹⁷. La vegetación característica de estas zonas incluye la familia de las cactáceas, de las cuales se han reportado 669 especies, 518 de estas son endémicas¹⁹.

Los suelos en estos ecosistemas son poco fértiles debido al bajo contenido de nitrógeno (N), fósforo (P) y materia orgánica, a menudo esto es un factor limitante para el desarrollo de las plantas¹². En este aspecto, las comunidades microbianas de la rizósfera desempeñan un papel fundamental, ya que algunas poblaciones pueden contribuir a la nutrición y el crecimiento de las plantas a través de actividades bioquímicas como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de ácido indolacético, una hormona que induce el crecimiento de los pelos radicales^{14,40}. Los microorganismos que presentan estos efectos sobre las plantas son definidos como promotores del crecimiento vegetal¹⁵; entre los géneros bacterianos más estudiados con esta actividad se encuentran *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Bacillus*. Algunas cepas de estos microorganismos aisladas de la rizósfera de cultivos de cereales y hortalizas ya han sido comercializadas. Estos mismos géneros también han sido descritos como parte del nicho ecológico de la rizósfera de diversas cactáceas, entre ellas *Mammillaria fraileana*, *Opuntia ficus indica*, *Stenocereus pruinosus*, *Stenocereus stellatus*, *Ferocactus acanthodes*, *Opuntia cholla* y *Pachycereus pringlei*^{22,24,34}. A la rizósfera de estas cactáceas se les reconoce su potencial biotecnológico como fuente de aislados microbianos, los cuales podrían ser empleados en programas de reforestación de zonas áridas o para la conservación de plantas

endémicas que se ven amenazadas por actividades antropogénicas o por condiciones ambientales adversas, que afectan su reproducción⁵.

En la localidad La Cañada (municipio El marqués, estado de Querétaro, México), un análisis florístico realizado por Cabrera y Gómez¹⁰ indica que la familia de las cactáceas es la segunda en número de especies y que en ella sobresalen los géneros *Coryphantha* y *Mammillaria*, cuyas rizósferas pueden ser fuente de aislados bacterianos con potencial como promotores del crecimiento vegetal.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron bacterias de la rizósfera de las cactáceas *Mammillaria magnimamma* Haw. y *Coryphantha radians* (DC.) Britton & Rose, para evaluar luego su efecto sobre la germinación de semillas de *M. magnimamma*. El aislado más promisorio fue seleccionado para estudiar su impacto sobre el crecimiento y la floración de plantas de *Mammillaria zeilmanniana* Boed.

Materiales y métodos

Aislados bacterianos

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo fueron obtenidas de la rizósfera de *M. magnimamma* y *C. radians* (figura 1). Ambas cactáceas se encuentran creciendo en la localidad de La Cañada, perteneciente al municipio El Marqués, en el estado de Querétaro. Este sitio se ubica a una altitud promedio de 1820 msnm, entre las coordenadas 20° 36' a 20° 38' N y 100° 18' a 100° 20' O. El clima predominante es el semiseco templado, con una precipitación media anual de 450 a 800 mm¹⁸. La vegetación corresponde al matorral crasicaule, con diferentes grados de conservación³⁹. Para la obtención del suelo, se muestreó 1 kg de la zona de la rizósfera, separándola por frotación manual en bolsas



Figura 1 *Coryphantha radians* (izquierda) y *Mammillaria magnimamma* (derecha) fuente de los aislados bacterianos de este estudio.

estériles. El suelo obtenido fue secado a temperatura ambiente y tamizado por una malla de 2 mm. El método empleado para el aislamiento de bacterias del suelo fue la dilución y siembra en placa, seleccionando por pasteurización esporas bacterianas resistentes al calor (80 °C, 10 min). Esto último se realizó con la finalidad de obtener aislados que demuestren capacidad de sobrevivir a condiciones extremas de desecación y altas temperaturas²³. Después, las colonias resultantes fueron sometidas a un segundo escrutinio, sembrándolas en placas con medio NBRIP-BPB²⁵ para seleccionar bacterias solubilizadoras de fosfatos. Se tomaron como positivos los aislados que produjeron un halo de color amarillo alrededor de las colonias debido al cambio de pH en el medio, que contenía azul de bromofenol como indicador. Los aislados así obtenidos fueron nombrados como QAP3, QAP19, QAP22 y QAP24.

Material vegetal

Para los ensayos de germinación, se recolectaron frutos de *M. magnimamma* de la misma zona donde se obtuvo el suelo. Las semillas fueron extraídas, lavadas y secadas a temperatura ambiente. Para los ensayos de crecimiento y floración, se utilizaron 100 plantas de *M. zeilmanniana* de 1,7 años de edad y un diámetro de 2,72 ($\pm 0,08$) cm, provenientes del vivero Typical Mexican Handmade S. A. de C.V., «Vivero de plantas del desierto» (REG. SEMARNAT-UMA-INT-0043-GTO), ubicado en León, Guanajuato, México. Una vez recibidas, las plantas fueron puestas en macetas cuadradas de 2 pulgadas que contenían una mezcla de arena lavada (42,64%), turba (42,64%), cal (0,77%) y humus (13,95%) como sustrato.

Actividades bioquímicas

Las características bacterianas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal fueron determinadas de la siguiente manera. Para detectar la actividad aminociclopropano (ACC) deaminasa, las bacterias fueron sembradas por estriado en el medio mínimo Dowkin y Foster (DF), que contiene ACC como única fuente de nitrógeno. Aquellas que presentaron crecimiento en este medio fueron consideradas como positivas³⁶. La prueba de fijación biológica de nitrógeno (FBN) se realizó sembrando los aislados por pica-

dura en medio semisólido *nitrogen fixation biological* (NFB), carente de nitrógeno²⁹: el crecimiento bacteriano detectado mediante la formación de una película subsuperficial después de 15 días de incubación a 30 °C indica la habilidad de los aislados para fijar nitrógeno en condiciones microaerofílicas.

La prueba de producción de sideróforos fue realizada creciendo las bacterias en medio mínimo líquido MM9 suplementado con ácido succínico, fructosa y triptófano (1,0; 5,0 y 1,0 g/l, respectivamente)²⁸ durante 5 días, a 30 °C. Después, los sobrenadantes fueron recuperados por centrifugación y filtrados usando una membrana Millipore de 0,22 μm de diámetro; la presencia de sideróforos fue detectada mediante el reactivo de cromo azurol-S, se consideró esta prueba como positiva si se registraba cambio de color de azul a anaranjado. Como control positivo se utilizó una solución de mesilato de deferoxamina 1,43 mM.

La producción de ácido indol-3-acético (AIA) e indoles relacionados fue determinada creciendo los aislados en caldo nutritivo suplementado con triptófano (1 g/l) durante 72 h a 30 °C. El sobrenadante fue recuperado por centrifugación y sujeto a extracción fraccionada con acetato de etilo, el que después fue evaporado, y el residuo resultante fue resuspendido en metanol. El AIA y los indoles fueron cuantificados por colorimetría con el reactivo de Salkowski²⁷, midiendo a 530 nm en un espectrofotómetro (Helios gamma, Spectronic unicam).

Para evaluar la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio, los aislados fueron cultivados en el medio NBRIP²⁵ durante 5 días a 30 °C con agitación constante. Después, los cultivos fueron centrifugados y el fósforo soluble fue cuantificado en el sobrenadante con el método de azul de molibdeno⁷.

Secuenciación del gen 16S ARNr

La identificación de los aislados fue realizada mediante la amplificación y secuenciación de gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal, empleando los oligos fD1 y rD1 y las condiciones propuestas por Weisburg et al.⁴¹. El producto resultante de ~1500 pb fue enviado para secuenciación al Centro de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras de *Bacillus* reportadas como promotoras del crecimiento

vegetal en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El árbol filogenético fue construido mediante el programa MEGA versión 6.0 usando el método de *Neighbor Joining* y el modelo de Jukes-Cantor con un *bootstrap* de 1000 réplicas³⁸.

Preparación de los inóculos

Para realizar los ensayos de promoción de la germinación y el crecimiento vegetal, se prepararon inóculos creciendo los aislados en 100 ml de caldo nutritivo durante 24 h a 30 °C, con agitación constante a 180 rpm. Después, los cultivos se centrifugaron a 1459 × g 15 min. La pastilla celular resultante fue lavada con solución salina (NaCl 0,8%) y resuspendida en 5 ml para realizar el recuento en la cámara de Neubauer, la densidad celular final fue ajustada a 10⁷ células/ml para los ensayos de inoculación.

Inoculación de semillas de *M. magnimamma*

En el ensayo de promoción de la germinación, 6 lotes de 50 semillas de *M. magnimamma* fueron inoculados por inmersión en 5 ml de suspensión bacteriana (10⁷ células/ml) con agitación constante durante una hora. Las semillas luego fueron sembradas en charolas con papel de filtro húmedo como sustrato e incubadas en una cámara de crecimiento a 23 ± 5 °C. La germinación fue registrada diariamente durante 14 días, considerando germinadas las semillas cuando presentaron emergencia de la radícula.

La viabilidad de las semillas fue determinada por el método bioquímico del tetrazolio: se sumergieron 3 lotes de 50 semillas en agua estéril durante 48 h. Después, estas fueron recuperadas y cortadas con un bisturí y sumergidas de nuevo en una solución de tetrazolio al 1% durante 2 h. Las semillas consideradas como viables presentaron una coloración rosada-rojiza, producto de la reducción del tetrazolio

a formazán por la actividad de las enzimas deshidrogenasas involucradas en la respiración celular³⁰.

Inoculación de *M. zeilmanniana*

El ensayo de promoción del crecimiento de plantas de *M. zeilmanniana* en condiciones de vivero se inició el 16 de marzo del 2012, inoculando la raíz de 50 plantas con 5 ml de una suspensión bacteriana de la cepa QAP24, que contenía 10⁷ células/ml. Se efectuaron posteriores inoculaciones a los 75, 135, 150 y 235 días, conservando 50 plantas sin inocular como testigo. La humedad fue mantenida mediante riegos manuales a capacidad de campo, semanalmente en época de calor y espaciándolos en época de frío; la temperatura media mensual fluctuó entre los 16,5 y los 23,5 °C, como se muestra en la [tabla 1](#). El diámetro de cada planta fue registrado al inicio y al final del experimento, que duró un año, contabilizando además, semanalmente, el número de plantas en floración y el número de flores por planta.

Análisis de datos

Los ensayos de germinación y promoción del crecimiento fueron realizados con un diseño experimental completamente aleatorizado, donde cada tratamiento consistió en la inoculación de cada cepa y el testigo sin inocular. La unidad experimental estuvo constituida por 50 semillas y 10 plantas, con 6 y 5 repeticiones, respectivamente. Los ensayos bioquímicos fueron realizados por triplicado y los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias ($p < 0,05$)¹¹.

Números de acceso

Las secuencias de los genes 16S ARN ribosomales de los aislados bacterianos fueron depositadas en el banco de datos del NCBI con los siguientes números de acceso: KF419127

Tabla 1 Efecto de la inoculación de QAP24 sobre la floración de *M. zeilmanniana*

Fecha		% de plantas en floración		Número de flores por planta		Temp. media mensual	
Año	Mes	Testigo	QAP24	Testigo	QAP24	T °C	
2012	Marzo	2,0 (±4,47)a ^a	0,0 (±0,0)a	0,20 (±0,44)a	0,0 (±0,0)a	20,5	
	Abril	8,5 (±8,58)a	4,0 (±8,94)a	1,10 (±1,43)a	0,50 (±1,11)a	21,5	
	Mayo	12,0 (±13,0)a	6,0 (±5,47)a	1,6 (±2,34)a	1,20 (±1,30)a	23,5	
	Junio	2,0 (±4,47)a	8,0 (±10,9)a	0,2 (±0,44)a	0,50 (±0,70)a	22,5	
	Julio	23,0 (±8,37)b	54,0 (±18,2)a	4,3 (±4,16)a	4,77 (±1,64)a	21,5	
	Agosto	75,5 (±10,7)a	86,0 (±11,4)a	7,19 (±2,17)a	8,15 (±1,81)a	21,5	
	Septiembre	69,5 (±18,1)a	76,0 (±19,5)a	5,30 (±1,55)a	6,34 (±1,26)a	21,0	
	Octubre	48,5 (±13,6)a	64,0 (±13,4)a	6,14 (±3,08)a	6,92 (±1,96)a	20,5	
	Noviembre	28,9 (±16,9)a	48,0 (±8,36)a	4,69 (±2,12)a	5,28 (±1,10)a	17,5	
	Diciembre	18,9 (±10,3)b	34,0 (±8,94)a	3,33 (±1,24)a	3,10 (±0,94)a	16,5	
	2013	Enero	35,7 (±9,20)a	46,0 (±13,4)a	4,89 (±0,67)a	4,28 (±1,93)a	16,9
		Febrero	94,0 (±5,47)a	96,0 (±8,94)a	8,73 (±1,84)a	10,17 (±2,39)a	19,1
Marzo		96,0 (±5,47)a	96,0 (±8,94)a	5,81 (±1,04)a	6,13 (±0,38)a	18,5	

Los porcentajes fueron transformados a grados angulares para el análisis estadístico.

^a Medias con letras diferentes dentro de cada hilera son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

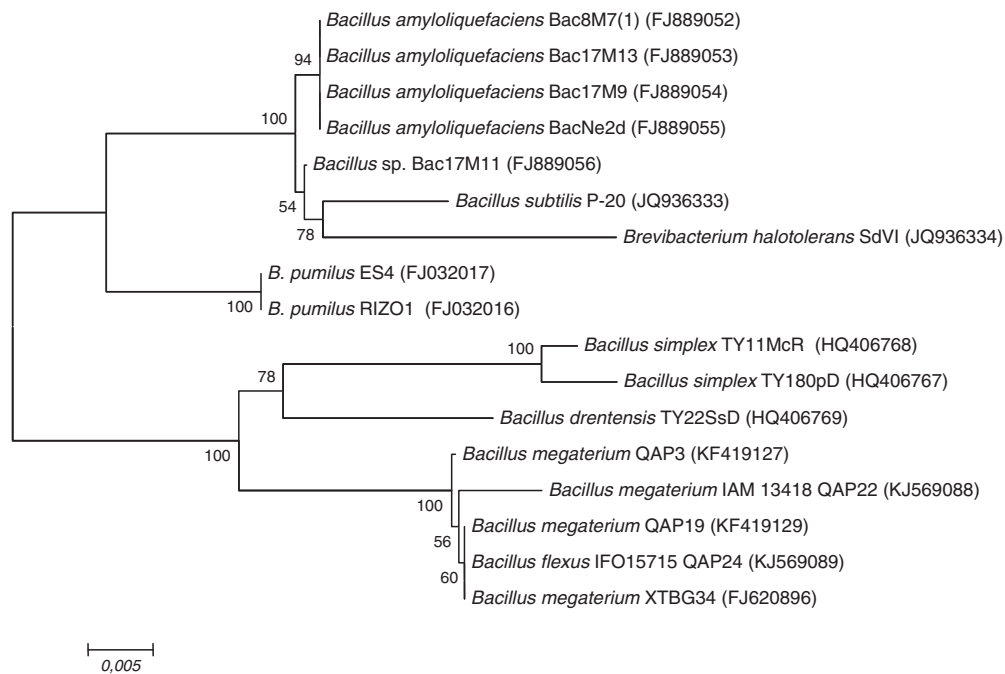


Figura 2 Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S ARNr de los aislados bacterianos de este estudio y de cepas de *Bacillus* reportadas como promotoras del crecimiento vegetal.

(QAP3), KF419129 (QAP19), KJ569088 (QAP22) y KJ569089 (QAP24).

Resultados

Obtención e identificación de aislados rizoféricos

En el aislamiento y el escrutinio de bacterias de la rizósfera de *M. magnimamma* y *C. radians* se obtuvieron 4 aislados bacilares gram positivos, con morfología colonial característica del género *Bacillus*, los cuales fueron nombrados como QAP3 (el proveniente de *M. magnimamma*) y como QAP19, QAP22 y QAP24 (los provenientes de *C. radians*).

La identificación genética por secuenciación del gen 16S ARNr confirmó que los aislados pertenecían al género *Bacillus* y que estaban estrechamente relacionados con las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus flexus*, con una similitud del 96 al 99%. En el dendrograma (figura 2) se observa que los aislados QAP3, QAP19 y QAP22 muestran alta similitud con *B. megaterium*; sin embargo, QAP3 se encuentra ligeramente separado en otro clado filogenético,

probablemente porque fue aislado de la rizósfera de *M. magnimamma*, dicho aislado se correlaciona con QAP24, que muestra similitud con *B. flexus* y se encuentra agrupado con los aislados provenientes de *C. radians*.

Actividades promotoras del crecimiento vegetal

Los resultados de los ensayos bioquímicos muestran que los aislados poseen potencial para la promoción del crecimiento de plantas (tabla 2). El crecimiento de todos los aislados en medio DF indica que poseen actividad enzimática ACC deaminasa, la cual se encuentra relacionada con la disminución en la concentración del etileno, hormona que es producida por las plantas como respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico, y que en altas concentraciones inhibe el crecimiento y el desarrollo¹⁶.

El ensayo de crecimiento en medio carente de nitrógeno solo fue positivo para el aislado QAP22, los microorganismos que crecen en este medio son presuntamente fijadores del nitrógeno (diazótrofos). Esta actividad es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa, la cual puede ser confirmada por el

Tabla 2 Propiedades bioquímicas de los aislados bacterianos relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal

Ensayo bioquímico	QAP3	QAP19	QAP22	QAP24
Actividad ACC deaminasa	++	+	+	+
Crecimiento en medio NFB	-	-	++	-
Producción de siderófos	-	-	-	-
Producción de AIA e indoles	11,4 (± 1,12) b ^a	7,1 (± 0,04) c	6,3 (± 0,04) c	26,1 (± 2,39) a
Solubilización de fosfatos	26,0 (± 3,84) c	134,6 (± 20,4) a	75,9 (± 4,83) b	32,7 (± 3,34) c

Los valores son el promedio de 3 repeticiones independientes, en mg/l. Se indica entre paréntesis el error estándar de cada valor.

^a Medias seguidas de letras diferentes dentro de cada fila son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabla 3 Porcentaje de germinación acumulado de semillas de *M. magnimamma* inoculadas con cepas de *Bacillus*

Día	Testigo	QAP3	QAP19	QAP22	QAP24
3	1,0 (± 1,09) ^a	1,0 (± 1,67) ^a	1,0 (± 1,67) ^a	1,3 (± 1,03) ^a	1,3 (± 1,63) ^a
4	4,3 (± 4,08) ^a	5,7 (± 4,45) ^a	7,0 (± 2,09) ^a	9,0 (± 4,33) ^a	6,0 (± 2,82) ^a
5	17,0 (± 12,9) ^b	33,7 (± 9,24) ^{ab}	31,3 (± 12,4) ^{ab}	39,7 (± 16,7) ^a	35,0 (± 9,44) ^{ab}
6	21,0 (± 15,3) ^b	47,7 (± 12,6) ^a	41,3 (± 18,1) ^{ab}	48,0 (± 12,8) ^a	48,7 (± 12,4) ^a
7	33,0 (± 17,0) ^b	62,0 (± 20,2) ^a	55,3 (± 15,6) ^{ab}	62,3 (± 6,50) ^a	67,3 (± 15,5) ^a
8	56,0 (± 7,15) ^b	77,3 (± 8,73) ^a	73,0 (± 8,07) ^a	74,3 (± 4,96) ^a	78,7 (± 7,86) ^a
9	63,0 (± 11,9) ^b	83,3 (± 6,41) ^a	77,7 (± 7,31) ^{ab}	80,3 (± 5,12) ^a	81,0 (± 8,46) ^a
11	75,0 (± 5,89) ^b	83,3 (± 6,41) ^{ab}	81,0 (± 6,16) ^{ab}	81,3 (± 5,01) ^{ab}	84,7 (± 3,01) ^a
12	77,0 (± 4,52) ^a	83,3 (± 6,41) ^a	83,3 (± 5,16) ^a	82,3 (± 5,12) ^a	85,3 (± 3,01) ^a
13	81,0 (± 5,17) ^a	85,3 (± 6,41) ^a	84,0 (± 4,56) ^a	83,0 (± 5,76) ^a	87,3 (± 2,07) ^a
14	82,3 (± 5,42) ^a	85,7 (± 6,38) ^a	86,3 (± 6,12) ^a	84,0 (± 5,06) ^a	88,7 (± 3,50) ^a

Los valores son el promedio del porcentaje de germinación, los que fueron transformados a grados angulares para el análisis estadístico. Se indica entre paréntesis el error estándar de cada valor.

^a Medias con letras diferentes dentro de cada fila son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Los autores del presente artículo manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

ensayo de reducción del acetileno. La producción de AIA e indoles fue registrada en todos los aislados, en un rango de 6,3 a 26,1 mg/l, el aislado QAP24 fue el que mostró la mayor producción.

Finalmente, la actividad de solubilización de fosfatos, que fue empleada para el escrutinio de las cepas, dio valores de 26,0 a 134,6 mg/l de fósforo soluble en el medio. Esta actividad, dependiente de la producción microbiana de ácidos orgánicos, disminuye el pH haciendo soluble el fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. El fosfato de aluminio (AlPO_4) y el férrico (FePO_4) también han sido empleados como fuente de fósforo para el aislamiento de bacterias solubilizadoras, inclusive han permitido seleccionar aislados con mayor actividad, por lo que se sugiere el uso de más de una fuente de fosfatos para el aislamiento y la caracterización de bacterias con esta actividad⁶.

Efecto sobre la germinación de semillas de *M. magnimamma*

Para determinar el efecto de las cepas de *Bacillus* sobre la germinación de semillas de cactáceas, fue seleccionada *M. magnimamma* como planta modelo. Se encontró que la inoculación de semillas promovió la germinación, como se puede ver en la [tabla 3](#). En el 5.º día, el aislado QAP22 incrementó el porcentaje de germinación en un 22,7% con respecto al testigo, mientras que los aislados QAP3 y QAP24 mostraron efecto a partir del 6.º día, con aumentos de la germinación en un 26,7 y un 27,7%, respectivamente. En general, el aislado QAP24 fue el que demostró el mayor efecto entre el día 6 y el 11, con porcentajes de incremento de hasta el 34,3% con respecto al testigo, seguido por los aislamientos QAP22, QAP3 y QAP19, con incrementos del 29,3, el 29,0 y el 22,3%, respectivamente. La viabilidad de las semillas de acuerdo con el ensayo bioquímico del tetrazolio fue del $84,7 \pm 4,2\%$; este porcentaje de germinación fue alcanzado en el día 11 con la inoculación de QAP24, 3 días antes que en el testigo sin inocular ([tabla 3](#)).

Cabe resaltar que aunque las cepas QAP19, QAP22 y QAP24 fueron aisladas de *C. radians*, también tuvieron

efectos beneficiosos sobre la germinación de semillas de *M. magnimamma*, estos fueron similares a los observados tras la inoculación con QAP3, el cual forma parte del microbioma de la rizósfera de dicha especie vegetal; esto da cuenta de la versatilidad de estos aislados para ejercer efecto promotor del crecimiento en plantas distintas a su hospedero.

Efecto sobre la floración de *M. zeilmanniana*

Para evaluar el efecto promotor del crecimiento en cactáceas, plantas de *M. zeilmanniana* fueron inoculadas con la cepa QAP24, que es la que mostró el mayor efecto en el ensayo de germinación. Se detectó un efecto positivo sobre la floración, con un incremento en el porcentaje de plantas con flor con respecto al testigo durante los meses de julio y diciembre del 31,0 y el 15,1%, respectivamente ([tabla 1](#)). Esto ocurrió a pesar de que las plantas testigo iniciaron la floración 2 semanas después de haber establecido el ensayo, mientras que las plantas inoculadas con el aislado QAP24 la iniciaron 4 semanas después.

Durante el ensayo, que duró un año, se registraron 2 máximos de floración en *M. zeilmanniana*: uno en agosto del 2012 y otro en marzo del 2013, y aunque el aislado QAP24 incrementó el porcentaje de plantas en floración, el número de flores en antesis por planta se mantuvo sin diferencias entre el tratamiento y el testigo ([tabla 1](#)). Tampoco se observaron diferencias en el crecimiento radial por la inoculación, ambos grupos presentaron un incremento promedio del $52\% \pm 2,02$.

Discusión

La microbiota del suelo es esencial para el mantenimiento de los ecosistemas desérticos, donde los microorganismos establecen relaciones beneficiosas con las plantas a través de la rizósfera, contribuyendo a la sobrevivencia, la nutrición y el crecimiento de las especies vegetales en estos ambientes adversos^{21,35}.

Se ha descrito que la composición de los exudados que producen las raíces varía en cada especie; junto con el tipo

de suelo, estos factores determinan la composición de las comunidades microbianas de la rizósfera. Dentro de aquellas, las poblaciones bacterianas de *Bacillus* aparecen como ubicuas.

Bashan y de-Bashan⁵ reportan los géneros bacterianos *Bacillus* y *Pseudomonas* como dominantes de la rizósfera en 4 especies de cactáceas (*P. pringlei*, *Stenocereus thurberi*, *M. fraileana* y *O. cholla*), en 2 árboles (*Ficus palmeri* y *Pachycormus discolor* Benth. Coville) y como endófitos en plántulas del cardón gigante *P. pringlei* (S. Watson) Britton & Rose. Posteriormente, Aguirre et al.¹ analizaron la diversidad microbiana de la rizósfera de *Mammillaria carnea* Zucc. ex Pfeiff., *Opuntia pilifera* F.A.C. Weber y *S. stellatus* (Pfeiff.) Riccob., empleando herramientas moleculares basadas en la amplificación del gen 16S del ARNr y la separación por electroforesis en geles desnaturalizantes. De esa manera, encontraron que la composición de las comunidades bacterianas es diferente entre estas cactáceas, pero comparten el género *Bacillus*. En nuestro estudio, el aislamiento de cepas de *Bacillus* provenientes de *M. magnimamma* y *C. radians* refuerza el concepto de que este género bacteriano integra la comunidad microbiana de la rizósfera de las cactáceas que crecen en zonas áridas.

La reproducción de cactáceas se lleva a cabo de forma vegetativa y por semilla, esta última es de suma importancia para el mantenimiento de la diversidad genética²⁶. La germinación de las semillas depende de condiciones específicas de humedad, luz y temperatura para romper la latencia. Tal es el caso de *M. magnimamma*, cuyas semillas son fotoblásticas, ya que responden positivamente a fotoperíodos de 12:12 (horas luz:horas oscuridad) y germinan en un amplio rango de temperaturas (de 15 a 25 °C), manteniendo altos porcentajes de viabilidad (83%) hasta después de un año³⁷.

En el presente estudio se encontró que la inoculación de semillas de *M. magnimamma* con aislados de *Bacillus* rizoféricos de cactáceas incrementó la germinación hasta un 34,3% en algún momento del ensayo. El aislamiento de *Bacillus* QAP24 fue el que presentó la mayor inducción y permitió lograr en menor tiempo la mayor tasa de germinación, con un porcentaje de viabilidad similar al reportado por Ruedas et al.³⁷.

En años recientes se ha incrementado el número de reportes sobre aislados rizoféricos que son empleados para inducir la germinación de semillas y mejorar la producción de cereales y hortalizas^{13,15}, pero la información al respecto en cactáceas es mínima.

Puente y Bashan³³ utilizaron *Azospirillum brasilense* Sp 245 proveniente de la rizósfera de trigo para inducir la germinación de semillas de cardón gigante (*P. pringlei*) y obtuvieron incrementos de hasta el 25%. Este efecto es atribuido a la producción microbiana de AIA más que a la fijación biológica de nitrógeno. El AIA es una fitohormona que pertenece al grupo de las auxinas, su efecto promotor sobre la germinación *in vitro* de diferentes semillas de especies de cactáceas ha sido documentado^{2,26}. En el ensayo de producción *in vitro* de AIA e indoles, se detectó en el sobrenadante del aislado QAP24 la mayor cantidad de estos metabolitos con respecto a los demás aislados; esta propiedad bioquímica podría estar relacionada con la inducción de la germinación de semillas de *M. magnimamma*.

Después de la germinación, toda plántula comienza el desarrollo vegetativo hasta la floración, etapa considerada como crucial para el inicio de la reproducción sexual. Aunque la floración depende de la interacción de factores intrínsecos como el estado de desarrollo de la planta y del estatus nutricional, así como de factores ambientales (fotoperíodo, temperatura, humedad), cada factor puede incidir cambiando el umbral de otro; algunas plantas pueden usar esto a su favor cuando un factor es crítico en su ambiente⁸. Bowers⁹ registró durante 2 años la fenología de *Mammillaria grahamii* Engelm en el desierto de Sonora y encontró hasta 4 períodos de floración cada año, los cuales estuvieron altamente correlacionados ($r=0,94$; $p<0,05$) con la presencia de lluvias una semana antes.

Pimienta et al.³² reportan que el agua disponible después de la precipitación promueve el crecimiento de los pelos radicales y la colonización microbiana de la rizósfera de *Stenocereus queretaroensis* (F.A.C. Weber) Buxb. Así se incrementa la absorción de nutrientes por la planta, lo que resulta en un mayor desarrollo vegetativo, en un incremento en el peso del fruto y en una mayor germinación de las semillas obtenidas de estos frutos. En el ensayo de inoculación en *M. zeilmanniana*, las plantas presentaron floración durante casi todo el año y, aunque el número de flores por planta no se incrementó con la inoculación de *Bacillus* QAP24, en los meses julio y diciembre se registró un aumento del 31,0% y el 15,1%, respectivamente, en el número de plantas en floración. Esta inducción pudo deberse a la producción microbiana de AIA. Se ha informado un incremento en la concentración de esta hormona medida por inmunodetección en las etapas iniciales de floración en *Opuntia stenopetala* Engelm³¹.

El potencial biotecnológico de bacterias en la producción de flor de corte ha sido documentado por Arriaga et al.³, quienes, después de inocular bulbos de *Lilium* sp. con *Bacillus subtilis* Beb-13, redujeron el tiempo hasta el inicio de la floración. Estos autores atribuyeron este efecto a la producción de AIA y a la actividad ACC deaminasa, propiedades bioquímicas también detectadas en *Bacillus* QAP24 en el presente estudio.

Los resultados expuestos confirman que la rizósfera de cactáceas contiene grupos microbianos que pueden ser empleados en programas de reproducción de cactáceas. Esto se suma a lo observado en reportes previos, que también describen el aislamiento de microorganismos con efecto promotor del crecimiento de cultivos agronómicos como frijol¹⁴ y maíz²⁰, y de agentes de control de fitopatógenos⁴.

Conclusiones

La rizósfera de las cactáceas *M. magnimamma* y *C. radians* poseen poblaciones microbianas del género *Bacillus* con actividades bioquímicas promotoras del crecimiento vegetal, que pueden incrementar la germinación de semillas de cactáceas como *M. magnimamma* y la floración en *M. zeilmanniana*. Estos aislados podrían emplearse como herramientas biotecnológicas para programas de reproducción de especies de cactáceas con fines ornamentales o de aquellas cuya extinción se desea evitar.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Los autores agradecen al Programa de Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP) por el financiamiento de esta investigación.

Conflicto de intereses

Los autores del presente artículo manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Aguirre GJF, Montiel LD, Hernández RC, Torres CG, Millán V, Toro N. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012;101:891–904.
- Amador AKA, Díaz GJ, Loza CS, Bivián CEY. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*. 2013;35:109–31.
- Arriaga MR, González HA, Castillo GAM, Olalde PV, Reyes RBG, Aguilera GL. Respuesta de *Lilium* sp. al fósforo y su relación con *Glomus fasciculatum* y *Bacillus subtilis*. *Phyton*. 2009;78:91–100.
- Bacon CW, Hinton DM. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biol Control*. 2002;23:274–84.
- Bashan Y, de-Bashan LE. Microbial populations of arid lands and their potential for restoration of deserts. En: Dion P, editor. *Soil biology and agriculture in the tropics*. Berlín-Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p. 109–37.
- Bashan Y, Kamnev AA, de-Bashan LE. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. *Biol Fertil Soils*. 2013;49:465–79.
- Ben MAS, Elferjani HS, Haroun FA, Abdelnabi FF. Determination of available nitrate, phosphate and sulfate in soil samples. *Int J PharmTech Res*. 2009;1:598–604.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*. 1993;5:1147–55.
- Bowers JE. Flowering patterns and reproductive ecology of *Mammillaria grahamii* (Cactaceae), a common, small cactus in the sonoran desert. *Madroño*. 2002;49:201–6.
- Cabrera LJA, Gómez SM. Análisis florístico de La Cañada, Querétaro, México. *Bol Soc Bot Méx*. 2005;77:35–50.
- Castaño TE, Domínguez DJ. Comparaciones múltiples. En: Castaño TE, Domínguez DJ, editores. *Diseño de experimentos: estrategias y análisis en ciencia y tecnología*. Querétaro, México: Universidad Autónoma de Querétaro; 2010. p. 73–91.
- Celaya MH, Castellanos VAE. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoam*. 2011;29:343–56.
- Chauhan H, Bagyaraj DJ, Selvakumar G, Sundaram SP. Novel plant growth promoting rhizobacteria —Prospects and potential. *Appl Soil Ecol*. 2015;95:38–53.
- De Carvalho CFE, Soares MI. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Afr J Microbiol Res*. 2012;6:1345–53.
- De Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet Mol Biol*. 2015;38:401–19.
- Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res*. 2014;169:30–9.
- Granados SD, Hernández GMA, Vázquez AA, Ruiz PP. Los procesos de desertificación y las regiones áridas. *Rev Chapingo ser cienc for ambient*. 2013;19:45–66.
- Hernández OJG. Desaparición del bosque seco en el bajo mexicano: implicaciones del ensamblaje de especies y grupos funcionales en la dinámica de una vegetación amenazada. *Zon Arid*. 2007;11:13–31.
- Jiménez SCL. February 2016. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Rev Dig Univ*. 2011;12:1–23. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/art04.pdf>
- Kavamura VN, Santos SN, Silva JL, Parma MM, Avila LA, Visconti A, Zucchi TD, Taketani RG, Andreote FD, Soares MI. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol Res*. 2013;168:183–91.
- López BR, Tinoco OC, Bacilio M, Mendoza A, Bashan Y. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environ Exp Bot*. 2012;81:26–36.
- López BR, Bashan Y, Bacilio M. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Arch Microbiol*. 2011;193:527–41.
- Mandic MI, Prosser JI. Diversity of endospore-forming bacteria in soil: characterization and driving mechanisms. En: Logan NA, de Vos P, editores. *Endospore-forming soil bacteria*. Berlín-Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. p. 31–59.
- Mascarua EMA, Villa GR, Caballero MJ. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceae plants. *Plant Soil*. 1988;106:91–5.
- Mehta S, Nautiyal CS. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. *Current Microbiol*. 2001;43:51–6.
- Mihalte L, Sestras RE, Feszt G. Methods to improve seed germination of *Cactaceae* species. *Bulgarian J Agric Sci*. 2011;17:288–95.
- Mohite B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J Soil Sci Plant Nutrition*. 2013;133:638–49.
- Murugappan RM, Aravindh A, Rajarobbia R, Karthikeyan M, Alamelu MR. Optimization of MM9 medium constituents for enhancement of siderophoregenesis in marine *Pseudomonas putida* using response surface methodology. *Indian J Microbiol*. 2012;52:433–41.
- Naher UA, Radziah O, Shamsuddin ZH, Halimi MS, Razi M. Isolation of diazotrophs from different soils of Tanjong Karang rice growing area in Malasya. *Int J Agric Biol*. 2009;11:547–52.
- Olesen MH, Nikneshan P, Shrestha S, Tadayyon A, Deleuran LC, Boelt B, Gislum R. Viability prediction of *Ricinus*

- cummunis* L. seeds using multispectral imaging. *Sensors*. 2015;15:4592–604.
31. Orozco AG, Vázquez SS, Camacho A, Dubrovsky JG, Cruz GF. Inception of maleness: Auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta*. 2012;236:225–38.
 32. Pimienta BE, Pimienta BE, Salas GME, Zañudo HJ, Nobel PS. Growth and reproductive characteristics of the columnar cactus *Stenocereus queretaroensis* and their relationships with environmental factors and colonization by arbuscular mycorrhizae. *Tree Physiol*. 2002;22:667–74.
 33. Puente ME, Bashan Y. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*. 1993;15:49–60.
 34. Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol*. 2004;6:629–42.
 35. Puente ME, Li CY, Bashan Y. Rock-degrading endophytic bacteria cacti. *Environ Exp Bot*. 2009;66:389–401.
 36. Ravindra NP, Raman G, Badri NK, Sakthivel N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiol*. 2008;8:1–14.
 37. Ruedas M, Valverde T, Castillo AS. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactaceae) bajo diferentes condiciones ambientales. *Bol Soc Bot Méx*. 2000;66:25–35. *Symbiosis*. 15:49-60.
 38. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;16:1–5.
 39. Tapia F, Castillo J, Hernández MH. Los myxomycetes del estado de Querétaro I. Las especies conocidas. *Rev Mex Mic*. 2008;26:21–6.
 40. Villegas EJ, Rueda PE, Murillo AB, Puente ME, Ruiz EH, Zamora SS, Beltrán M. Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz. *Rev Mex de Cienc Agric*. 2014;5:1041–53.
 41. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991;173:697–703.