



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL UNIDAD IRAPUATO**

**"El microbioma de las Cactáceas: una
comparativa entre dos especies simpátricas"**

Tesis que presenta

M. en C. CITLALI FONSECA GARCÍA

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la Especialidad de

Biología de Plantas

Directora de Tesis: **Dra. Laila P. Partida Martínez**

Irapuato, Gto.

Abril, 2016

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN - Unidad Irapuato, Departamento de Ingeniería Genética, Laboratorio de Interacciones Microbianas bajo la dirección de la Dra. Laila Pamela Partida Martínez, gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los Proyectos CB-2010-01-151007, INFR-2012-01-187799 y la beca 22586. Además de los apoyos otorgados por el donativo de Casa Herradura-Brown Forman, el apoyo en especie de Tequila Real de Pénjamo y la colaboración con el Departamento de Energía del JGI bajo el Programa de Comunidad Científica con el proyecto No. DE-AC02-05CH11231.

Este trabajo se realizó del 1 de Septiembre del 2011 al 3 de Febrero del 2016.

Miembros del comité de asesores:

Dr. Francisco Barona Gómez

Dra. Mercedes G. López Pérez

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez

Dra. Valeria F. Souza Zaldívar

Fecha de examen de grado: 8 de Abril de 2016.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Laila P. Partida Martínez, tutora de la presente tesis, agradezco profundamente el gran apoyo brindado durante la realización de este trabajo. Su capacidad intelectual, entusiasmo y pasión por investigar son ejemplos que me han formado y que deseo seguir el resto de mi vida académica. ¡Dra. Laila, gracias por su guía y apoyo más allá de lo académico!

A los miembros del comité tutorial, Dra. Gabriela Olmedo, Dra. Mercedes López, Dra. Valeria Souza y Dr. Francisco Barona, por sus valiosas aportaciones durante la realización de esta tesis.

A los miembros del Laboratorio de Interacciones Microbianas, especialmente a la IQ Nelida Vázquez por su invaluable apoyo, cariño y amistad. A los eternos compañeros y amigos del LIM: Alicia, Etzel, Damaris, Crystabel, Diana, Beto, Octavio y Fernando Astudillo, por los increíbles momentos que pasamos juntos que hicieron inolvidable mi estancia en el lab.

A Lupita, Chelito, Pablo, Berenice y Omar, quienes emprendieron este camino junto conmigo en diferentes momentos, y que gracias a su entusiasmo y dedicación, ahora vemos culminado. ¡Gracias hijos míos!

A mis amigos de siempre, Ely, Adán, Julieta, Manuel, Sandy, Pepe y José Luis, por su cariño y apoyo incondicional. Agradezco los invaluable momentos que hemos vivido a lo largo de mi estancia en el CINVESTAV, los llevo siempre en mi mente y en mi corazón.

A Carlos González, por su infinito apoyo y comprensión. Por estar conmigo en los momentos difíciles y siempre decir las palabras exactas que le dan paz a mi alma. Carlos, gracias por llegar a mi vida y alimentar mi espíritu con tu amor y humildad.

A mi familia, Gerardo (papá), Carmen (mamá), Xochitl y Abril (sistersnax), los pilares y compañeros de mi vida, a quienes les debo todo lo que soy. Su ejemplo de lucha, sacrificio y amor han sido la principal motivación que me ha llevado hasta esta instancia. ¡Gracias familia, los amo!

Resumen

Las Cactáceas son plantas que han sufrido profundos cambios morfológicos y metabólicos con el fin de adaptarse a hábitats caracterizados por largos períodos de sequía y escasez de nutrientes. A pesar de su importancia, poco se conoce acerca de las asociaciones que establecen los Cactus con los microorganismos y el papel de éstos en la adecuación de dichas plantas. Por lo tanto, en este trabajo se analizó la composición y diversidad de las comunidades microbianas asociadas a los Cactus, así como los factores que determinan su conformación y los posibles mecanismos de interacción planta-microorganismo.

Para ello, seleccionamos dos especies de Cactus silvestres con crecimiento simpátrico en el estado de Guanajuato: *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) y *Opuntia robusta* (Opuntioideae). Analizamos seis comunidades diferentes (suelo y suelo cercano a la raíz; rizósfera y filósfera; endósfera de la raíz y del tallo) de tres plantas sanas de cada especie en dos sitios, en dos temporadas diferentes y durante dos años consecutivos. Se investigó la composición de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos mediante huella genética con DGGE y secuenciación Illumina, utilizando el gen 16S ARNr como marcador molecular de bacterias y el ITS2 en los hongos.

Los análisis moleculares mostraron que las comunidades de bacterias/arqueas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* están compuestas principalmente por Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria, mientras que las comunidades de los hongos están dominadas por Ascomycetes de las clases Dothideomycetes, Sordariomycetes y Eurotiomycetes, presentando estos últimos, cierta especificidad por el huésped. Los análisis estadísticos revelaron que el tipo de comunidad explicó la mayor variación en ambos conjuntos de datos y que la diversidad microbiana fue más alta en el suelo y más baja en la endósfera del tallo de ambas especies de Cactus. Interesantemente, a diferencia de otros sistemas, la diversidad bacteriana fue más alta en la filósfera que en la rizósfera, observándose lo contrario en los hongos.

El aislamiento y la caracterización bioquímica de cepas bacterianas aisladas de semilla tales como: *Psychrobacillus psychroduran*, *Nocardiopsis prasina* y *Leclercia adecarboxylata* demuestran que estos microorganismos son xerotolerantes, termotolerantes, productores de exopolisacáridos y promotores de crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos directos e indirectos. Por último, el análisis funcional de la rizósfera basado en el metagenoma demuestra que los rizomicroorganismos poseen la maquinaria genómica para tolerar el calor, la desecación, el bajo contenido de nutrientes y de promover el crecimiento por mecanismos directos e indirectos. Estos estudios han dado luz a las reglas de ensamblaje y diversidad de las comunidades de bacterias, arqueas y hongos en Cactáceas, dando pie a futuras investigaciones en aspectos básicos en la biología de los mecanismos de asociación e interacción planta-microorganismo y en aspectos con enfoques biotecnológicos para una futura aplicación en el sector agrícola en zonas no aptas para la agricultura.

Abstract

Cacti are plants that have undergone profound morphological and metabolic changes to adapt to harsh habitats characterized by long drought periods and nutrient scarcity. Notwithstanding their relevance, little is known about the associations Cacti establish with microorganisms and their role in plant health and productivity. Therefore, we analyzed the composition and diversity of microbial communities associated with Cacti and investigated the factors that play a major role in their conformation and the potential mechanisms underlying plant-microbe interactions.

To achieve this, we selected two sympatric Cacti species growing under natural conditions in Guanajuato: *Myrtillocactus geometrizans* (Cactoideae) and *Opuntia robusta* (Opuntioideae). We sampled six different communities (soil and root-zone-soil; rhizosphere and phyllosphere; root and stem endosphere) from three healthy plants of each species in two sites, at two different seasons and during two consecutive years. We investigated the composition of the bacterial/archaeal and fungal communities by DGGE fingerprinting and Illumina sequencing using the 16S rRNA gene for bacteria/archaea and the ITS2 for fungi.

Molecular analyses showed that bacterial/archaeal communities associated with *M. geometrizans* and *O. robusta* are mainly composed by Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria, whereas fungal communities are dominated by members of the Acomycotan classes Dothideomycetes, Sordariomycetes and Eurotiomycetes with some specificity to the host. Statistical analyses revealed that the plant compartment explained the major variance in both data sets. Bacterial and fungal diversity was found to be highest in the soil and lowest in the endosphere in both Cacti species. Interestingly, contrary with other systems, bacterial diversity was higher in the phyllosphere than in the rhizosphere, while the opposite was observed in fungi.

Isolated and biochemically characterized seed-borne bacteria like *Psychrobacillus psychroduran*, *Nocardiopsis prasina* and *Leclercia adecarboxylata* show that these strains are drought tolerant, thermotolerant, exopolysaccharides producers and promoters of plant growth through various direct and indirect

mechanisms. Finally, the functional analyses of the rhizosphere based on metagenomics approach show that the rhizomicrobes have the genomic machinery to tolerate heat, desiccation, low nutrient content and promote growth through direct and indirect mechanisms. These studies provide knowledge about the rules of assembly of communities of bacteria, archaea and fungi in Cacti, giving rise to further research questions in basic aspects of the biology of plant-microbe interactions as well as in biotechnology, where future applications in the agriculture of arid and semiarid zones are envisioned.

Índice de contenido

1. Introducción	1
1.1 ¿Qué es una comunidad microbiana?	1
1.1.1 Unidades de diversidad microbiana.....	2
1.2 Comunidades microbianas asociadas a las plantas	3
1.2.1 Comunidades microbianas epífitas de la raíz.....	4
1.2.2 Comunidades microbianas epífitas del área foliar.....	7
1.2.3 Comunidades microbianas de la endósfera	8
2. Antecedentes	11
2.1 Comunidades microbianas en sistemas áridos y semiáridos.....	11
2.1.1 Modelo de estudio: Cactáceas	12
2.1.1.1 Comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. Materiales y métodos	19
6.1 Selección de especies y sitios de muestreo.....	19
6.1.1 <i>Myrtillocactus geometrizans</i>	22
6.1.2 <i>Opuntia robusta</i>	23
6.2 Determinación del tamaño de la muestra	23
6.3 Diseño experimental	24
6.4 Procesamiento de las muestras y extracción de ADN	25
6.5 Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S (V4) y la región ITS2 de las muestras del 2012	26
6.6 Procesamiento de los datos de secuenciación etiquetada (iTags)	28
6.7 Huella genética del gen ARNr 16S (V6-V8) por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y secuenciación de las bandas de DGGE para las muestras de endósfera del 2012 y 2013.....	29
6.8 Análisis de imagen de los geles de DGGE	31

6.9 Bibliotecas y secuenciación metagenómica de las muestras de rizósfera del 2012	32
6.10 Procesamiento de los datos de secuenciación de los metagenomas de rizósfera.....	33
6.11 Análisis estadístico	34
6.12 Aislamiento de los microorganismos asociados a semilla	36
6.13 Caracterización bioquímica <i>in vitro</i> de los microorganismos aislados de semillas	37
6.13.1 Tolerancia a estrés hídrico <i>in vitro</i>	37
6.13.2 Promoción de crecimiento por mecanismos directos	38
6.13.3 Promoción de crecimiento por mecanismos indirectos.....	40
7. Resultados.....	42
Capítulo I. Comunidades microbianas asociadas a <i>M. geometrizzans</i> y <i>O. robusta</i>	42
7.1.1 Introducción.....	43
7.1.2 Distribución taxonómica de las comunidades microbianas por factor ..	44
7.1.3 Composición taxonómica de las comunidades de bacterias/arqueas ..	47
7.1.4 Composición taxonómica de las comunidades de hongos	52
7.1.5 Discusión.....	54
Capítulo II. Diversidad de las comunidades microbianas asociadas a <i>M. geometrizzans</i> y <i>O. robusta</i>	57
7.2.1 Introducción.....	58
7.2.2 Diversidad de bacterias y arqueas en las Cactáceas	59
7.2.3 Diversidad de hongos en las Cactáceas	63
7.2.4 Discusión.....	65
Capítulo III. Factores que determinan la estructura de las comunidades microbianas asociadas a <i>M. geometrizzans</i> y <i>O. robusta</i>	68
7.3.1 Introducción.....	69
7.3.2 Factores que modulan las comunidades de bacterias/arqueas en Cactáceas.....	69
7.3.3 Factores que modulan las comunidades de hongos en Cactáceas	72
7.3.4 Discusión.....	76
Capítulo IV. “Core” microbiano con otras especies CAM	78

7.4.1	Introducción.....	79
7.4.2	“Core” de bacterias/arqueas entre las simpátricas especies CAM	79
7.4.3	“Core” de hongos entre las simpátricas especies CAM.....	83
7.4.4	Discusión.....	91
Capítulo V. Endófitos bacterianos sujetos a perturbaciones temporales.....		93
7.5.1	Introducción.....	94
7.5.2	Dinámica de las comunidades de bacterias/arqueas endófitas.....	94
7.5.3	Discusión.....	102
Capítulo VI. Patrones funcionales de las comunidades microbianas asociadas a <i>M. geometrizans</i> y <i>O. robusta</i>		104
7.6.1	Bacterias de posible transferencia vertical y su capacidad de promoción de crecimiento	105
7.6.1.1	Introducción.....	105
7.6.1.2	Aislamiento de microorganismos asociados a semilla de <i>M. geometrizans</i> y <i>O. robusta</i>	106
7.6.1.3	Caracterización bioquímica de la capacidad de promoción de crecimiento y tolerancia a estrés hídrico de las bacterias asociadas a semilla	109
7.6.2	Análisis metagenómico de las comunidades rizosféricas asociadas a <i>M. geometrizans</i> y <i>O. robusta</i>	112
7.6.2.1	Introducción.....	112
7.6.2.2	Perfiles funcionales de los metagenomas de rizósfera	113
7.6.3	Discusión.....	122
8.	Conclusiones	125
9.	Perspectivas.....	128
10.	Referencias.....	131
11.	Apéndices.....	146

1. Introducción

1.1 ¿Qué es una comunidad microbiana?

Los microorganismos no sólo son los más antiguos y más diversos organismos que habitan el planeta tierra, sino que también representan la mayor biodiversidad y son las fuerzas impulsoras de los principales procesos biogeoquímicos. La continua interacción entre microorganismos es fundamental para el desarrollo de las condiciones ambientales del planeta, que además, dio lugar a la evolución de organismos multicelulares (Madigan et al., 2004). Para tener un mayor entendimiento acerca de la continua interacción entre microorganismos y cuáles son sus funciones en una comunidad, es importante conocer primero cómo es que una comunidad microbiana está constituida.

El concepto de comunidad ecológica surgió en la ecología vegetal y animal (Clements, 1916). Una comunidad ha sido definida como el conjunto de múltiples especies, en el que los organismos viven juntos en un entorno contiguo e interactúan entre sí. Esta disciplina pretende el análisis de cómo se estructuran los conjuntos biológicos, cuáles son sus interacciones funcionales y cómo cambia la estructura de la comunidad en el espacio y el tiempo (Konopka, 2009; Magurran, 1988; Odum, 2004).

En la ecología microbiana, se ha intentado acoplar la definición antes mencionada, pero han surgido algunos problemas. Especialmente, la delimitación de un "entorno contiguo" y el significado de "interactuar" pueden ser muy cuestionados. Los microorganismos reaccionan bajo ciertas condiciones y a su vez influyen en sus microambientes, que normalmente, tienen longitudes de escala de micras en lugar de milímetros. Sin embargo, existen casos como los sedimentos saturados de agua donde se pueden generar gradientes químicos por varios metros, dando como consecuencia una interacción metabólica continua en grandes distancias. Como resultado, la definición de una escala espacial y la interacción entre organismos puede variar significativamente entre comunidades microbianas y ésta quedará definida por el criterio de cada investigador. Sin embargo, el estudio de las comunidades microbianas ha permitido conocer más

acerca de "quiénes están ahí" y ha aumentado el interés en entender "qué es lo que están haciendo" en diferentes ambientes (Konopka, 2009).

1.1.1 Unidades de diversidad microbiana

La basta generación de datos que se han forjado durante la llamada era genómica ha ido acompañada de debates que ponen en duda la existencia de cualquier visión coherente de la naturaleza genética de las especies microbianas. Además, la importancia de la frecuencia de recombinación, ya sea en forma de recombinación homóloga o mediante transferencia horizontal de genes, han desafiado muchos conceptos y han planteado muchas preguntas (Fraser et al., 2007; Pace, 2006). Preguntas como: ¿Cuáles son las unidades de diversidad microbiana? La respuesta a esta problemática es un poco compleja, debido a que las especies microbianas están actualmente definidas por un enfoque pragmático, polifásico que se basa en reglas claras para las propiedades genotípicas y fenotípicas (Vandamme et al., 1996). Este enfoque pragmático ha servido a la comunidad y está siendo adaptado a la era genómica. Sin embargo, en los datos genómicos no se puede depender de las características morfológicas o funcionales con las cuales podamos asignar un papel ecológico equivalente a los microorganismos (Martiny et al., 2013). Comúnmente, se hace uso de las filogenias moleculares, aprovechando que los microorganismos pueden intercambiar genes a través de grandes distancias filogenéticas (Fraser et al., 2009). Por lo tanto, los análisis de datos de comunidades microbianas se han basado en la inferencia filogenética derivada de genes altamente conservados que se heredan en forma vertical (por ejemplo, secuencias de los genes del ARN ribosomal (ARNr) 16S y 18S), o en clústeres de múltiples genes (Eisen, 1998).

La unidad más común de la diversidad en la ecología microbiana es la "Unidad Taxonómica Operacional" (OTU, por su siglas en inglés, equivalentemente, filotipo), los cuales son grupos de secuencias derivadas del medio ambiente basadas en la similitud de sus nucleótidos. Por ejemplo, el 97% de similitud entre secuencias del gen ARNr 16S se utiliza a menudo como una estimación aproximada de grupos de especies bacterianas, con base en una

definición de especie establecida mediante hibridación ADN-ADN (Stackebrandt and Goebel, 1994). Sin embargo, muchos investigadores abogan por una diferencia de la diversidad microbiana a escala más fina, utilizando diferencias individuales en pares de bases en las secuencias marcadoras e información contextual en relación con el medio ambiente (por ejemplo, ecotipos) (Gibbons and Gilbert, 2015). Para los ecólogos microbianos, la situación óptima podría implicar el uso de herramientas moleculares (para facilitar el análisis de la muestra y mayor resolución) combinadas con una comprensión de cómo esta información se relaciona con la morfología, fisiología y comportamiento con el fin de entender la biogeografía de los rasgos funcionales, y no sólo a las entidades taxonómicas.

1.2 Comunidades microbianas asociadas a las plantas

Las plantas son universalmente y persistentemente habitadas por microorganismos, conformados principalmente por Arqueas, Bacterias, Hongos, Protozoos y Virus (Turner et al., 2013a). Al conjunto de estos microorganismos también se le conoce como “microbioma” y, a la suma de éstos con la planta huésped, se le ha definido recientemente como “holobionte” (Bordenstein and Theis, 2015; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011; Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008).

Prácticamente todos los tejidos de una planta son colonizados por microorganismos, desde la superficie de las raíces y área foliar hasta los tejidos internos. Los microorganismos de la superficie de las plantas (cerca o sobre el tejido de la planta) se consideran epífitos, mientras que los microorganismos que viven dentro de los tejidos de la planta, se consideran endófitos. Los microorganismos en estos hábitats pueden establecer asociaciones beneficiosas, neutras o perjudiciales de diversa intensidad con sus plantas huéspedes (Medina and Sachs, 2010).

El microbioma no es un habitante pasivo en las plantas, sino todo lo contrario, ya que alteran el desarrollo, fisiología y defensas sistémicas, permitiendo la resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés abiótico como sequía y modulan la adecuación del huésped en las interacciones con los

competidores, depredadores y patógenos (Partida-Martínez and Heil, 2011; Turner et al., 2013a). Debido a que el microbioma puede abarcar un mayor número de genes que el del genoma de la planta huésped y que esta asociación planta-microbioma puede variar en espacio y tiempo, gran parte de su fenotipo es el producto de la co-expresión de sus propios genes y de los genes microbianos (hologenoma), influenciados a su vez por el ambiente en el que se encuentran (Berg et al., 2015; Bordenstein and Theis, 2015; Partida-Martínez and Heil, 2011; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011).

Una pregunta fundamental en ecología microbiana es conocer cuáles son los factores que modulan las comunidades microbianas. Diferentes estudios han establecido que los factores ambientales y factores bióticos influyen en diferentes proporciones en la estructura de las comunidades microbianas (Bulgarelli et al., 2012, 2015; Edwards et al., 2015; Hunter et al., 2010; Lundberg et al., 2012). Aunque la identificación de los patrones de ensamblaje para las comunidades microbianas es difícil debido a la complejidad de los factores bióticos y abióticos, así como de los eventos estocásticos involucrados, varios estudios recientes han mostrado que el genotipo de la planta es un factor importante que influye en la composición microbiana (Ikeda et al., 2010; Sapkota et al., 2015).

Se ha sugerido que la manipulación del microbioma de las plantas podría reducir la incidencia de las enfermedades en las plantas, incrementar la producción agrícola, reducir la aplicación de agroquímicos y reducir la emisión de los gases de invernadero, trayendo como resultado prácticas sustentables en la agricultura (Turner et al., 2013a).

1.2.1 Comunidades microbianas epífitas de la raíz

En las plantas, las raíces son el principal sitio de interacción con los microorganismos, siendo la interfaz para la asociación con los microorganismos del suelo, considerado este último, como la mayor reserva de diversidad microbiana (Dumbrell et al., 2010; Lundberg et al., 2012; Makhalanyane et al., 2015; Mendes et al., 2015; Turner et al., 2013a). Las raíces son una importante fuente de compuestos orgánicos, lo que contribuye al intercambio gaseoso,

consumo de nutrientes inorgánicos y una gran influencia en la estructura y actividad biológica del suelo.

Hasta la fecha, se han definido dos microhábitats colonizados por los microorganismos epífitos asociados a las raíces, los cuales comprenden el suelo adherido a las raíces (rizósfera) y la zona superficial (rizoplano) de las mismas (Figura 1; Reinhold-Hurek et al., 2015). A continuación se describen las principales características de estos microhábitats y cómo están conformados sus microbiomas.

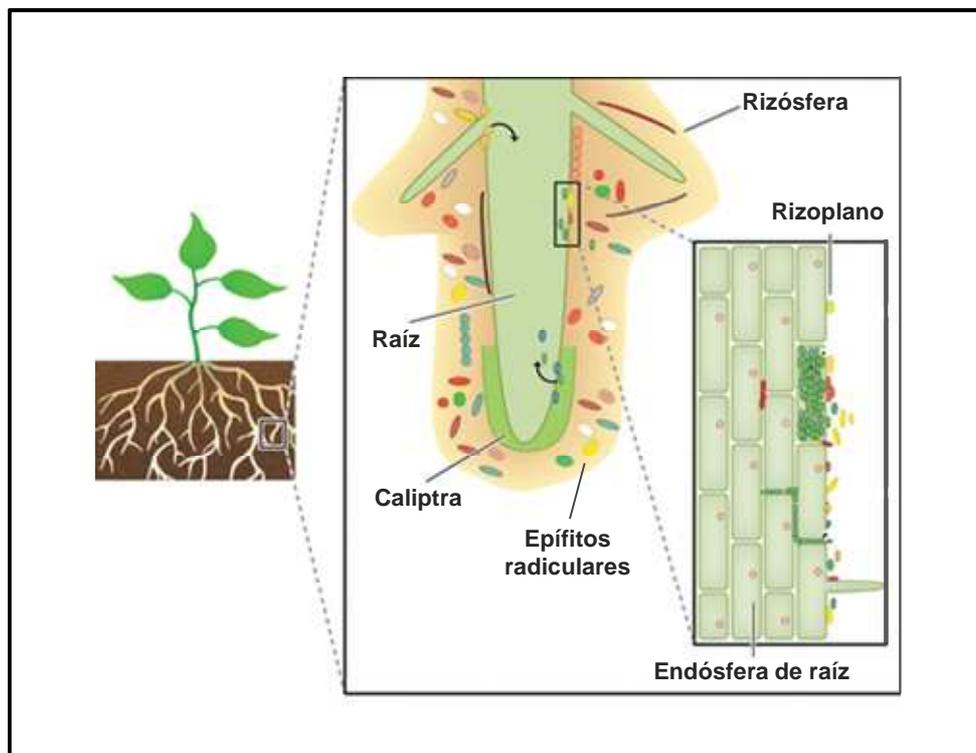


Figura 1. Representación esquemática de los microhábitats de la raíz colonizados por microorganismos. Modificado de Reinhold-Hurek et al., 2015.

Rizósfera

La rizósfera es la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas a través de la producción de exudados y mucílago (Atlas and Bartha, 1998). Los exudados de la raíz contienen una gran variedad de compuestos como ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antimicrobianos (Bertin et al., 2003). La

composición de los exudados de las raíces puede variar entre las especies de plantas y cultivares (Bulgarelli et al., 2015; Micallef et al., 2009), con la edad de la planta y la etapa de desarrollo (Turner et al., 2013a). Los exudados de la raíz son determinantes en la estructura del microbioma de la rizósfera (Dennis et al., 2010; Micallef et al., 2009), y a su vez, el microbioma influye en la composición de los exudados (Bulgarelli et al., 2012; Dennis et al., 2010).

Estudios de microbiomas de la rizósfera de diferentes especies de plantas, han revelado pocas diferencias en las distribuciones taxonómicas a nivel de filum (Bulgarelli et al., 2012, 2015; Lundberg et al., 2012; Turner et al., 2013b). Además, en comparación con las comunidades microbianas del suelo, tampoco se han observado diferencias contrastantes (Edwards et al., 2015; Lundberg et al., 2012; Mendes et al., 2014). Los filia bacterianos más predominantemente observados en la rizósfera han sido los filia Proteobacteria (Alfa y Betaproteobacteria, principalmente), Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomicetes, Verrucomicrobia y Acidobacteria (Bulgarelli et al., 2015; Lundberg et al., 2012; Mendes et al., 2014; Turner et al., 2013a, 2013b). Mientras que las comunidades fúngicas han sido dominadas por los filia Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota, recibiendo principal atención los hongos micorrízicos (Bonfante and Anca, 2009; Bonfante and Genre, 2015; Turner et al., 2013b).

Por un amplio periodo de tiempo, diferentes estudios en la rizósfera se han enfocado en las bacterias promotoras del crecimiento vegetal presentes en este microhábitat, las cuales interactúan a través de una gran variedad de mecanismos (Bloemberg and Lugtenberg, 2001). En primera instancia, se han abordado a las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, incluyendo aquellas que son de vida libre (como *Azotobacter* spp.) y con actividad simbiótica directa (como *Rhizobium* spp., formadoras de nódulos), y a las bacterias con capacidad de solubilizar fosfatos minerales, las cuales proporcionan una fuente de nitrógeno y aumentan la biodisponibilidad de fósforo para la planta. Al mismo tiempo, se ha estudiado la capacidad de los microorganismos (bacterias y hongos, principalmente) en manipular ciertas hormonas vegetales como auxinas, giberelinas y etileno, que se

ha observado conduce a una promoción de crecimiento y tolerancia a diferentes tipos de estrés en la planta (Turner et al., 2013a, 2013b).

Muchas bacterias presentes en la rizósfera que promueven el crecimiento vegetal actúan antagónicamente hacia patógenos de las plantas mediante la producción de compuestos antimicrobianos o mediante la intervención de los factores de virulencia a través de efectores transportados por el sistema de secreción tipo 3 (SST3) (Jimenez-Guerrero et al., 2013).

Rizoplano

El rizoplano es la epidermis de la raíz y la corteza exterior, donde las partículas del suelo y microorganismos se adhieren (Reinhold-Hurek et al., 2015). Además de los exudados radicales, la liberación de mucílago y polímeros de la pared de las células vegetales, tales como celulosa y pectina, son componentes importantes en el rizoplano (Dennis et al., 2010).

Muy pocos estudios han abordado la comparación del microbioma presente en el rizoplano con otros compartimentos. Investigaciones realizadas en arroz y en árboles de los bosques tropicales, compararon el microbioma presente en el rizoplano con el suelo mediante la secuenciación de fragmentos del gen ARNr 16S (Edwards et al., 2015; Oh et al., 2012). Los análisis de diversidad mostraron menor diversidad en el rizoplano que en el suelo, al igual que diferente composición taxonómica, resultados contrastantes con lo observado en la rizósfera. Los filo Bacteroidetes y Proteobacteria mostraron un enriquecimiento en el rizoplano, indicando una selección de las comunidades microbianas presentes en la superficie de la raíz.

1.2.2 Comunidades microbianas epífitas del área foliar

El área foliar de las plantas está conformada por las hojas, tallos, brotes, flores y frutos, los cuales proporcionan un hábitat apto para la interacción con microorganismos. A la superficie del área foliar de las plantas se le denomina filósfera, y puede ser colonizada por diversos microorganismos denominados epífitos foliares (Kembel et al., 2014; Vorholt, 2012). Se estima que a nivel

mundial, la filósfera abarca más de 10^8 km² y es colonizada por hasta 10^{26} células bacterianas (Lindow and Brandl, 2003), y, aunque la población de hongos aún no se ha estimado, se especula que pueden ser hasta $10^{3.4}$ células (Vorholt, 2012).

Los epífitos foliares están expuestos directamente a los cambios medioambientales e indirectamente influenciados por el metabolismo de la planta. Además, la cutícula serosa hidrofóbica que cubre las células epidérmicas reduce la evaporación del agua, así como la lixiviación de los metabolitos vegetales, lo que resulta en un ambiente oligotrófico. Además de la limitación de nutrientes, los microorganismos deben hacer frente a la radiación ultravioleta y a la fluctuante disponibilidad de agua, y como consecuencia, estos organismos se distribuyen a menudo de forma irregular sobre la superficie foliar y se multiplican desigualmente.

Varios estudios basados en métodos independientes de cultivo han revelado información sobre la composición del microbioma de la filósfera. En general, la riqueza de especies en las comunidades microbianas de filósfera es alta y la distribución taxonómica es variable entre las diferentes zonas ambientales, exhibiéndose mayor diversidad en las regiones tropicales (revisado de Vorholt, 2012). Sin embargo, en comparación con las comunidades de la rizósfera y el suelo, la diversidad bacteriana se reduce en la filósfera, lo que no es de sorprender, ya que la mayor parte del área foliar suele tener una vida útil relativamente corta y con bajos recursos nutrimentales. La mayoría de los estudios sobre la identidad de los microorganismos en la filósfera se han centrado en bacterias, en menor medida los hongos y aparentemente las arqueas no son abundantes en la filósfera (revisado de Vorholt, 2012). Diferentes métodos empleados en estos estudios han demostrado que algunos filo bacterianos, como Proteobacteria, Bacteroidetes y Actinobacteria, predominan en la filósfera de distintas especies de plantas (Hunter et al., 2010; Whipps et al., 2008).

1.2.3 Comunidades microbianas de la endósfera

Uno de los hábitats microbianos más recientemente descubierto es el interior de las plantas sanas, el cual es colonizado por los llamados microorganismos endófitos (Partida-Martínez and Heil, 2011). Estos microorganismos generalmente

no se consideran patógenos y no causan síntomas visibles de colonización, aunque pueden incluir patógenos latentes, que dependiendo de las circunstancias ambientales y genotipo del huésped, pueden desencadenar el proceso de patogénesis (Partida-Martínez and Heil, 2011; Turner et al., 2013a).

Los microorganismos endófitos presentan dos sistemas de transmisión hacia la planta huésped: a) vertical a través de las semillas, donde la gran mayoría depende estrictamente de la actividad de la planta para su sobrevivencia y crecimiento; y b) horizontal, los cuales en alguna etapa de su ciclo de vida pueden sobrevivir fuera de la planta huésped para luego ingresar en ella por aperturas naturales (grietas o estomas) o empleando mecanismos de rompimiento de la pared celular (Rodríguez et al., 2009).

Particularmente en los tejidos internos de la raíz, se considera que los endófitos son una subpoblación del microbioma de la rizósfera y rizoplano (Edwards et al., 2015; Gaiero et al., 2013; Lundberg et al., 2012), aunque también se ha observado poseen características diferentes a estos hábitats, lo que sugiere que no todos los microorganismos de la rizósfera y rizoplano pueden penetrar los tejidos de las raíces y adaptarse al nuevo ambiente (Reinhold-Hurek et al., 2015; Sessitsch et al., 2012). Se presume que en los tejidos aéreos, los endófitos pueden provenir ascendentemente de las raíces y de las semillas. Sin embargo, los niveles de colonización de endófitos son generalmente más bajos en las partes aéreas que en las raíces, lo que sugiere que aunque hay algo de movimiento de los endófitos hacia la parte aérea, tal vez este movimiento es limitado, considerando entonces a aquellos microorganismos que poseen mecanismos de degradación de la pared celular provenientes de la filósfera (Turner et al., 2013a).

Estudios enfocados en evaluar los mecanismos de interacción que mantienen los endófitos con el huésped, han revelado que los endófitos confieren efectos beneficiosos para la planta, como la protección contra los patógenos invasores y herbívoros (artrópodos), ya sea a través de antibiosis o a través de la resistencia inducida, y la promoción del crecimiento vegetal (Bacon and Hinton, 2006; Hardoim et al., 2015). Generalmente, los endófitos pueden tener efectos neutros o perjudiciales para la planta huésped bajo condiciones de crecimiento

normales, mientras que pueden ser beneficiosos en condiciones más extremas o durante diferentes etapas del ciclo de vida de la planta. Por ejemplo, el hongo *Fusarium verticillioides* tiene una doble función, tanto como patógeno y como endófito beneficioso en el maíz (Bacon et al., 2008). El equilibrio entre estos dos estados depende no solo del genotipo del huésped, sino también localmente se producen factores de estrés abiótico que afectan a la planta huésped, dando como resultado la distorsión del delicado equilibrio y la aparición de síntomas de la enfermedad en la planta y la producción de micotoxinas por el hongo (Bacon et al., 2008). Sin embargo, efectos beneficiosos también se han demostrado, por ejemplo, las cepas del hongo endófito *F. verticillioides* suprimen el crecimiento de *Ustilago maydis*, otro hongo patógeno del maíz (Rodríguez Estrada et al., 2012).

2. Antecedentes

2.1 Comunidades microbianas en sistemas áridos y semiáridos

Las regiones áridas y semiáridas representan el principal ecosistema en la superficie terrestre (McGinnies, 1979; Peel et al., 2007). Las plantas en estas regiones están sujetas a diferentes estreses ambientales como fluctuaciones de temperatura, alta radiación ultravioleta, escasos nutrientes en el suelo y periodos largos de sequía (Cline, 2007; Collins et al., 2008). Por consecuencia, los microorganismos del suelo y los asociados a estas plantas xerófitas también se someten a las mencionadas condiciones ambientales (Köberl et al., 2011).

Los estudios de las comunidades microbianas presentes en las regiones áridas y semiáridas se han enfocado principalmente en las comunidades del suelo y en las superficies rocosas (Andrew et al., 2012; Fierer et al., 2012; Makhalanyane et al., 2015; Pointing and Belnap, 2012; Porras-Alfaro et al., 2011). Estas comunidades microbianas median la entrada y salida de gases, nutrientes y agua de las superficies desérticas, así como la regulación de la erosión, la estabilidad del suelo y los ciclos de nutrientes (Pointing and Belnap, 2012). Los ambientes con aridez han mostrado diferencias marcadas con respecto a otros ambientes en la composición y función de las comunidades microbianas del suelo (Fierer et al., 2012). Análisis metagenómicos de comunidades microbianas de diferentes ambientes demostraron que los ambientes desérticos muestran la más baja diversidad filogenética y funcional, aunque, la diversidad taxonómica fue mayor de lo que se había especulado (Fierer et al., 2012).

Los suelos áridos han presentado un grupo generalizado de filo bacterianos incluyendo Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes y Cyanobacteria, encontrándose los últimos tres con mayor abundancia en suelos áridos que en otros ambientes (Chanal et al., 2006; Connon et al., 2007; Fierer et al., 2012). Los taxones de arqueas se consideran relativamente raros a lo largo de los diferentes ambientes, sin embargo, se ha observado que son relativamente abundantes en los ambientes con aridez, siendo el filum *Thaumarchaeota* el más representado (Fierer et al., 2012). Numerosos linajes fúngicos se han reportado de los ambientes áridos, donde la mayoría de los

estudios se han realizado con métodos dependientes de cultivo, aislando principalmente miembros de los fila Basidiomycota y Ascomycota (Fierer et al., 2012).

En los suelos desérticos pobres en nutrientes, las plantas proporcionan hábitats diversificados, ricos en recursos. En entornos limitantes de nutrientes y agua, la hipótesis de la isla de recursos sugiere que la diversidad microbiana debe ser mayor en los diferentes compartimentos de las plantas (Herman et al., 1995). Sin embargo, muy pocos estudios se han realizado acerca de las comunidades microbianas asociadas a plantas xerófitas (Khidir et al., 2010; Massimo et al., 2015; Porrás-Alfaro et al., 2008), a pesar de que se tiene el antecedente de que las comunidades microbianas influyen fuertemente en la adecuación de las plantas (revisado de Partida-Martínez and Heil, 2011; Reinhold-Hurek et al., 2015; Turner et al., 2013a; Vorholt, 2012). La generación de investigación en este campo aportaría valiosa información en el mejoramiento de las prácticas agrícolas en zonas desérticas, las cuales se encuentran particularmente amenazadas a medida que aumenta la temperatura y se afectan los patrones de precipitación por los efectos del cambio climático.

2.1.1 Modelo de estudio: Cactáceas

Las Cactáceas en conjunto con los Agaves y otras plantas xerófitas, representan las principales especies vegetales en los ecosistemas áridos y semiáridos en el continente Americano (Bravo Hollis and Sheinvar, 1999; Hernández-Hernández et al., 2014). Las Cactáceas son originarias de dicho continente y, aunque no se tienen fósiles de ellas que puedan dar información sobre su edad precisa, se estima se originaron hace 32.11 millones de años (Guzmán et al., 2007). La palabra Cactus proviene del Griego *kaktos*, refiriéndose a espinudo, a una planta tipo abrojo (Nobel, 2010). Actualmente, se reconocen aproximadamente 2,000 especies agrupadas en tres grandes subfamilias: *Pereskioideae*, *Cactoideae* y *Opuntioideae*. En México, son una familia de plantas que, además de ser muy ricas en variedad y endemismo, han marcado la cultura y la economía del país (Bravo Hollis and Sheinvar, 1999). Se reconocen 913 taxones entre especies y

subespecies aceptadas, agrupadas en 63 géneros. De éstos, 25 géneros (40% del total) que incluyen 518 especies y 206 subespecies son endémicas del país (Guzmán et al., 2007).

Las Cactáceas pertenecen a la clase dicotiledónea y cuentan con la misma morfología básica de las plantas con flor, integradas por raíz, tallo, hojas, flores, frutos y semillas (Nobel, 2003). Sin embargo, éstas se distinguen porque sus órganos han experimentado profundas modificaciones anatómicas para adaptarse al medio con aridez. Los cambios derivados de las adaptaciones producen en las Cactáceas una morfología distintiva: cuerpo hinchado protegido en la mayoría de los casos por una densa cubierta de espinas y una cutícula de 5-40 μm , lo que les permite almacenar el agua por largos periodos de tiempo y reducir su transpiración (Cerutti and Starosta, 1996). Presentan raíces superficiales con 10 cm aproximadamente de profundidad, facilitando la absorción rápida del agua de lluvia y el mantenimiento del balance osmótico interno. Además, a diferencia de otras plantas suculentas, donde las raíces representan del 30-50% de su biomasa total, los Cactus presentan un sistema radicular mucho más pequeño, con solo del 8-12% de su biomasa total, lo que conduce a una redirección de los recursos hacia los tallos (Nobel, 2010).

Estas plantas, presentan un metabolismo fotosintético modificado llamado CAM (por sus siglas en inglés, Crassulacean Acid Metabolism). A diferencia de las plantas con metabolismo C_3 y C_4 (metabolismos de tres y cuatro carbonos, respectivamente), los Cactus realizan el intercambio gaseoso de CO_2 y oxígeno por la noche, a fin de reducir la pérdida de agua por transpiración. Como la fotosíntesis requiere de la luz del sol para poderse llevar a cabo, las plantas CAM almacenan el CO_2 necesario para la fotosíntesis en forma de ácido málico, y en presencia de luz solar, este ácido es descarboxilado para producir nuevamente CO_2 . Dicho mecanismo les ha permitido a las Cactáceas sobrevivir en condiciones de extrema sequía y temperaturas elevadas superiores a los 70 $^{\circ}\text{C}$ (Nobel, 2010). Se ha considerado a *Opuntia ficus-indica* como la planta con metabolismo CAM con mayor tasa de adsorción de CO_2 con aproximadamente 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y con 1200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ bajo condiciones ideales de crecimiento, de cuatro a ocho veces

menos que las plantas con metabolismo C_3 y C_4 . Se estima que las plantas CAM pierden 80 veces menos moléculas de agua para fijar una molécula de CO_2 y pueden sobrevivir con 80-90% menos de su contenido de agua en condiciones extenuantes (Nobel, 2010).

A lo largo de la historia de México diferentes usos se le han atribuido a los Cactus. Diferentes especies de *Opuntia* (nopales) fueron utilizadas para una gran variedad de propósitos por los Aztecas. Por mencionar algunos, su capital Tenochtitlan en el siglo 15, fue nombrada considerando la palabra náhuatl *nōchtli* en referencia a la fruta del nopal, así como el vigente escudo de armas de México, que muestra un águila posada sobre un nopal devorando una serpiente (Aveni et al., 1988).

Actualmente, los Cactus se utilizan para la alimentación humana y como forraje para los animales, consumiéndose desde los tallos hasta los frutos de diferentes especies (Bravo Hollis and Sheinvar, 1999). Así mismo, se han empleado como agentes psicoactivos en la medicina herbal, debido a que algunas especies han demostrado contener compuestos químicos que pueden causar cambios en el estado de ánimo, la percepción y la cognición a través de sus efectos en el cerebro (Nobel, 2010). Además, una proyección biotecnológica enfocada en el tema de energías sustentables para los próximos 10 años, han posicionado a los Cactus en conjunto con los Agaves como las principales alternativas para la producción de biocombustibles a nivel mundial (Nobel, 2010).

2.1.1.1 Comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas

A pesar de la importancia ecológica, cultural y económica que poseen las Cactáceas, pocos estudios se han enfocado en analizar las comunidades microbianas asociadas a estas plantas. Algunos estudios previos han demostrado que las bacterias y los hongos son capaces de colonizar ampliamente el rizoplaneo de diferentes especies, como *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* y *Opuntia cholla* (Puente et al., 2004a). De hecho, algunas de estas cepas bacterianas han mostrado ser las responsables de la mineralización del material rocoso en el que habitan y de la movilización de minerales útiles a los Cactus y a

otras plantas del desierto incrementando su supervivencia (Loera et al., 1996; Lopez et al., 2011; Puente et al., 2004b, 2009b). Un estudio con métodos independientes de cultivo en la rizósfera de *Mammillaria carnea*, *Opuntia pilifera* y *Stenocereus stellatus*, mostró que los filas bacterianos Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria estuvieron ampliamente representados en estas especies (Aguirre-Garrido et al., 2012).

Estudios enfocados únicamente en los hongos asociados a los Cactus, han demostrado que la colonización de hongos micorrízicos mejora la captación de fósforo y zinc en *Ferocactus acanthodes*, y la absorción de CO₂, tanto en *F. acanthodes* como en *Opuntia ficus-indica* (Cui and Nobel, 1992). Además, un estudio sobre los hongos endófitos de los tallos de 21 especies de Cactus del desierto de Arizona, reveló baja diversidad e inespecificidad de los hongos endófitos por el huésped, encontrándose a *Alternaria* sp., *Aureobasidium pullulans* y *Phoma* spp. como los hongos más comunes asociados con estas especies de Cactus (Suryanarayanan et al., 2005).

Otro ejemplo notable es el hallazgo de dos hongos endófitos *Chaetomiium chiversii* y *Paraphaeospharia quadrisepata* encontrados en algunos Cactus, tales como *Cylindropuntia leuptocalis*. Estos hongos endófitos son capaces de producir dos inhibidores de la proteína HSP-90 (Heat Shock Protein): radicicol y monocilin I (Turbyville et al., 2006). La proteína HSP-90 regula a su vez la expresión de las proteínas HSP-70 y HSP-101 responsables de conferir resistencia térmica a la planta. Por ello, la presencia de *C. chiversii* y *P. quadrisepata* en los tejidos de la planta aumenta la capacidad del huésped en su resistencia al estrés térmico (McLellan et al., 2007). En conjunto, estos estudios sugieren que las asociaciones que mantienen los Cactus con los microorganismos pueden ser importantes para su adaptación y supervivencia.

3. Justificación

Las Cactáceas son plantas que han sufrido profundos cambios morfológicos y metabólicos con el fin de adaptarse a hábitats caracterizados por largos períodos de sequía y escasez de nutrientes. Investigaciones en diversas especies de plantas, han demostrado que las asociaciones con microorganismos influyen de manera importante en la salud y productividad vegetal. En las Cactáceas, a pesar de su importancia ecológica y económica, pocos estudios se han enfocado en analizar la conformación de sus comunidades microbianas asociadas y cómo éstas influyen en la adecuación de sus huéspedes a los ambientes extremos.

Los pocos reportes que se tienen hasta el momento en Cactáceas, dan indicio de que las comunidades microbianas pudieran estar directamente involucradas en la tolerancia al estrés térmico y en la promoción de su crecimiento bajo condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, estos estudios basados en métodos tradicionales de cultivo, han sido localizados en un solo compartimento de la planta (rizósfera, principalmente) y enfocados en las comunidades de Bacterias y Hongos de manera independiente, dejando de lado totalmente el dominio Arquea. En consecuencia, los resultados obtenidos están sesgados a los microorganismos que se han podido cultivar y sin considerar que en la naturaleza, las comunidades de bacterias, arqueas y hongos interactúan continuamente entre ellos y con el ambiente.

Por lo anterior, es de importancia generar conocimiento acerca de las comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas con un enfoque global y con mayor resolución. Es decir, considerar en un mismo enfoque a los tres grupos microbianos principales: Bacterias, Arqueas y Hongos, sometidos al efecto de diversos factores ambientales y no ambientales, empleando métodos independientes como dependientes de cultivo.

4. Hipótesis

Hipótesis alternativa 1: Las comunidades microbianas asociadas a los Cactus presentarán patrones de diversidad y distribución taxonómica particulares para cada especie y compartimento analizado.

Hipótesis nula 1: Las comunidades microbianas asociadas a los Cactus presentarán patrones de diversidad y distribución similares para las especies de Cactus y compartimentos analizados.

Hipótesis alternativa 2: La estructura de las comunidades microbianas asociadas a los Cactus se verá influenciada por el efecto de la combinación de los factores ambientales y la planta huésped.

Hipótesis nula 2: La estructura de las comunidades microbianas asociadas a los Cactus estarán influenciadas principalmente por los factores ambientales.

Hipótesis alternativa 3: Los patrones de ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a los Cactus serán similares a los de otras especies CAM bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Hipótesis nula 3: Los patrones de ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a los Cactus serán distintos a los de otras especies CAM aunque estén bajo las mismas condiciones de crecimiento.

Hipótesis alternativa 4: Las comunidades microbianas asociadas a los Cactus presentarán mecanismos de interacción planta-microorganismo relacionados a la tolerancia a sequía y altas temperaturas.

Hipótesis nula 4: Las comunidades microbianas asociadas a los Cactus presentarán mecanismos de interacción planta-microorganismo independientes a la tolerancia a sequía y altas temperaturas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de los factores bióticos y abióticos en la conformación de las comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas y elucidar los posibles mecanismos de interacción planta-microorganismo.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificar las comunidades microbianas asociadas a las especies de Cactáceas propuestas, mediante métodos moleculares.
2. Estimar la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a las especies de Cactáceas propuestas.
3. Evaluar qué factores (bióticos y abióticos) influyen en la composición de las comunidades microbianas asociadas a las especies de Cactáceas estudiadas.
4. Evaluar si los patrones de ensamblaje de las comunidades microbianas observados en las Cactáceas se comparten con otras especies CAM bajo las mismas condiciones de crecimiento.
5. Elucidar algunos de los posibles mecanismos de interacción que establecen las comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas con sus plantas huésped, mediante métodos tradicionales de cultivo y moleculares.

6. Materiales y métodos

El conocimiento generado acerca de las asociaciones simbióticas que establecen las Cactáceas con sus microorganismos asociados ha sido sesgado principalmente por investigaciones centradas en métodos de cultivo y caracterización tradicional, limitando la investigación sólo en aquellos microorganismos que pueden ser cultivados bajo condiciones típicas de laboratorio. Por tal motivo, en el presente trabajo se abordó el análisis del microbioma de dos especies de Cactáceas mediante dos enfoques: (1) métodos independientes de cultivo, como secuenciación etiquetada de alto rendimiento y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante con el uso de marcadores moleculares, así como un básico análisis metagenómico; (2) métodos tradicionales de cultivo dirigidos a la comunidad asociada a semilla como posibles microorganismos de transferencia vertical.

6.1 Selección de especies y sitios de muestreo

Reportes indican que en el estado de Guanajuato se localizan al menos 87 especies de Cactáceas, de las cuales 6 especies son endémicas del estado (Guzmán et al., 2007). Tomando en cuenta la riqueza de Cactáceas presentes en el estado se consideraron una serie de criterios para la selección de las especies a estudiar en este trabajo, los cuales enlisto a continuación: 1) que presentarán amplia distribución en el estado, 2) que fueran de crecimiento silvestre y presentarán estado saludable, 3) que tuvieran relevancia ecológica, medicinal y/o económica, 4) de preferencia que fueran especies endémicas al territorio mexicano y, 5) que representarán grupos (subfamilias y/o subgéneros) diversos. En base a los criterios antes mencionados se seleccionaron dos especies de Cactáceas, *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta*, debido a que, entre otras características que se describen abajo, han sido citadas por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO, 2012) como especies de Cactáceas arborescentes de vida silvestre más ampliamente distribuidas, dominantes del paisaje del estado, y en algunas zonas, se encuentran en crecimiento simpátrico.

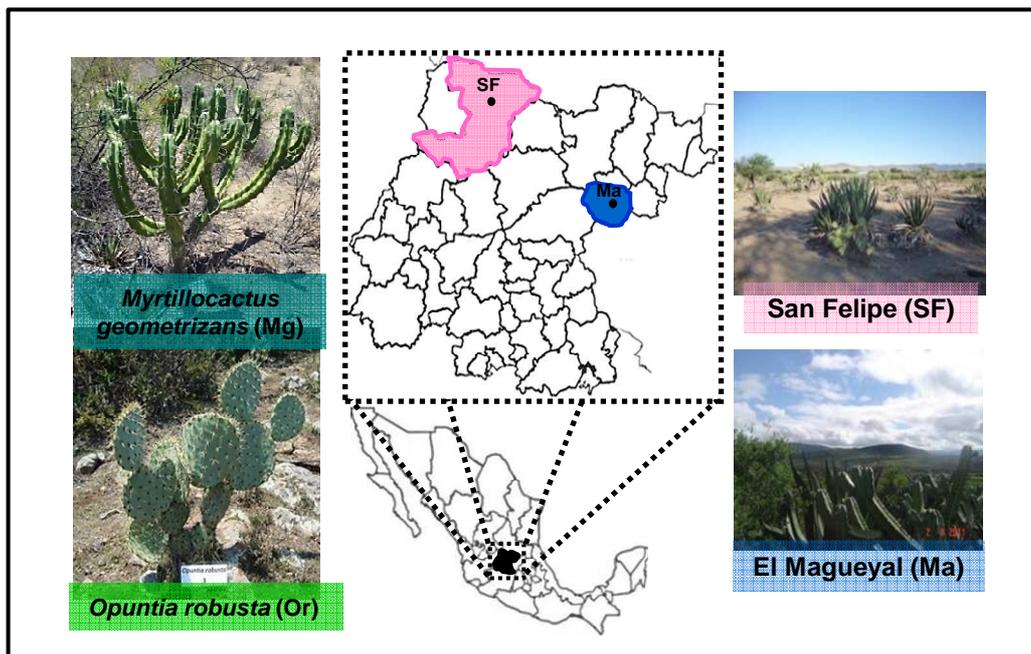


Figura 2. Especies de Cactáceas y sitios de muestreo.

Para poder abordar las metas científicas arriba mencionadas sobre las asociaciones simbióticas que establecen las especies *M. geometrizans* y *O. robusta* con los microorganismos, se consideró como primer paso realizar visitas de exploración en diferentes áreas naturales del Estado de Guanajuato para evaluar la presencia, distribución y características de estas plantas. Con la información recabada, se localizaron y seleccionaron dos sitios donde ambas especies se encuentran en crecimiento simpátrico. El primero, se ubica en las comunidades del Magueyal y las Ánimas pertenecientes al municipio de San José de Iturbide, y el segundo, en las comunidades del Jaral y San Francisco en el municipio de San Felipe (Figura 2). De aquí en adelante se nombrará al sitio I como El Magueyal (Ma) y San Felipe (SF) al sitio II. Cabe mencionar que ambos sitios de muestreo, presentaron con base en cartas edafológicas de escala 1:50,000 impresas en 1975 proporcionadas por el Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía (INEGI), en general la misma clase de suelo de Phaeozem haplico con textura media con condiciones de terreno ligeramente ondulado con pendientes menores del 8%. La composición química y propiedades físicas de los suelos consistieron en clase textural de Franco Arenoso, pH

moderadamente ácido de 5.61-6.22 y con relaciones de bases de cambio y cationes muy similares para ambos sitios de muestreo (Tabla 1).

Tabla 1. Las características del suelo, temperatura media anual y precipitación de los sitios de estudio en 2012 y 2013.

Sitios	2012		2013	
	El Magueyal (Ma)	San Felipe (SF)	El Magueyal (Ma)	San Felipe (SF)
Coordenadas	N21°05.106 W100°17.653	N21°39.626 W100°02.959	N21°05.269 W100°17.826	N21°39.653 W101°02.799
Altitud (masl)	2175	2089	2179	1885
Condiciones ambientales				
Temperatura anual promedio (°C)*	18.3	17	17.9	15.5
Precipitación anual acumulada (mm)*	485	204.5	389.5	643
Precipitación durante la estacionalidad de lluvias (mm)*	357	136.5	519	358.5
Precipitación durante la estacionalidad de secas (mm)*	128	68	124	31
Características del suelo				
Textura	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso	Franco arenoso
pH	5.79	6.25	5.28	6.23
Materia orgánica (%)	3.97	0.71	2.49	1.075
Nitrógeno ($\mu\text{g g}^{-1}$)	8.76	12.65	11.3	13.4
Fósforo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	18.11	4.53	3.43	1.66
Potasio ($\mu\text{g g}^{-1}$)	64.35	251.7	208.5	295

*Datos proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA).

6.1.1 *Myrtillocactus geometrizans*

Myrtillocactus geometrizans conocido comúnmente como “garambullo” es una Cactácea endémica de México (Arias et al., 2012), crece de manera silvestre en zonas consideradas no aptas para la agricultura como las zonas áridas de Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Michoacán y Querétaro (Céspedes et al., 2005; CONABIO, 2012). Existen varias especies pertenecientes a la subfamilia *Cactoideae* del género *Myrtillocactus*, siendo *M. geometrizans* la mejor adaptada y más distribuida (Djerassi et al., 1957). Su forma de vida es de una planta arborescente hasta de 4.5 m de altura, tronco bien definido y con ramificación en forma de una copa amplia o circular hasta de 6 m, ramas numerosas que a su vez se ramifican, algo encorvadas, color verde azulado; costillas de 5 a 6, redondeadas de 2 a 3 cm de alto; areolas distantes entre sí 1.5 a 3 cm, lanosas; espinas radiales y centrales diferentes de 1 a 5 cm de longitud, las jóvenes con la punta rojiza (Figura 2). El fruto de esta planta, es una baya esférica de color morado que se desarrolla a lo largo de las ramificaciones durante los meses de Mayo a Septiembre, en algunas comunidades se le consume preferentemente en fresco o bien procesado de diferentes maneras como mermelada, paleta de hielo o pasa (Pérez-González, 1992).

En la literatura se tienen reportes acerca de algunas aplicaciones de esta planta. Céspedes et al. (2005) publicaron la actividad insecticida de algunos extractos de las raíces y partes aéreas de *M. geometrizans*, identificando el triterpeno peniocerol y los esteroides macdougallin y chichipegenin, contra *Spodoptera frugiperda* JE Smith (el gusano cogollero del maíz) y *Tenebrio molitor* (el gusano de la harina), una plaga de insectos importante del maíz y de granos almacenados en México, respectivamente. Así mismo, Salazar et al. (2011) y Bolaños-Carrillo et al. (2015) reportan que estos productos naturales mostraron actividad anti-inflamatoria en edemas inducidos en oreja y patas de ratón, así como citotoxicidad contra las líneas celulares de cáncer humano, como el adenocarcinoma de colon (HCT-15) y adenocarcinoma de mama (MCF-7).

6.1.2 *Opuntia robusta*

Opuntia, llamada nopal tunero en México, o solamente tuna como usualmente se conoce en el comercio, es una planta típica dentro del paisaje mexicano, y un importante símbolo de identidad para los mexicanos. Junto con el maíz y el *Agave*, *Opuntia* ha sido un alimento básico y un ícono cultural (Anaya-Pérez, 2003). *Opuntia robusta* conocida comúnmente como “bartolona, bondota o nopal tapón” es una Cactácea endémica de México con crecimiento silvestre en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, San Luís Potosí, Aguascalientes y Zacatecas (CONABIO, 2012). Es una planta arbustiva muy ramosa, con un tronco más o menos definido, artículos algo oblongos (Cladodios), muy robustos de color verde azulado claro, areolas grandes y distantes con espinas vigorosas, amarillas; de flores grandes y amarillas (Figura 2; Bravo Hollis and Sheinvar, 1999).

Opuntia robusta constituye una parte importante en la dieta de muchos mexicanos y del forraje animal. La influencia de *O. robusta*, un nutriente utilizado tradicionalmente en la dieta contra la diabetes Mellitus entre la población indígena de América, fue examinado en 15 pacientes jóvenes que sufrían de hipercolesterolemia. Los resultados indicaron que la ingestión regular de *O. robusta* es capaz de reducir significativamente *in vivo* la 8-Epi-prostaglandina F2 alpha, un indicador de estrés oxidativo, así como los niveles de colesterol LDL en la sangre (Budinsky et al., 2001). Así como Santos-Zea et al. (2011) indicaron que *O. robusta* posee capacidad antioxidante ($738.8 \pm 89.9 \mu\text{mol of TE/g}$) comparable con la capacidad antioxidante del arándano ($717.5 \mu\text{mol of TE/g}$), considerado este último como el fruto con el más alto contenido fenólico (Vinson et al., 2001).

6.2 Determinación del tamaño de la muestra

Con el finalidad de determinar el tamaño de muestra a emplear, se realizó un inventario en los dos sitios de muestreo, en el cual se contabilizaron las plantas existentes en 7 y 12 cuadrantes (cada uno de ellos de 20 x 20 m) en El Magueyal y San Felipe, respectivamente, en base a su estado de salud, altura y diámetro. Se considera que los microorganismos asociados influyen de manera importante en la adecuación del holobionte (Bordenstein and Theis, 2015), como fue descrito

en la parte introductoria, por lo que fue vital para el proyecto evaluar únicamente ejemplares visualmente sanos y de altura homogénea de aproximadamente 0.5-1 metro. Con lo anterior, se determinó que el tipo de distribución que presentan estas plantas es de tipo Poisson, y la probabilidad más alta de encontrar plantas visualmente sanas con altura de 0.5-1 m, con variables aleatorias de $\lambda=2.29$ y $\lambda=2.46$ para *M. geometrizzans* y *O. robusta*, respectivamente, fue para 2 a 3 ejemplares de cada especie en los sitios de muestreo (Apéndice I). Por dicha razón y aunada la factibilidad de realizar los estudios moleculares, se consideró tomar muestras de 3 ejemplares de cada especie en cada sitio de muestreo para las diferentes colectas.

6.3 Diseño experimental

Con el propósito de analizar las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta* bajo crecimiento silvestre y simpátrico, investigamos el microbioma de tres subgrupos de muestras: (1) microorganismos endófitos asociados a la endósfera de tallos (se) y raíces (re); (2) microorganismos epífitos asociados a los tallos (filósfera, p) y raíces (rizósfera, rz); y (3) microorganismos presentes en el suelo cercano (en mediana proximidad a raíces, < 5 cm) a las raíces (rzs) y suelo (s) (Figura 3). Para esto, en cada sitio de muestreo se colectó tejido fresco de tallos y raíces de plantas visualmente sanas, suelo cercano a las raíces y suelo colectado a un metro de distancia, hasta 10 cm de profundidad, sin influencia visible de la planta (Apéndice II). Es importante mencionar, que el suelo cercano a las raíces fue colectado debido al poco suelo rizosférico que se observó en los estadios de secas y fue considerado adicional al suelo rizosférico.

Se analizaron tres plantas individuales de las dos especies de Cactus en dos periodos de muestreo, en época de secas (finales de Mayo) y época de lluvias (principios de Octubre), en los años 2012 y 2013 (Tabla 1). Por lo tanto, considerando las dos especies de Cactus, los seis compartimentos (microhábitats), los dos sitios de muestreo y las dos estacionalidades, se colectaron en total 144 muestras en cada año de muestreo (288 en total).

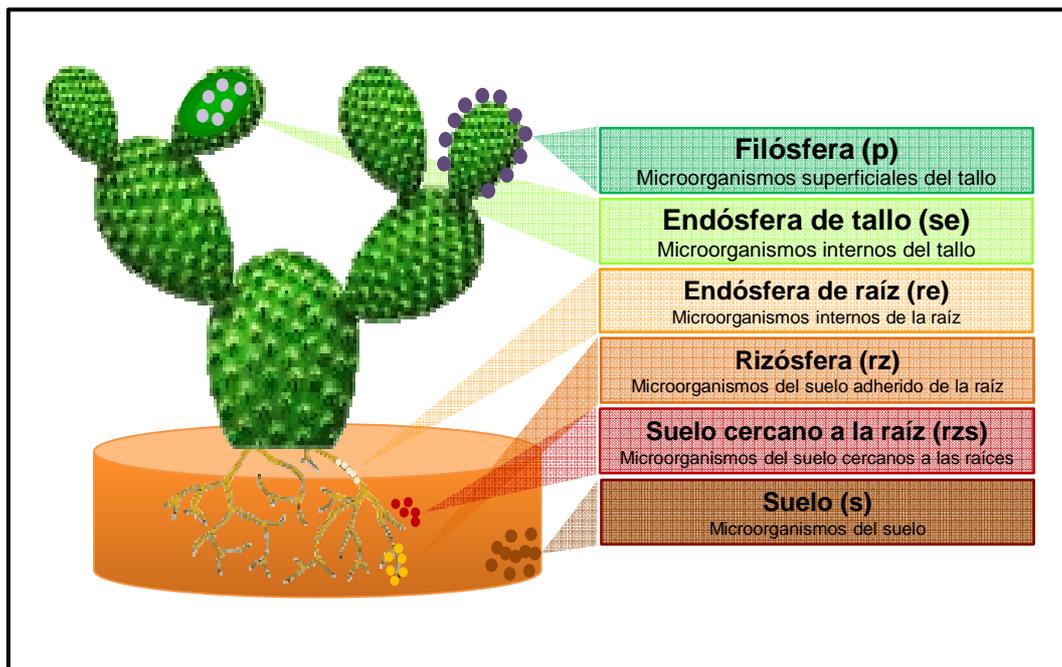


Figura 3. Los seis compartimentos analizados en cada planta muestreada.

6.4 Procesamiento de las muestras y extracción de ADN

El material vegetal y muestras de suelo fueron transportados en bolsas de plástico en hielo al laboratorio donde fueron almacenados a 4 °C toda la noche. El material vegetal fue lavado en condiciones de esterilidad con una solución amortiguadora para remover los microorganismos de la filósfera presentes en los tallos y en la rizósfera de las raíces. Para las raíces, se empleó una solución salina al 0.9% y para los tallos, una solución amortiguadora de fosfatos (4.9 mM de KHPO_4 , 50.24 mM K_2HPO_4 y 0.1% de Triton X-100). Diez mililitros de cada solución de lavado fue mezclada con glicerol al 40% (1:1 v/v) y el resto fue centrifugado a un volumen final del 50 ml para los análisis subsecuentes.

Posteriormente, se esterilizó secuencialmente la superficie de los tallos y raíces con etanol al 70% por un minuto, 5.5% NaOCl por 5 min y dos lavados de agua estéril. Como medida de una eficiente desinfección, se sembró 200 μl de agua del segundo lavado en placas de agar nutritivo esperando no tener crecimiento. Los tallos desinfectados se cortaron y reservaron en condiciones de esterilidad en tres secciones: apical, media y basal para una mayor cobertura de análisis. Las tres secciones de los tallos y raíces fueron cortadas en pequeños

fragmentos, algunos de ellos fueron almacenados con glicerol al 20% y el resto se depositaron en bolsas de plástico estériles. Todas las muestras colectadas y procesadas se almacenaron a -80 °C.

Un método eficaz, reproducible y de alto rendimiento para el aislamiento total de ácidos nucleicos es indispensable a fin de obtener una perspectiva representativa de la composición real de la microbiota de una muestra. Uno de los pasos más importantes en cualquier aislamiento de ácidos nucleicos es la lisis celular, que a su vez, depende de la composición de la muestra. Por lo tanto, se emplearon diferentes protocolos para el aislamiento de ADN total de cada muestra. En el caso del tejido vegetal, el aislamiento del ADN se llevó a cabo utilizando 100 mg de tejido y aplicando el método descrito por Lopes et al., (1995) para los tallos y Edwards (2001) para las raíces. Para el aislamiento de ADN total del suelo, suelo cercano a la raíz y rizósfera, se utilizó el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Del mismo modo, se realizó el aislamiento de ADN total de filósfera utilizando el kit de aislamiento de ADN PowerWater UltraClean, con membranas de filtración de 0.22 µm (MO BIO, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN aislado se diluyó diferencialmente en buffer TE para obtener concentraciones de 20-100 ng/µl para ser utilizado como templado en pasos posteriores. El ADN obtenido de la parte apical, media y basal de los tallos se mezcló equimolarmente para los análisis posteriores.

6.5 Amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S (V4) y la región ITS2 de las muestras del 2012

Para tener un panorama general de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos presentes en las diferentes muestras colectadas, se empleó como marcadores moleculares la región hipervariable 4 del gen ARNr 16S y la región espaciadora de transcripción interna 2 (ITS2, siglas en inglés), respectivamente. Para la amplificación del gen ARNr 16S (V4), se utilizó el par de oligonucleótidos 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 816R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), en conjunto con una secuencia sujetadora de

ácido nucleico peptídico (PNA, siglas en inglés) para reducir la contaminación de secuencias pertenecientes a cloroplasto y mitocondria en las muestras de tallo y raíz como empleó Lundberg et al., (2013). Para la amplificación del ITS2, utilizamos el par de oligonucleótidos ITS9F (5'-GAACGCAGCRAAIIIGYGA-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3). Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado con ~10 ng de templado por reacción para cada muestra y se llevaron a cabo en placas de 96 pozos. Debido a un reducido presupuesto para el proceso de secuenciación, se optó por mezclar equimolarmente el DNA genómico de las tres réplicas biológicas de cada una de los seis compartimentos colectados en las condiciones antes mencionadas, generando un total de 48 muestras combinadas para el año 2012. Estas muestras de ADN genómico fueron enviadas para su amplificación y secuenciación en el Departamento de Energía del Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, USA.

Las condiciones de PCR utilizadas fueron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido por 30 ciclos térmicos de 94 °C durante 45 segundos, 78 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 90 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Cuatro controles negativos y varias repeticiones técnicas se incluyeron en cada placa de 96 pozos para medir los niveles de contaminación y determinar umbrales de reproducibilidad. Se mezclaron triplicados de las reacciones de cada muestra y se cuantificaron con el kit de alta sensibilidad Qubit (Life Technologies) en un lector de fluorescencia de placas Turner Biosystems (Promega, Madison, USA). Grupos de 96 productos de PCR etiquetados se mezclaron en proporciones equimolares y se limpiaron utilizando las perlas magnéticas AMPureXP (Beckman-Coulter, Indianápolis, USA). La secuenciación etiquetada de los amplicones con extremos emparejados de 2x250 bp se realizó en la plataforma Illumina en un equipo MiSeq v2 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). En conjunto con las muestras de Cactus, se procesaron y secuenciaron muestras de tres especies de *Agave* (*Agave deserti*, *Agave salmiana* y *Agave tequilana*) colectadas y procesadas bajo las mismas condiciones (Coleman-Derr et al., 2016).

6.6 Procesamiento de los datos de secuenciación etiquetada (iTags)

Las lecturas crudas (FastQ) generadas por la secuenciación etiquetada para el 2012 con la plataforma Illumina fueron procesadas utilizando un protocolo secuencial desarrollado en el Joint Genome Institute. Como primer paso, se depuraron las secuencias adaptadoras de la plataforma Illumina y el control interno PhiX, seguido del recorte de los oligonucleótidos del extremo 5'. El ensamble de la lectura1 y la lectura2 fue realizado con el algoritmo FLASH (Magoč and Salzberg, 2011) para los datos generados con rRNA 16S (V4) y con el algoritmo PANDAseq (Masella et al., 2012) para los datos generados con el ITS2, quedando entonces 1,311,071 lecturas de ARNr 16S (V4) y 2,752,860 lecturas de ITS2. Las secuencias con baja calidad fueron recortadas del extremo 3' antes de ser ensambladas la lectura1 y la lectura2. Con la plataforma UPARSE (Edgar, 2013), después del proceso de filtrado de calidad, se agruparon las lecturas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU, siglas en inglés) con una homología del 97% a las del ARNr 16S (V4) y del 95% de identidad para las lecturas generadas con el ITS2, obteniendo 40,759 y 25,871 OTUs consensos, respectivamente. Se asignó el linaje taxonómico a cada OTU utilizando el clasificador RDP Naïve Bayesian (Wang et al., 2007) con las bases de referencia para el ARNr 16S, GreenGenes 16S (DeSantis et al., 2006) y Silva 16S (Quast et al., 2013), y para el ITS2, la base de datos UNITE (Schoch et al., 2012). Los OTUs que no alinearon con alguna secuencia asignada como arquea, bacteria u hongo fueron eliminados de la base de datos. Para reducir la baja abundancia e ilegitimidad de algunos OTUs, se emplearon umbrales de reproducibilidad técnica determinada empíricamente a partir de repeticiones técnicas como se describe en Lundberg et al., (2013), estableciendo como condición de filtrado que cada OTU presentara al menos 7 lecturas en 5 muestras para los datos del gen 16S y 2 lecturas y presente en al menos 5 muestras en los datos de ITS2 (Apéndice III). Aquellos OTUs que no cumplieron con dicha condición fueron descartados. Con estos procedimientos de normalización se produjeron 4,237 y 4,395 OTUs normalizados para los datos del 16S e ITS2, respectivamente, para los análisis

posteriores. En el caso de los análisis de diversidad, para poder realizar una comparativa a través de los diferentes compartimentos, todas las muestras fueron submuestreadas al azar (proceso de rarefacción) a 275 para ARNr 16S y 375 para ITS2, número más pequeño de la suma total de lecturas en cada condición evaluada. Las secuencias de los OTUs consenso se depositaron en la base de datos del NCBI con los números de identificación: KU536055 - KU539595, y todas las secuencias generadas en el proceso de secuenciación con los número de identificación: SRP068631.

6.7 Huella genética del gen ARNr 16S (V6-V8) por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y secuenciación de las bandas de DGGE para las muestras de endósfera del 2012 y 2013

La amplificación de las regiones hipervariables V6-V8 del gen ARNr 16S fue realizada por PCR anidado como se describe en Lottmann et al., (2010). La primera etapa consistió en la amplificación del gen 16S completo (1531 pb) con el par de oligonucleótidos 27F (5'-AGAGGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y R1494 (5'-CTACGGRTACCTTGTTACGAC-3'). La mezcla de reacción fue compuesta por 1 ng de ADN templado por microlitro de reacción de PCR, solución reguladora 1X QIAGEN, 0.2 mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2.5 mM de MgCl₂, 5% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma -Aldrich, USA), 0.2µM de cada oligonucleótido, y una Unidad de ADN Taq polimerasa (QIAGEN, Hudson, NH, USA). Después de 2 min de desnaturalización inicial a 95 °C, se emplearon 25 ciclos térmicos de 40 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 1.5 minutos a 72 °C se llevaron a cabo, y finalmente un paso de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

La segunda etapa consistió en la amplificación de un fragmento interno correspondiente a las regiones V6-V8 de 433 pb, que se utilizó posteriormente en el análisis de DGGE. Como templado se empleó 1-5% del producto de PCR obtenido en la primera amplificación y se utilizó el par de oligonucleótidos F968-GC

(5'-

CGCCCGGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCCGGGGGGAACGCGAAA
ACCTTAC-3') y R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'). Las
condiciones de amplificación consistieron en 5 minutos de desnaturalización inicial
a 95 °C, se emplearon 35 ciclos térmicos de 40 segundos a 95 °C, 45 segundos a
56 °C y un minuto a 72 °C, y finalmente un paso de extensión final a 72 °C durante
7 minutos.

El rendimiento y calidad del ADN extraído y los productos de PCR fueron
observados bajo luz ultravioleta después de una electroforesis en geles de
agarosa al 1% y teñidos con GelRed 1X (Molecular Probes-Invitrogen, Hayward,
CA, USA). La concentración y limpieza se midieron utilizando un
espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo scientific, Wilmington, USA).

Cinco cepas axénicas (*Bacillus subtilis* (Bs), *Burkholderia* sp. (Bsp),
Pseudomonas aeruginosa (Ps), *Erwinia* sp. (E) y *Enterobacter* sp. (Esp)) fueron
utilizadas como marcadores para la cuantificación del análisis de huella genética
(M-CFG) y se amplificaron directamente con el par de cebadores F968-GC y
R1378. Así mismo, se empleó un marcador proporcionado por el Dr. José
Luis Hernández Flores con las cepas *Clostridium pasteurianum* DSM525 (Cp),
Erwinia carotovora DSM30168 (Ec), *Agrobacterium tumefaciens* DSM30205 (At),
Pseudomonas fluorescens R2F (Pf), *Pantoea agglomerans* (Pa), *Nocardia*
asteroides N3 (Na), *Rhizobium leguminosarum* DSM30132 (RI), *Actinomadura*
viridis DSM43462 (Av), *Kineosporia aurantiaca* JCM3230 (Ka), *Nocardiopsis atra*
ATCC31511 (Nat) y *Actinoplanes philippinensis* JCM3001 (Ap) como referencia
(M-JLHF).

Se utilizó el sistema DCode (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA) para realizar
el análisis de DGGE. El protocolo DGGE se basa en el protocolo inicial de
Lottmann et al., (2010) y se llevó a cabo mediante el uso de un gradiente de
desnaturalización lineal de 26-58% (100% desnaturalizante contenía 7 M de urea y
40% (v/v) de formamida) con 220 voltios durante 6 horas. Se corrieron 500 ng
(cuantificado en nanodrop) de producto de PCR de cada muestra por pozo y el
marcador M-CFG consistió de las siguientes concentraciones: 30 ng de *Bacillus*
subtilis, 60 ng de *Burkholderia* sp., 80 ng de *Pseudomonas aeruginosa*, 100 ng de

Enterobacter sp. y 150 ng de *Erwinia* sp. Los geles se tiñeron con SYBR Gold 1X (Molecular Probes-Invitrogen, Hayward, CA, USA) durante 45 minutos.

Todas las bandas con diferente patrón de corrida se escindieron con un escalpelo limpio a partir de geles de DGGE teñidos bajo luz UV, y más tarde fueron eluidos con 10 µl de agua destilada estéril durante 24 horas a 4 °C. Se empleó un microlitro de la suspensión como templado para una PCR, con el fin de volver a amplificar los fragmentos escindidos sin gancho de GC. Los productos de PCR se ligaron en un vector pJET1.2 (Thermo scientific, Hudson, NH, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Una clona de cada OTU identificado con inserción correcta fue secuenciada por la tecnología automatizada capilar de Sanger en los servicios genómicos de CINVESTAV-LANGEBIO. La alineación de las secuencias depuradas se realizó en las bases de datos Silva (Quast et al., 2013), NCBI *16S ribosomal rRNA sequences* (Lane et al., 1986) y Ribosomal Data Base (RDP) (Wang et al., 2007). Se verificó la presencia de quimeras con el uso del software UCHIME (Edgar et al., 2011).

6.8 Análisis de imagen de los geles de DGGE

Las imágenes tomadas por el transiluminador (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) de los geles de DGGE se procesaron con el software Image Lab (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) para analizar la huella genética de cada muestra. La curva de calibración se estableció con las diferentes concentraciones de las bandas del marcador M-CFG (descrito previamente) y la localización de las bandas se realizó manualmente. Se consideró a cada banda de los geles de DGGE como un OTU, y el mismo OTU a las bandas con el mismo frente relativo (Rf). La cuantificación de todos los geles se fundamentó en establecer un área de cuantificación en base al Rf presentado por la primera y última banda del marcador M-JLHF. Por lo que, el área de cuantificación consistió en un Rf superior de 0.3 y un Rf inferior de 0.76 respecto a la primera y última banda de dicho marcador. La cuantificación de todos los geles de DGGE fue realizada bajo las condiciones antes mencionadas, permitiendo comparar los datos obtenidos entre todos ellos.

6.9 Bibliotecas y secuenciación metagenómica de las muestras de rizósfera del 2012

Con el fin de conocer los patrones funcionales de las comunidades rizosféricas de *M. geometrizzans* y *O. robusta* cuando éstas están sometidas a estrés hídrico, se empleó secuenciación de alta resolución con la plataforma Illumina de los metagenomas presentes en dicho microhábitat. El análisis metagenómico se llevó a cabo en las muestras colectadas de rizósfera en la temporalidad de secas del 2012. Se emplearon las mismas mezclas equimolarmente compuestas que se usaron para la secuenciación etiquetada para los marcadores ARNr 16S (V4) e ITS2 por la plataforma Illumina. Únicamente, la muestra correspondiente de *O. robusta* colectada en San Felipe fue el resultados de la mezcla equimolar de las muestras colectadas en la estacionalidad de secas y lluvias en dicho sitio, esto debido a que no se contaba con suficiente cantidad de material genómico de alta calidad de la temporalidad de secas. Se empleó un ng de ADN total para posteriormente ser fragmentado y ligado a un adaptador usando el kit Nextera XT (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Los fragmentos de ADN ligados se enriquecieron con 12 ciclos de PCR y fueron posteriormente purificados usando perlas de SPRI (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Las bibliotecas preparadas se cuantificaron utilizando el kit de bibliotecas de secuenciación de próxima generación por PCR cuantitativo de KAPA Biosystems (Wilmington, Massachusetts, USA) y se ejecutaron en un sistema de PCR tiempo real LightCycler 480 de Roche. Las bibliotecas cuantificadas fueron preparadas para secuenciación en la plataforma Illumina HiSeq utilizando un kit para generación de clústeres TruSeq v4 y generados en un sistema de amplificación cBot. La secuenciación de los clústeres con extremos emparejados de 2x150 bp se realizó en la plataforma Illumina en un equipo HiSeq2500 usando el kit de secuenciación HiSeq TruSeq SBS v4 (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

6.10 Procesamiento de los datos de secuenciación de los metagenomas de rizósfera

Las lecturas crudas generadas por la secuenciación de los metagenomas con la plataforma Illumina fueron procesadas utilizando un protocolo secuencial desarrollado en el Joint Genome Institute. Con el objetivo de reducir el ruido y eliminar la baja calidad y complejidad de las secuencias, tales como oligómeros de oligonucleótidos y adaptadores de secuenciación, se implementó un paso de preprocesamiento para el conjunto de datos. En primer lugar, los nucleótidos ambiguos de las secuencias se sustituyeron por N's, mientras que las secuencias que tuvieron caracteres que no sean [A, C, G, T, N] se eliminaron en un procesamiento adicional. Los archivos FastQ con secuencias sin ensamblar con longitudes más cortas de 150 pb fueron eliminadas. En segundo lugar, las secuencias se recortaron con el fin de eliminar regiones de baja calidad y colas con N's. En el caso de lecturas sin ensamblar, datos con la calidad de los archivos FastQ se evaluaron con Lucy (Chou and Holmes, 2001) con un umbral de Q13 con el fin de identificar y recortar regiones de baja calidad en los extremos de las lecturas. Cuando dos o más secuencias fueron al menos 95% idénticas, con sus primeros 5 pb idénticos, esas dos secuencias se consideraron como repeticiones, y sólo se retuvo la copia más larga.

Los Scaffolds que tuvieron fragmentos de 50 N's o más se separaron en contigs con el fin de facilitar la predicción de genes. El primer paso en la predicción característica de genes, fue la identificación de CRISPRs (en inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats) y genes de ARN no codificantes (ARNt, ARNr y otros genes de ARN), seguido por la predicción de genes que codifican proteínas. La identificación de los elementos de CRISPR se realizó utilizando las herramientas CRT (Bland et al., 2007) y PILER-CR v1.06 (Edgar, 2007). Los genes que codifican proteínas y genes de ARN no codificantes se identificaron utilizando una combinación de modelos ocultos de Markov y alineamientos tipo BLAST. Los ARNt fueron predichos con tRNAscan SE-1.3.1 (Lowe and Eddy, 1997) y los genes ARN ribosomales (5S, 16S y 23S) con el paquete HMMER 3.0 (Eddy, 2011). La identificación de genes codificantes de

proteínas se realizó mediante un consenso de cuatro diferentes herramientas de predicción de genes *ab initio*: GeneMark.hmm prokaryotic (v. 2.8) (Lukashin and Borodovsky, 1998), MetaGeneAnnotator (Noguchi et al., 2008), Prodigal (v 2.6 (v 08 2008.). 0.2) (Hyatt et al., 2010) y FragGeneScan. (v 1.16) (Rhoden et al., 2015). Las predicciones de todas las herramientas se combinaron y los genes que codifican proteínas con traducciones más cortas de 32 aminoácidos se eliminaron.

6.11 Análisis estadístico

Debido al bajo número de réplicas empleadas en el diseño experimental y los valores atípicos presentados normalmente por comunidades microbianas, los datos normalizados de secuenciación iTags y los datos de DGGE fueron ajustados mediante una transformación logarítmica, para los posteriores análisis estadísticos. Para estimar la disimilitud entre muestras, se utilizó la medida de Bray-Curtis, donde la suma de las diferencias entre los objetos (es decir, tipos de muestras) a través de variables (es decir, OTUs) está estandarizado por la suma de los valores de las variables a través de objetos (Quinn and Keough, 2002). Esta medida oscila entre cero (completamente similares: las mismas variables y valores de ambos objetos) y uno (completamente diferentes: no hay variables en común), y se adapta bien a los datos de abundancia de especies porque ignora variables que tienen ceros para ambos objetos. Se evaluó el efecto de la especie, el sitio de muestreo, la estacionalidad, tipo de muestra y todas sus interacciones en la matriz de distancia se evaluó mediante el Análisis de Similitud (AnoSim, siglas en inglés) (Oksanen et al., 2008) y Análisis de Varianza Multivariado basado en Permutaciones (PERMANOVA, siglas en inglés) (Anderson, 2001).

Los factores que mostraron efectos significativos se representaron en gráficos de ordenamiento y agrupación no paramétricos: Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, siglas en inglés) y dendograma de agrupamiento tipo “ward”. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico R versión 3.1.1 (2013) (los códigos usados se encuentran en el Apéndice IV), utilizando las funciones *decostand* (transformación logarítmica), *vegdist* (cálculo de distancia Bray-curtis), *anosim* (cálculo de AnoSim) y *adonis* (cálculo de

PERMANOVA) del paquete Vegan (Oksanen et al., 2008), la función *isoNMS* (gráficos de NMDS) del paquete MASS (Venables and Ripley, 2002) y *hclust* (gráfico de dendograma) del paquete Cluster (Rousseeuw et al., 2015). La distribución de los OTUs se presentó en diagramas de Venn usando la función *draw.quad.venn* del paquete VennDiagram. Las pruebas de varianza no paramétrica Kruskal-Wallis y Dunn se realizaron con las funciones *kruskal.test* del paquete Base y *dunn.test* del paquete duun.test, respectivamente. Los análisis y gráficos de los microorganismos con mayor abundancia basados en el concepto de Pareto de 80-20, se realizaron con el promedio de la abundancia relativa y frecuencia relativa de cada OTU en cada comunidad (tipo de muestra) a través de las tres especies CAM.

La diversidad de las comunidades microbianas se estimó con el perfil de entropía de Rényi (Hill, 1973) con la función *renyiresult* del paquete BiodiversityR (Kindt and Coe, 2005). La entropía de Rényi, $H(\alpha)$ se define como:

$$H(\alpha) = \frac{1}{1 - \alpha} \left(\log \sum_{i=1}^S p_i^\alpha \right)$$

donde p_i es la frecuencia relativa de la especie i , S es el número total de especies y α es el parámetro de escala ($\alpha \geq 0$, $\alpha \neq 1$). Con diferentes valores en la escala del parámetro α , el valor del índice de entropía de Rényi corresponde a índices de diversidad bien conocidos (Tóthmérész, 1998). Cuando $\alpha = 0$, el valor de entropía de Rényi es el logaritmo (\log_{10}) del número de especies de la comunidad; cuando $\alpha \rightarrow 1$, la entropía de Rényi es idéntica a la diversidad de Shannon; cuando $\alpha = 2$, el valor de la entropía de Rényi está relacionado con la diversidad Simpson, y cuando $\alpha \rightarrow +\infty$, el valor de la entropía de Rényi está estrechamente relacionado con el índice de dominancia Berger-Parker. Si dos perfiles de diversidad no se cruzan entre sí, la comunidad con el perfil de entropía más alto es inequívocamente más diversa que la otra comunidad. Si los perfiles se cruzan, las comunidades no pueden ser ordenadas de manera inequívoca en términos de diversidad, dado que una comunidad es más diversa en las especies raras, mientras que la otra es más diversa en las especies frecuentes.

El análisis funcional comparativo de los datos sin normalizar generados por la secuenciación de los metagenomas de la rizósfera del 2012, se realizó en la plataforma de Genomas Integrados Microbianos con muestras de Microbiomas (IMG/M, siglas en inglés) del Joint Genome Institute en las secciones de “Análisis de Diversidad y Abundancia de las Comunidades” y en el “Análisis de la Abundancia Relativa de Familias de Proteínas”.

6.12 Aislamiento de los microorganismos asociados a semilla

Con el fin de investigar el papel de la microbiota asociada a *M. geometrizans* y *O. robusta* por métodos tradicionales de cultivo, nos centramos en los microorganismos asociados a las semillas, posibles microorganismos de transferencia vertical. Para llevar a cabo este objetivo, colectamos en Mayo del 2012 (colecta de secas del 2012) frutos de las dos especies de Cactus en los sitios de muestreo El Magueyal y San Francisco. Los frutos colectados fueron lavados y triturados hasta obtener las semillas libres de pulpa. Las semillas recuperadas fueron desinfectadas secuencialmente bajo condiciones de esterilidad en etanol al 70% por un minuto, 0.55% NaOCl por 20 min y dos lavados de agua estéril. Como medida de una eficiente desinfección, se sembró 200 µl de agua del segundo lavado en placas de agar nutritivo esperando no tener crecimiento.

Posteriormente, las semillas desinfectadas fueron embebidas con el embrión descubierto en 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) al 1% estéril por 24 horas, como una prueba de viabilidad (Apéndice V). Las semillas que mostraron una coloración rojiza en el embrión expuesto, fueron depositadas en condiciones axénicas en medio LS con 2.25 g benciladenina y 1 mg indolbutírico como describe Estrada-Luna (1988) para su posterior germinación y propagación *in vitro*. Cuando las plántulas mostraron diferenciación (formación de los tallos, Apéndice V), se desinfectaron los tejidos de 3 ejemplares con el mismo procedimiento que los tejidos colectados en campo y fueron colocados en placas de Agar de Soya Tripticasa (TSA, siglas en inglés) a 28 °C durante 10 días. Las colonias

bacterianas que crecieron en este medio se diluyeron secuencialmente hasta que se obtuvieron cultivos axénicos. Se emplearon métodos microbiológicos para diferenciar las cepas aisladas como morfología macroscópica y microscópica, las condiciones de cultivo, pH, entre otros. Posteriormente, se identificaron mediante la amplificación, clonación y secuenciación del gen ARNr 16S completo. Las secuencias obtenidas se alinearon en las bases de datos Silva (Quast et al., 2013), NCBI *16S ribosomal rRNA sequences* (Lane et al., 1986) y Ribosomal Data Base (RDP) (Wang et al., 2007), y posteriormente se depositaron en el NCBI bajo los números de acceso: KT937137-KT937153.

Finalmente, las secuencias parciales y completas del gen ARNr 16S de las bacterias aisladas se compararon con los datos obtenidos a partir de 16S iTags y DGGE utilizando el software CD-HIT (Li and Godzik, 2006).

6.13 Caracterización bioquímica *in vitro* de los microorganismos aislados de semillas

6.13.1 Tolerancia a estrés hídrico *in vitro*

Capacidad de crecimiento bajo reducción de agua. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas (en medio TSB) de las cepas a analizar, estos cultivos fueron ajustados a una densidad óptica de uno a 600 nm (OD_{600nm}). Posteriormente, se creció 10 μ l de diluciones seriadas de 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 del cultivo en medio TSA al 10% con 405 (100%), 202.5 (50%) y 101.25 (25%) g/L de sorbitol. Como control de crecimiento de cada cepa a analizar, se usó medio TSA normal. Bajo estas condiciones la actividad de agua (A_w) se reduce de 0.957 A_w a 0.919, 0.938 y 0.948 A_w , respectivamente. Por último, se incubaron a 28 °C por un periodo de 5 días, el crecimiento se monitoreo cada 24 horas (Kavamura et al., 2013a).

Producción de exo-polisacáridos (EPS). A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Posteriormente, se depositó 20 μ l de cada cultivo en discos de papel filtro en el medio (extracto de

levadura al 2%, K_2HPO_4 AL 1.5%, $MgSO_4$ al 0.02%, $MnSO_4$ al 0.0015%, $FeSO_4$ al 0.0015%, $CaCl_2$ al 0.003%, $NaCl$ al 0.0015%, agar al 1.5% y 10% glucosa) previamente ajustado a pH de 6.5 y 7.5. Como control de crecimiento, se usó medio TSA. La producción de exopolisacáridos se caracteriza por la presencia de un halo con apariencia limosa. Finalmente, se registró el tamaño del halo y la apariencia limosa cada 24 horas por un periodo de 5 días (Paulo et al., 2012).

Tinción de exopolisacáridos con azul alcian. Se tomó una asada de la colonia crecida en el medio selectivo para producción de exopolisacáridos, y se suspendió en 1 ml de una solución de azul alcian (10 μ l azul alcian y 80 μ l ácido acético). Se mezcló completamente y se incubó una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12 krpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla en 200 μ l de agua destilada estéril. Se centrifugó nuevamente a 10 krpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 20 μ l de agua destilada estéril. Se observó 10 μ l de la tinción en el microscopio a 100X (Leica DM 750, Leica Microsystems). El colorante azul alcian tiene la capacidad de unirse a los grupos carboxilo de los polisacáridos sin unirse a las paredes celulares de las bacterias, permitiendo diferenciarlos claramente (Paulo et al., 2012).

6.13.2 Promoción de crecimiento por mecanismos directos

Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico.

Evaluación en medio sólido. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se creció 10 μ l de diluciones seriadas de 10^2 , 10^4 , 10^6 y 10^8 en el cultivo en medio Winogradsky a pH 7 (100 ml de solución de Winogradsky (5 g de K_2HPO_4 , 2.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g de $NaCl$, 0.05 g de $Fe(SO_4)_3$ y 0.05 g de $MnSO_4$ para aforar a un litro), 0.5 g de $CaCO_3$, 10 g de fuente de carbono y 8 g de agar para un litro de medio) con diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa y sacarosa/manitol). Se usó como control de crecimiento medio TSA. La fijación de nitrógeno se caracteriza

por la formación de un halo con un viraje de coloración de azul-verde a amarillo, esto debido a la acidificación del medio de cultivo. Se midió y registró el tamaño del halo y la coloración cada 24 horas por un periodo de 5 días (Hardy et al., 1968).

Evaluación en medio semi-sólido. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se inoculó el 1% del cultivo en 7 ml de medio Winogradsky semisólido a pH 7 (100 ml de solución de Winogradsky (5 g de K_2HPO_4 , 2.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g de NaCl, 0.05 g de $Fe(SO_4)_3$ y 0.05 g de $MnSO_4$ para aforar a un litro), 0.5 g de $CaCO_3$, 10 g de glucosa como fuente de carbono y 2 g de agar para un litro de medio) en tubos de ensayo. Se usó como control de crecimiento medio TSA al 50%. La evaluación en medio semisólido permite ver los requerimientos de oxígeno de cada cepa a evaluar. Al igual que en medio sólido, la fijación de nitrógeno se caracteriza por la formación de un viraje de coloración de azul-verde a amarillo. Se registró la coloración y el crecimiento celular (superficial, en medio o al fondo del tubo) cada 24 horas por un periodo de tres días (Hardy et al., 1968).

Capacidad de producción de ácido indol acético (AIA). A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se inoculó 100 μ l del cultivo en 10 ml de medio TSB al 10% con 5 mM de L-triptófano y se incubó en oscuridad a 28 °C por un periodo de 48 horas. Una vez pasado el tiempo se centrifugó a 10 krpm por 5 min, se tomó 750 μ l del sobrenadante y se adiciono otros 750 μ l del reactivo de Salkowski (50 ml de ácido perclórico al 35% y 1 ml $FeCl_3$ al 0.5 M) por 30 min, todo bajo protección de luz. Como blanco, se manejó 750 μ l de medio de cultivo sin inocular con 750 μ l de reactivo de Salkowski. Finalmente, se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 530 nm (BECKMAN DU640). La generación de un color de rosa a rojo indica la producción de AIA (Gordon and Weber, 1951). Se desarrolló una curva de calibración con AIA comercial empleando diferentes concentraciones (Apéndice VI).

Capacidad de solubilización de fosfatos. La detección de fosfato disponible fue desarrollada con el método colorimétrico de Nautiyal (1999) con algunas modificaciones. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se incubó 100 μ l del cultivo en 10 ml de medio NBRIP (glucosa al 1%, $Ca_3(PO_4)_2$ al 0.5%, $MgCl_2$ al 0.5%, KCl al 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0.025% y $(NH_4)_2SO_4$ al 0.01%). Se incubó a 28 °C por 15 días a 180 rpm. Posteriormente, de cada muestra se tomó 1 ml y se transfirió a microtubos de 1.5 ml de capacidad y se centrifugó a 10 krpm por 5 min. Después, se tomó 145 μ l de sobrenadante de cada muestra y se adicionó 570 μ l de agua miliQ estéril y 285 μ l de molibdato-vanadato de amonio (molibdato de amonio al 5% y vanadato de amonio al 0.25%, 1:1 (v/v)) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Como blanco, se manejó 145 μ l de medio NBRIP sin inocular y se adicionó 570 μ l de agua miliQ estéril y 285 μ l de molibdato-vanadato de amonio. Finalmente, se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a 420 nm (BECKMAN DU640). Se desarrolló una curva de calibración con KH_2PO_4 empleando diferentes concentraciones (Apéndice VI).

Detección de sideróforos. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se inoculó 10 μ l de cultivo en medio CAS (Apéndice VII) y se llevó a incubar a 28 °C hasta obtener crecimiento. El medio utiliza un complejo ferricromogénico que cambia de color como consecuencia de la pérdida de hierro. Los sideróforos que tienen más afinidad por el hierro que el cromógeno, puede capturar el hierro del complejo ferricromógeno, resultando en un cambio de color del colorante de azul a amarillo-naranja (De los Santos-Villalobos et al., 2012).

6.13.3 Promoción de crecimiento por mecanismos indirectos

Capacidad de producción de amoníaco. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una OD_{600nm} de uno. Se inoculó 100 μ l de cultivo en 10 ml de cultivo de peptona. Posteriormente, se incubó por 48 horas a 28 °C. Transcurrido el tiempo establecido, se tomó 1 ml de cada cultivo y se transfirió a un microtubo de 1.5 ml de capacidad y se añadió 50 μ l del reactivo de

Nessler's (HgI_2 al 10%, KI al 7% y NaOH al 50% de una solución del 32%). El desarrollo de un color amarillo tenue indica una pequeña cantidad de producción de amonio y un color amarillo fuerte a café indican una máxima producción de amonio acompañado de un precipitado, resultado de la reacción del amoniaco con el yoduro de mercurio (Cappuccino and Sherman, 1992).

Producción de cianuro de hidrógeno (HCN). Se estió en medio TSA al 10% adicionado con glicina (4.4 g/l) las cepas a analizar y se llevó a incubar a 28 °C. Después de 24 horas de incubación, en condiciones de esterilidad, se depositó en cada placa un papel filtro estéril del tamaño de la caja empapado con una solución de ácido pícrico al 0.5% y Na_2CO_3 al 2% estéril. Las cajas se sellaron y se continuó incubando con el papel filtro hacia arriba por 48 horas. La producción de cianuro de hidrógeno se manifiesta con la presencia de coloración de naranja a rojo-café, resultado de que el ácido pícrico en presencia del HCN forma isopurpurato alcalino color naranja-café. Por último, se registró la coloración y el crecimiento celular cada 24 horas (Bakker and Schippers, 1987).

Capacidad de hidrólisis de celulosa. A partir de un crecimiento celular de aproximadamente 24 horas ajustado a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ de uno. En seguida se depositó 20 μl del cultivo en discos de papel filtro en medio Mandels (Formula por litro: 2.0 g de KH_2PO_4 , 0.4 g de CaCl_2 , 5.0 mg de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3g de Urea, 0.3g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 mg de $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.4 g de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de CoCl_2 , 1.0 g Tween 80, 25.0 g de peptona, 1.0 g de Carboximetilcelulosa y 12 g de agar). Posteriormente, se incubaron a 28 °C hasta obtener crecimiento radial (Teather and Wood, 1982). Se realizó la tinción con rojo congo al 1% (p/v) (SIGMA-Aldrich, USA) tratando de cubrir toda la caja. Después de 15 min se retiró el exceso del colorante y se agregó NaCl 1M. Se dejó reposar 15 min y se analizó la presencia de halos de hidrólisis.

7. Resultados

Capítulo I. Comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta*

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en: **Fonseca-García, C.**, Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. 2016. The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 150 doi:10.3389/fmicb.2016.00150.

7.1.1 Introducción

Como ya se mencionó en la parte introductoria de este documento, las plantas en la naturaleza están asociadas con múltiples microorganismos, considerando al conjunto como un holobionte, y gran parte de su fenotipo es el producto de la co-expresión de sus propios genes y de los genes microbianos, influenciados a su vez por el ambiente en el que se encuentran (Bordenstein and Theis, 2015; Partida-Martínez and Heil, 2011; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011). La mayoría de los trabajos realizados a la fecha se han enfocado al estudio de las interacciones planta-microorganismo en pocas especies de plantas bajo condiciones idóneas de crecimiento, principalmente plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, algunos pastos y cultivos de relevancia agronómica (Partida-Martínez and Heil, 2011). Sin embargo, las regiones áridas representan el principal ecosistema terrestre por superficie (Peel et al., 2007), hábitat donde las plantas se encuentran sometidas a muchos tipos de estrés abiótico incluyendo fluctuaciones extremas de temperatura, alta radiación ultravioleta, bajo contenido de nutrientes y largos periodos de estrés hídrico. Pese a la importancia ecológica de este ecosistema, poco se conoce sobre las comunidades microbianas que habitan en él y la importancia que ejercen sobre la adecuación de las plantas en estas condiciones ambientales adversas.

Bajo la premisa anterior, en el presente trabajo nos enfocamos en elucidar el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a plantas adaptadas a condiciones de aridez. Diversos factores influyen en el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a una planta, por lo que fue prioritario considerar en el diseño experimental, el efecto tanto de factores bióticos y abióticos sobre éstas. Como factores bióticos consideramos la especie de las plantas huésped creciendo en el mismo hábitat y diferentes compartimentos de las mismas, y como factores abióticos, el sitio de muestreo y cambios temporales causados por la estacionalidad y los años de muestreo. Las Cactáceas y Agaváceas son plantas xerófitas ampliamente distribuidas en México y en el estado de Guanajuato, que, además de su importancia cultural y económica, son miembros importantes del paisaje Guanajuatense (Comisión Nacional para el

Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2012). Para nuestra investigación, seleccionamos dos especies de Cactáceas, *M. geometrizzans* y *O. robusta*, con crecimiento simpátrico en diferentes zonas del estado, ubicadas dos de estas últimas, en las comunidades de El Magueyal y San Francisco al norte del estado. Por lo tanto, se evaluó el ensamblado de las comunidades microbianas asociadas a estas dos especies de Cactus en las estacionalidades de secas y lluvias a lo largo de un periodo de dos años (2012-2013) (descrito en los Capítulos I-V del apartado de resultados). Para abordar lo anterior, empleamos técnicas independientes de cultivo como secuenciación etiquetada y huella genética de marcadores moleculares de comunidades microbianas. Así mismo, combinamos lo anterior con técnicas de aislamiento tradicional y metagenómica para dar un acercamiento de los posibles mecanismos de interacción de la microbiota con la planta huésped (descrito en el Capítulo VI del apartado de resultados). Como primer paso, nos enfocamos en conocer la composición taxonómica de las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta* mediante secuenciación etiquetada de alto rendimiento para los marcadores ARNr 16S (V4) (bacterias y arqueas) e ITS2 (hongos) de las muestras colectadas en el año 2012. Los resultados obtenidos se plantean en el este primer capítulo.

7.1.2 Distribución taxonómica de las comunidades microbianas por factor

Con el fin de obtener un panorama global de la estructura de la comunidad microbiana asociada con las Cactáceas, primeramente analizamos la distribución de los OTUs de bacterias/arqueas y de hongos identificados en todos los factores considerados en el diseño experimental: la estacionalidad, el sitio de muestreo, las especies de Cactus y el compartimento. Las comparaciones en cada factor mostraron que para la comunidad de bacterias/arqueas, el 92% de los OTUs identificados fueron compartidos entre las estacionalidades de secas y lluvias, El Magueyal y San Francisco compartieron el 91% de los OTUs y el 92% se compartieron entre *M. geometrizzans* y *O. robusta* (Figura 4a-c).

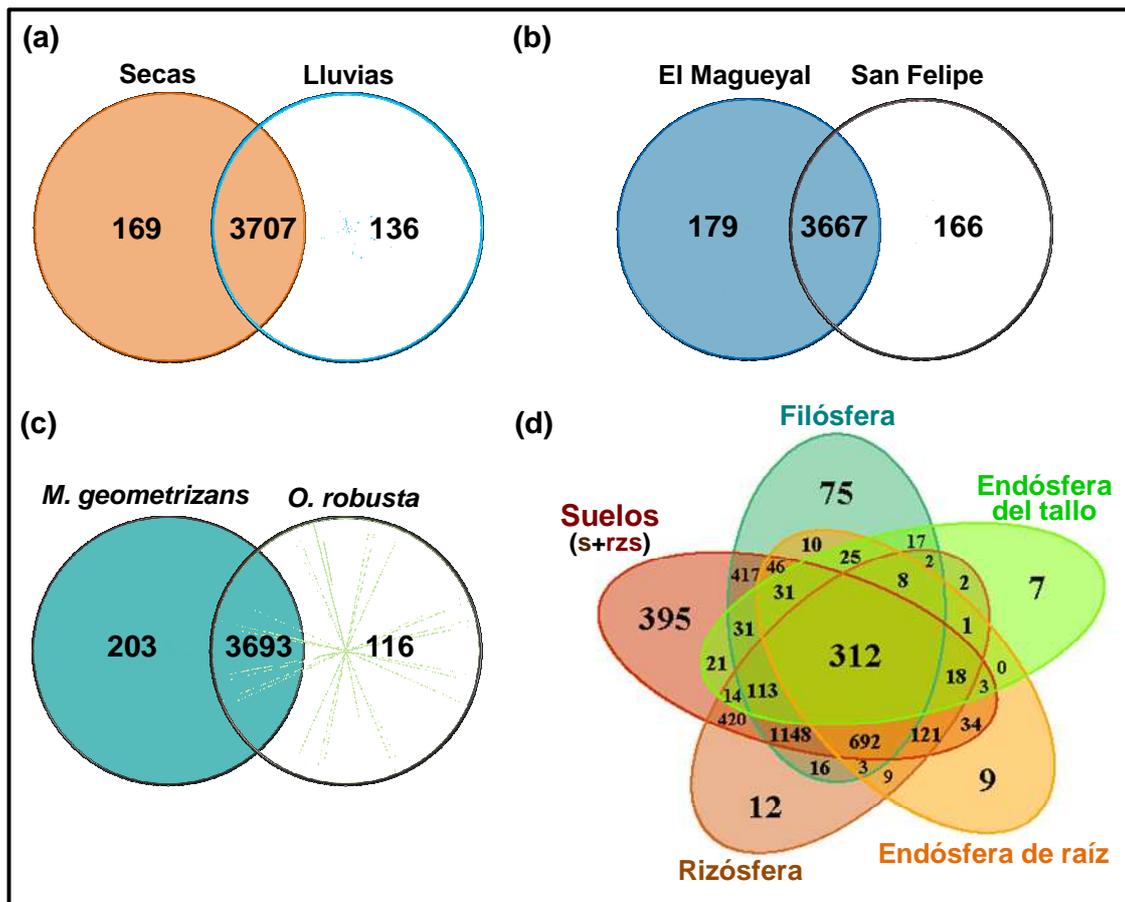


Figura 4. Diagramas de Venn de los taxones de bacterias/arqueas de cada factor analizado considerando todas las muestras colectadas. Los diagramas indican el número de OTUs de bacterias/arqueas entre (a) la estacionalidad de secas y lluvias; (b) El Magueyal y San Felipe; (c) *M. geometrizzans* y *O. robusta*; y (d) los seis microhábitats o compartimentos analizados. El suelo cercano a la raíz y el suelo fueron agrupados debido a que mostraron pequeñas diferencias entre ellos.

Mientras que, en la comunidad fúngica sólo se compartieron el 80% de los OTUs en las dos estacionalidades, el 75% en los sitios de muestreo y el 80% entre las dos especies de Cactus (Figura 5a-c). Sin embargo, un comportamiento distinto se observó en la distribución del número de OTUs en los compartimentos analizados (suelo, suelo cercano a la raíz, rizósfera, endósfera de raíz, endósfera del tallo y filósfera), compartiendo en los seis microhábitats únicamente el 8% de los OTUs observados en la comunidad de bacterias/arqueas (Figura 4d) y el 2% en la fúngica (Figura 5d), mostrando claramente, que la mayoría de los OTUs de

bacterias/arqueas y hongos se asocian y se comparten con las muestras de suelo (suelo y suelo cercano a la raíz).

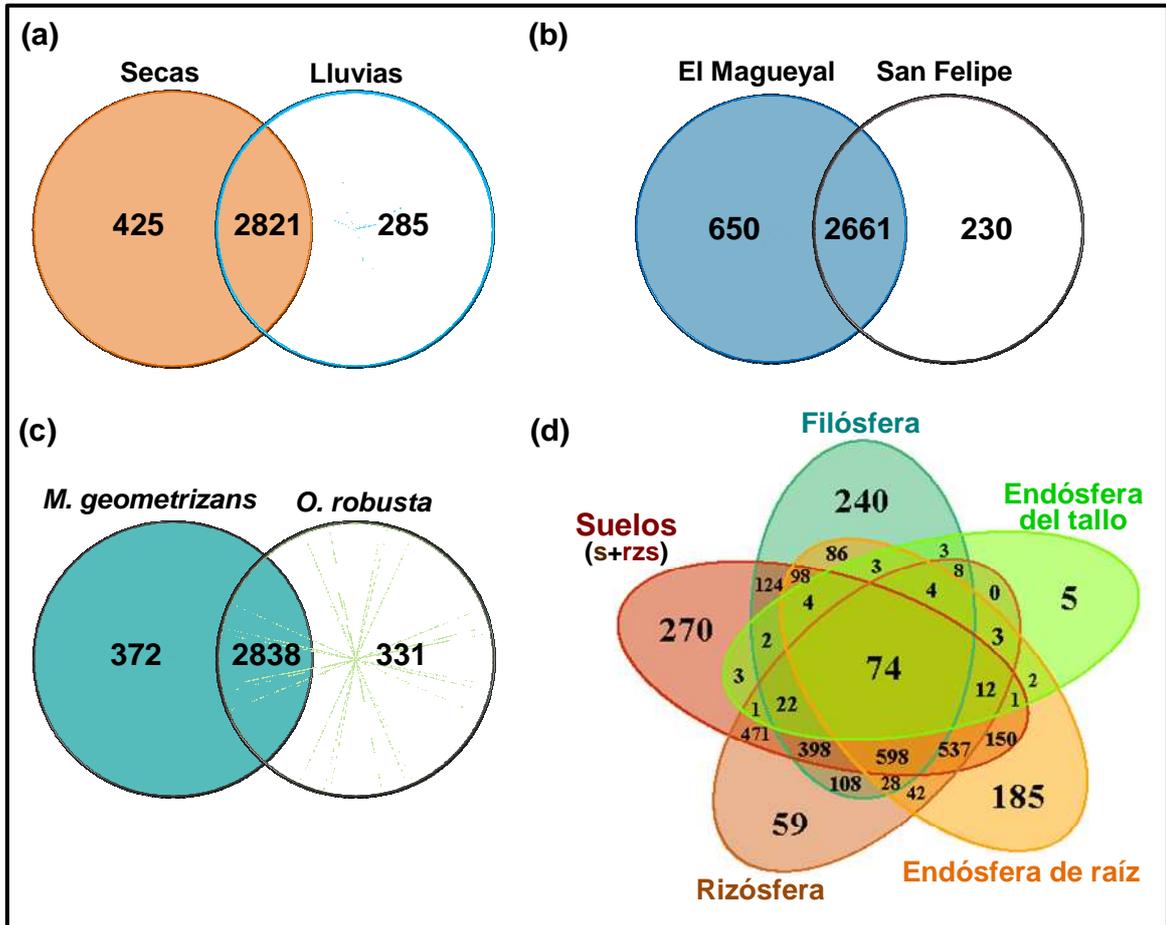


Figura 5. Diagramas de Venn de los taxones de hongos de cada factor analizado considerando todas las muestras colectadas. Los diagramas indican el número de OTUs de hongos entre (a) la estacionalidad de secas y lluvias; (b) El Magueyal y San Felipe; (c) *M. geometrizzans* y *O. robusta*; y (d) los seis microhábitats o compartimentos analizados. El suelo cercano a la raíz y el suelo lejano fueron agrupados debido a que mostraron pequeñas diferencias entre ellos.

Además, observamos que un porcentaje reducido de OTUs de bacterias/arqueas fueron específicos a cada compartimento analizado, especialmente en la rizósfera (0.3% de los OTUs), endósfera de raíz (0.2% de los OTUs) y del tallo (0.2% de los OTUs), mientras que los suelos (10% de los OTUs) y filósfera (2% de los OTUs) mostraron porcentajes mayores.

En contraparte, en la comunidad de hongos el porcentaje de OTUs específicos fue similar en los suelos (8% de los OTUs), la endósfera de raíz (5% de los OTUs) y filósfera (7% de los OTUs), y ligeramente menor en la endósfera del tallo (0.1% de los OTUs) y rizósfera (2% de los OTUs). Notamos además, que la endósfera del tallo estaba conformada por un número reducido de OTUs en ambas comunidades microbianas. Los patrones de distribución observados en los diferentes compartimentos evaluados, fueron muy similares cuando analizamos independientemente cada especie de Cactus (Figura 6). Estos primeros resultados sugieren que las comunidades microbianas asociadas con los Cactus fueron posiblemente más influenciadas por el compartimento analizado (microhábitat) que por los otros factores evaluados.

7.1.3 Composición taxonómica de las comunidades de bacterias/arqueas

Con el diseño experimental planteado, se lograron identificar 2 fila arqueanos y 30 fila bacterianos, los cuales se subdividieron en 78 clases. Los OTUs pertenecientes a los fila Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria y Bacteroidetes componen más del 85% de la abundancia relativa de cada una de las cuatro comunidades asociadas a las plantas de *M. geometrizans* y *O. robusta* (rizósfera, endósfera de raíz, endósfera de tallo y filósfera) (Figura 7a). Después de un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis con $P \leq 0.05$ (Tabla 2), determinamos que las clases representadas en la Figura 7a, con excepción de la clase Betaproteobacteria, mostraron diferencias significativas a lo largo de las seis comunidades analizadas para cada especie de Cactus. Las clases Gammaproteobacteria, Oscillatoriothyraceae, Bacilli, Sphingobacteria, Alphaproteobacteria y Actinobacteria mostraron variaciones más notorias en su abundancia relativa. Sin embargo, si analizamos únicamente las cuatro comunidades asociadas directamente a las plantas (rizósfera, endósfera de raíz, endósfera del tallo y filósfera), la clase Gammaproteobacteria en conjunto con las clases Chloracidobacteria y Spartobacteria no presentan diferencias significativas a lo largo de estas cuatro comunidades (Tabla 3).

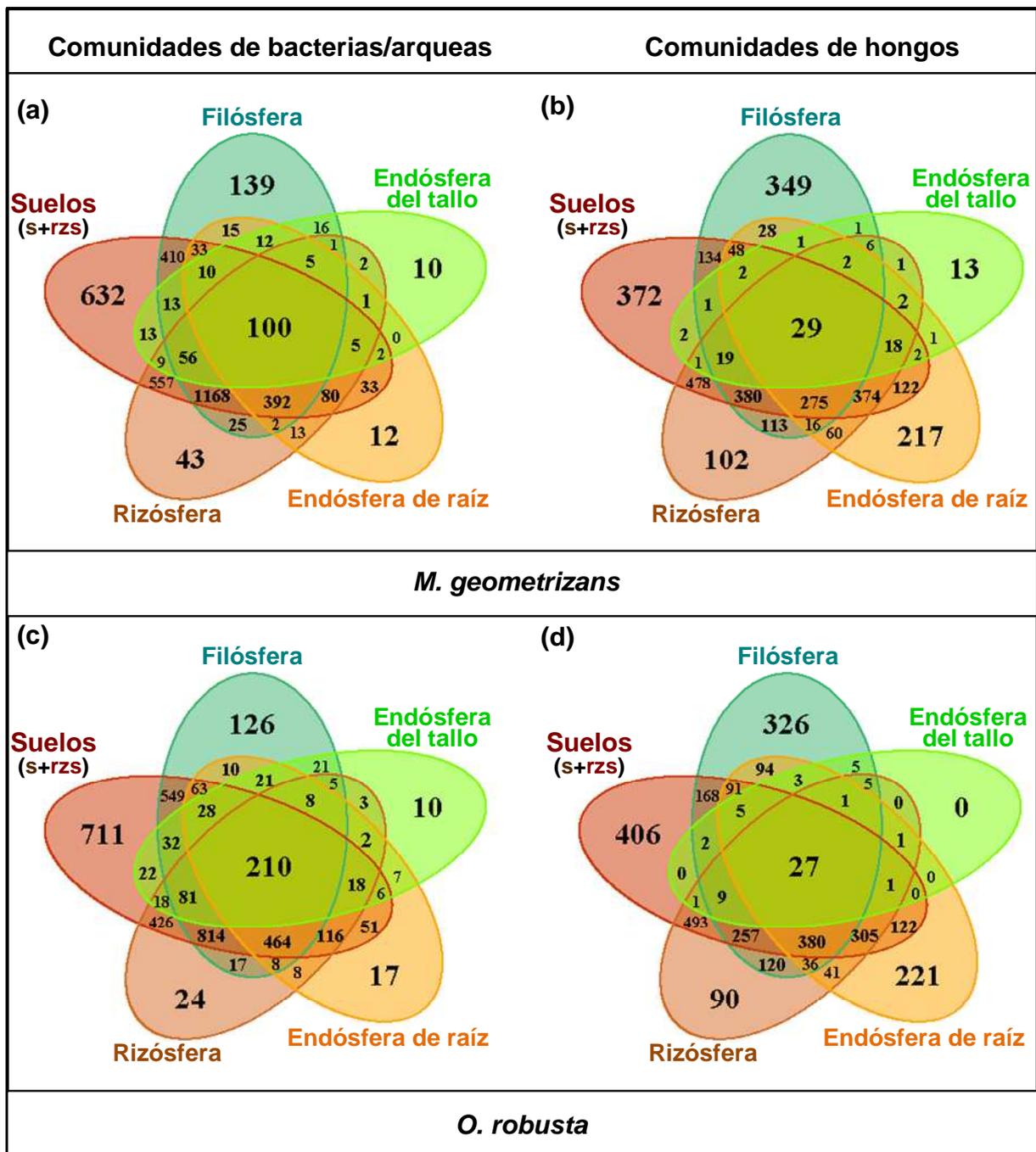


Figura 6. Diagramas de Venn de los seis compartimentos analizados de *M. geometriza* (a,b) y *O. robusta* (c,d), para las comunidades de bacterias/arqueas (a,c) y de hongos (b,d). El suelo cercano a la raíz y el suelo fueron agrupados debido a que mostraron pequeñas diferencias entre ellos.

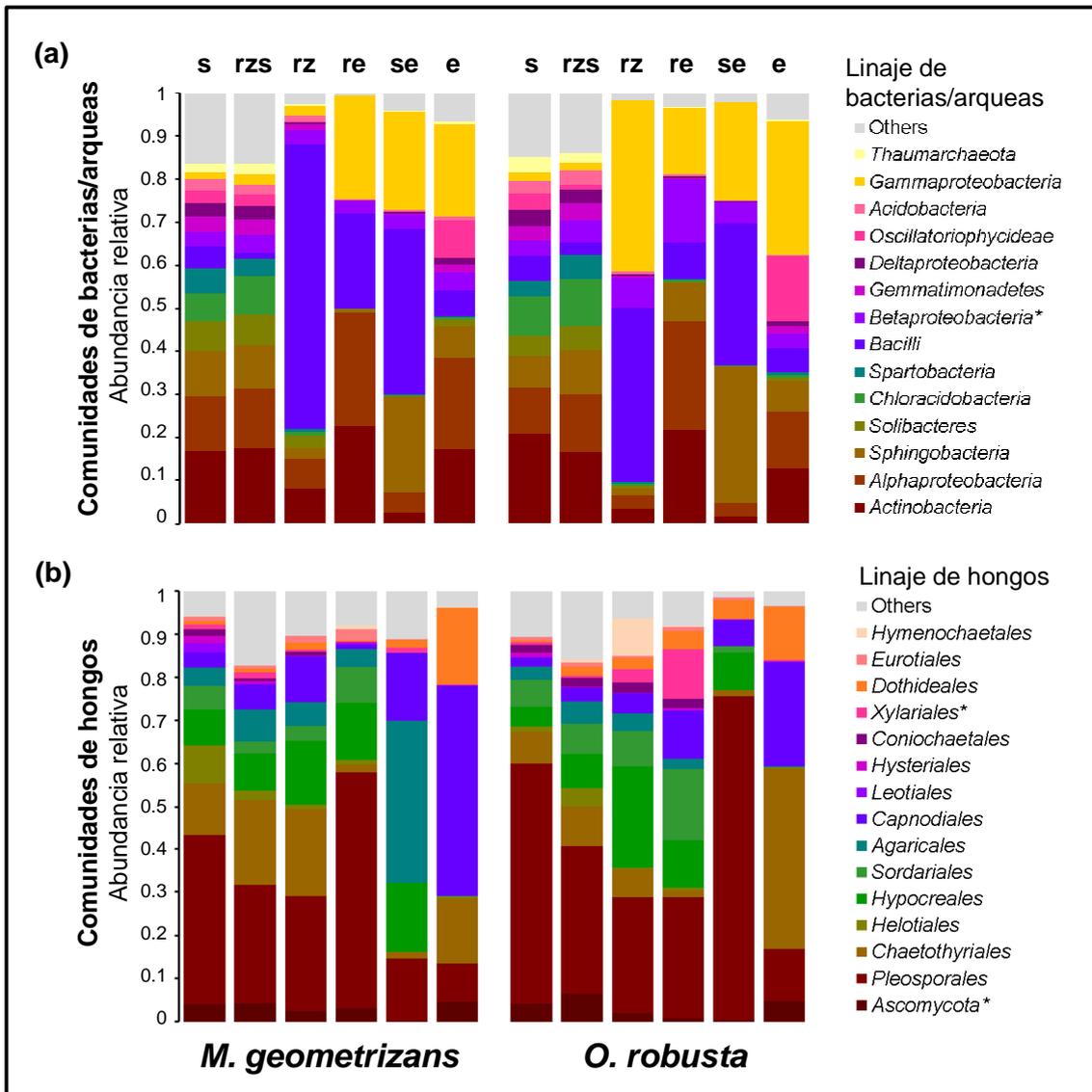


Figura 7. Composición taxonómica de las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta*. **(a)** Composición de bacterias/arqueas a nivel de clase, y **(b)** composición de hongos a nivel de orden por tipo de muestra. Las clases de bacterias/arqueas y ordenes de hongos marcados con asterisco fueron los únicos que no representan diferencias estadísticamente significativas entre los seis compartimentos analizados en ambas especies de Cactus después de una prueba de Kruskal–Wallis con una $P \leq 0.05$.

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis de las diferentes clases de bacterias/arqueas y órdenes de hongos entre los seis compartimentos de las plantas asociados a *M. geometrizans* y *O. robusta* en el 2012.

Clases de bacterias/arqueas				
Clases	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	<i>P</i>
<i>Acidobacteria</i>	5	47	28.628	2.742e-05
<i>Actinobacteria</i>	5	47	24.084	0.0002
<i>Alphaproteobacteria</i>	5	47	32.104	5.667e-06
<i>Bacilli</i>	5	47	19.300	0.0016
<i>Betaproteobacteria</i>	5	47	8.139	0.1487
<i>Chloracidobacteria</i>	5	47	30.401	1.229e-05
<i>Deltaproteobacteria</i>	5	47	31.913	6.18e-06
<i>Gammaproteobacteria</i>	5	47	23.380	0.0002
<i>Gemmatimonadetes</i>	5	47	34.690	1.735e-06
<i>Oscillatoriothycideae</i>	5	47	34.820	1.634e-06
<i>Solibacteres</i>	5	47	34.123	2.25e-06
<i>Spartobacteria</i>	5	47	30.157	1.373e-05
<i>Sphingobacteria</i>	5	47	27.466	4.627e-05
Órdenes de hongos				
Órdenes	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	<i>P</i>
<i>Agaricales</i>	5	47	16.977	0.0045
<i>Capnodiales</i>	5	47	30.838	1.008e-05
<i>Chaetothyriales</i>	5	47	27.191	5.234e-05
<i>Coniochaetales</i>	5	47	27.700	4.165e-05
<i>Diaporthales</i>	5	47	31.306	8.15e-06
<i>Dothideales</i>	5	47	25.2042	0.0001
<i>Eurotiales</i>	5	47	16.613	0.005294
<i>Ascomycota</i>	5	47	7.791	0.1681
<i>Helotiales</i>	5	47	28.403	3.034e-05
<i>Hypocreales</i>	5	47	21.8459	0.0005
<i>Hysteriales</i>	5	47	15.339	0.0090
<i>Leotiales</i>	5	47	14.655	0.0119
<i>Pezizales</i>	5	47	22.093	0.0005
<i>Pleosporales</i>	5	47	21.412	0.0006
<i>Sordariales</i>	5	47	22.817	0.0003
<i>Xylariales</i>	5	47	5.560	0.3513

*Las diferencias significativas se resaltan en color gris con una $P \leq 0.05$.

Las secuencias que pertenecen al dominio Arquea, principalmente Nitrososphaera, fueron más frecuentes en el suelo y menos en las plantas, mostrando mayor abundancia en la filósfera de *M. geometrizans* y en la endósfera del tallo de *O. robusta* (Tabla 4). Este resultado puede sugerir que nuestros datos

muestran que no son abundantes en Cactáceas, más cabe la posibilidad que estén subrepresentadas en nuestro análisis, debido a que es conocido que los oligonucleótidos universales del ARNr 16S no siempre tienen la misma cobertura para la comunidad de arqueas que para la comunidad bacteriana (Takahashi et al., 2014).

Tabla 3. Prueba de Kruskal-Wallis de las diferentes clases de bacterias/arqueas y órdenes de hongos entre los cuatro compartimentos directamente asociados a las plantas de *M. geometrizans* y *O. robusta* en el 2012.

Clases de bacterias/arqueas				
Clases	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	<i>P</i>
<i>Acidobacteria</i>	3	31	19.802	0.0001
<i>Actinobacteria</i>	3	31	17.021	0.0006
<i>Alphaproteobacteria</i>	3	31	20.835	0.0001
<i>Bacilli</i>	3	31	11.049	0.0114
<i>Betaproteobacteria</i>	3	31	4.692	0.1958
<i>Deltaproteobacteria</i>	3	31	12.880	0.0049
<i>Gammaproteobacteria</i>	3	31	1.668	0.6441
<i>Gemmatimonadetes</i>	3	31	18.315	0.0003
<i>Oscillatoriothyriceae</i>	3	31	19.429	0.0002
<i>Solibacteres</i>	3	31	13.957	0.0029
<i>Spartobacteria</i>	3	31	4.9757	0.1736
<i>Sphingobacteria</i>	3	31	19.951	0.0001
Órdenes de hongos				
Órdenes	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	<i>P</i>
<i>Agaricales</i>	3	31	10.790	0.0129
<i>Capnodiales</i>	3	31	18.523	0.0003
<i>Chaetothyriales</i>	3	31	20.045	0.0001
<i>Coniochaetales</i>	3	31	17.502	0.0005
<i>Diaporthales</i>	3	31	20.488	0.0001
<i>Dothideales</i>	3	31	17.304	0.0006
<i>Eurotiales</i>	3	31	9.502	0.0233
<i>Ascomycota</i>	3	31	2.1193	0.548
<i>Helotiales</i>	3	31	17.474	0.0005
<i>Hypocreales</i>	3	31	15.634	0.0013
<i>Hysteriales</i>	3	31	10.045	0.0181
<i>Leotiales</i>	3	31	5.138	0.1619
<i>Pezizales</i>	3	31	5.555	0.1354

*Las diferencias significativas se resaltan en color gris con una $P \leq 0.05$.

La composición taxonómica de las comunidades de bacterias/arqueas de las muestras de suelo y suelo cercano a la raíz fue muy similar en todas las plantas analizadas de las dos especies de Cactus, pero las comunidades epífitas (rizósfera y filósfera) y endófitas (endósfera de raíz y tallo) se diferenciaron a través de los compartimentos de la planta y ligeramente entre las especies de Cactus (Figura 7a). Por otra parte, en los suelos se identificaron 395 OTUs específicos (Figura 4d), lo que representó 117 géneros. Sin embargo, estos diversos taxones solamente representaron alrededor del 1.8% de la abundancia relativa total en estas muestras, lo que sugiere que la mayoría de la microbiota de bacterias/arqueas del suelo fue capaz de colonizar uno o más compartimentos asociados a las plantas de ambas especies de Cactus.

Tabla 4. Abundancia relativa (%) del dominio Arquea en los seis compartimentos asociados a las plantas de *M. geometrizzans* y *O. robusta* en el 2012.

<i>M. geometrizzans</i>						
Linaje	Suelo lejano	Suelo cercano	Rizósfera	Endósfera de raíz	Endósfera del tallo	Filósfera
<i>Nitrososphaera</i>	2.04	2.58	0.33	0.01	0.14	0.45
<i>Arquea</i>	0.01	0.004	0.001	-	-	-
<i>E2OR</i>	0.007	0.011	-	-	-	-
<i>O. robusta</i>						
Linaje	Suelo lejano	Suelo cercano	Rizósfera	Endósfera de raíz	Endósfera del tallo	Filósfera
<i>Nitrososphaera</i>	3.46	2.3	0.11	0.18	0.6	0.02
<i>Arquea</i>	0.02	0.03	0.0005	-	-	-
<i>E2OR</i>	0.024	0.015	-	-	-	-

7.1.4 Composición taxonómica de las comunidades de hongos

En el caso de la comunidad fúngica, se logró identificar 6 fila subclasificados en 19 clases, donde el filum Ascomycota representó en promedio más del 90% de la abundancia relativa en las comunidades asociadas a las dos especies de Cactus (Figura 7b). Estas comunidades estuvieron compuestas principalmente por miembros de los órdenes Pleosporales, Chaetothyriales y Capnodiales, que junto con los órdenes representados en la Figura 7b, y solo con excepción del orden Xilariales, mostraron diferencias significativas entre los seis compartimentos analizados (pruebas de Kruskal Wallis, $P \leq 0.05$, Tabla 2). Analizando únicamente

los compartimentos directamente asociados a las plantas, los órdenes Xilariales, Leotiales y Pezizales no mostraron diferencias significativas a lo largo de estos cuatro compartimentos (Tabla 3).

Un punto importante a considerar en las comunidades de hongos, era evaluar la presencia de hongos micorrízicos en los suelos y raíces de las plantas debido a la beneficiosa interacción con las plantas huésped (Cui and Nobel, 1992; Pimienta-Barrios et al., 2003). Con nuestro diseño experimental, se logró detectar secuencias que pertenecen a estos hongos, principalmente de los géneros *Entrophospora* y *Glomus* (Glomeromycota), los cuales representaron menos del 0.5% de la abundancia relativa en el suelo cercano a la raíz y rizósfera de *M. geometrizans* y menos del 0.15% en *O. robusta*, sugiriendo niveles bajos o nulos de colonización (Tabla 5). Sin embargo, este resultado debemos tomarlo con reservas, debido a que se conoce que el uso de los oligonucleótidos universales empleados en la amplificación del ITS2, enfocado a las comunidades hongos, no tienen la suficiente cobertura en la subdivisión Glomeromycota (Martin and Rygielwicz, 2005).

Tabla 5. Abundancia relativa (%) de la división Glomeromycota en los seis compartimentos asociados a las plantas de *M. geometrizans* y *O. robusta* en el 2012.

<i>M. geometrizans</i>						
Linaje	Suelo lejano	Suelo cercano	Rizósfera	Endósfera de raíz	Endósfera del tallo	Filósfera
<i>Entrophospora</i>	0.04	0.47	0.18	0.02	-	-
<i>Glomus</i>	0.03	0.08	0.002	0.01	-	-
<i>O. robusta</i>						
Linaje	Suelo lejano	Suelo cercano	Rizósfera	Endósfera de raíz	Endósfera del tallo	Filósfera
<i>Entrophospora</i>	0.03	0.14	0.04	0.003	-	-
<i>Glomus</i>	0.07	0.03	0.005	0.05	-	-

Al igual que en las comunidades de bacterias/arqueas, la composición taxonómica de las comunidades de hongos de las muestras de suelo y suelo cercano a la raíz fue similar entre ellas y en todas las plantas analizadas de las dos especies de Cactus, únicamente mostrando una disminución de la abundancia

relativa del orden Pleosporales en el suelo cercano a la raíz. Sin embargo, las comunidades epífitas y endófitas también se diferenciaron a través de los compartimentos de la planta y muy notablemente entre las especies de Cactus, mostrando una clara selección por parte de la planta huésped (Figura 7b). Así mismo, se identificaron también 270 OTUs específicos al suelo (Figura 5d), representados en 131 géneros. Sin embargo, estos diversos taxones de suelo conformaron menos del 1% de la abundancia relativa total de dichas muestras, lo que sugiere que la mayoría de los hongos asociados al suelo también fueron capaces de colonizar uno o más compartimentos asociados a las plantas de ambas especies de Cactus.

7.1.5 Discusión

La composición de las comunidades microbianas se ha relacionado directamente con la funcionalidad del sistema, en particular, con la eficiencia de la utilización de recursos (Hooper et al., 2012). En entornos con nutrientes limitados, como es el caso de los ambientes áridos y semiáridos, las comunidades microbianas han mostrado diferencias notables en la composición de las comunidades microbianas con otros sistemas (Fierer et al., 2012). En este estudio, se analizaron las comunidades de bacterias/arqueas y hongos asociadas a seis microhábitats de dos especies simpátricas de Cactus silvestres, bajo el efecto de factores abióticos comparativos como sitio y temporalidad. En investigaciones principalmente de comunidades microbianas de suelos y rizósfera en condiciones de aridez se han observado esencialmente, en orden de prioridad, los filo bacterianos Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarnes et al., 2014; Docherty et al., 2015; Makhallanyane et al., 2015; Puente et al., 2004a, 2004b; Wang et al., 2015) y los filo fúngicos Ascomycota y Basidiomycota (Coleman-Derr et al., 2016; Makhallanyane et al., 2015; Porrás-Alfaro et al., 2011). En nuestro estudio, las comunidades microbianas de los suelos, rizósfera y endósfera de raíz presentaron principalmente los mismos filo microbianos antes mencionados, sin grandes diferencias entre los microhábitats en la composición y abundancia de los taxones fúngicos. Esto último coincide con

la composición fúngica observada en el suelo y rizósfera de cinco especies de pastos nativos del desierto de Chihuahua en Nuevo México USA (Porrás-Alfaro et al., 2011), lo que sugiere que en las plantas xerófitas, la rizósfera ejerce bajos niveles de selección sobre las comunidades fúngicas del suelo. Sin embargo, en las comunidades bacterianas de la rizósfera, notamos un enriquecimiento por el filum Firmicutes, principalmente el género *Bacillus*, donde este último ha sido considerado como un género rico en especies productoras de metabolitos antimicrobianos y promotoras del crecimiento vegetal (Haque et al., 2015; Kavamura et al., 2013a, 2013b; Müller et al., 2015; Rhoden et al., 2015; Trapp et al., 2014). En contraste, la endósfera de raíz mostró una colonización más equitativa por los fila Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes y Gemmatimonadetes. Este patrón de colonización concuerda con lo observado en estudios de plantas suculentas bajo condiciones de aridez (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarennés et al., 2014) pero se contrasta con lo observado en estudios de plantas no suculentas bajo condiciones con y sin aridez (Bulgarelli et al., 2015; Edwards et al., 2015; Lundberg et al., 2012; Marasco et al., 2012; Zarraonaindia et al., 2015), lo que sugiere que en principio el microhábitat ejerce una presión selectiva por sus grupos taxonómicos bacterianos y un posible patrón de colonización de las especies de plantas suculentas en condiciones de aridez.

A diferencia de las comunidades microbianas que están en contacto directo con el suelo, las comunidades de la parte aérea de las plantas en condiciones de aridez han sido poco estudiadas. Los únicos estudios que se tienen hasta la fecha son de comunidades fúngicas, los cuales se han basado en métodos dependientes de cultivo en especies de plantas leñosas (Massimo et al., 2015; Sun et al., 2012) y en diferentes especies de Cactus (Suryanarayanan et al., 2005). Al igual que en las especies de Cactus aquí estudiadas, los miembros del filum Ascomycota principalmente las clases Dothideomycetes, Eurotiomycetes y Sordariomycetes fueron los miembros dominantes de las comunidades endófitas, aunque contrario a nuestro estudio, mostraron principalmente patrones generalistas en las plantas huésped. En particular, los géneros *Preussia*, *Phoma*,

Botryosphaeria, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* y *Chaetomium* fueron los más abundantes en las especies leñosas analizadas en el desierto de Sonora (Massimo et al., 2015), mientras que en nuestro estudio el género *Prathoda* fue el más abundante en *O. robusta* y el género Basidiomiceto *Henningsomyces* en *M. geometrizzans*. Sin embargo, también se observaron algunos géneros comunes en nuestras especies de Cactus que coinciden en los reportados en la literatura, como *Alternaria*, *Cladosporium* y *Aureobasidium*, sugiriendo que estos géneros podrían estar bien adaptados a la endósfera de los tallos de las Cactáceas, a pesar de la distancia geográfica entre el desierto de Sonora y el centro de México, lo que sugiere que las comunidades de la endósfera de los tallos de las especies de Cactus aquí estudiadas están compuestas por especies fúngicas específicas en conjunto con algunas especies generalistas.

Respecto a las comunidades de bacterias y arqueas en la filósfera, éstas mostraron similar colonización de taxones a los observados en el suelo, pero con notorio enriquecimiento de las clases Gammaproteobacteria y Oscillatoriothymiceae (Cianobacteria) esta última considerada como una clase de taxones fotosintéticos particularmente importantes en ambientes áridos oligotróficos, ya que están implicados en los procesos de los ciclos biogeoquímicos para la utilización de carbono o nitrógeno y de respuesta a estrés (Makhalanyane et al., 2015). En contraparte, las comunidades endófitas se vieron colonizadas principalmente por Sphingobacteria, Bacilli y Gammaproteobacteria, sugiriendo una importante selección por estos grupos taxonómicos.

Capítulo II. Diversidad de las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta*

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en: **Fonseca-García, C.**, Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. 2016. The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 150 doi:10.3389/fmicb.2016.00150.

7.2.1 Introducción

En entornos con nutrientes limitados, como es el caso de los ambientes áridos y semiáridos, una de las teorías más aceptadas de distribución biológica es la hipótesis de "isla de los recursos", que establece que las plantas promueven la heterogeneidad microbiana en los suelos mediante un mejoramiento de la fertilidad del suelo donde éstas se encuentran presentes (Herman et al., 1995). De hecho, se ha encontrado mayor abundancia de bacterias en los suelos cercanos a arbustos que en suelos abiertos (Pointing and Belnap, 2012). Por lo que, queda abierta la pregunta de si la diversidad microbiana en sistemas áridos aumenta por la presencia de plantas, y si además es comparable a la diversidad observada en otros sistemas.

Conjuntamente, otra pregunta crucial que sigue siendo cuestionada, es si la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a las plantas xerófitas es distinta entre las diferentes plantas huésped y entre sus comunidades externas (rizósfera y filósfera) e internas (endósfera de la raíz y del tallo). En una comparación filogenética de las comunidades bacterianas rizosféricas en plantas xerófitas (Andrew et al., 2012), encontraron pocas diferencias entre el saguaro (*Carnegiea gigantea*) y el cardón (*Pachycereus pringlei*), dos especies de Cactus ecológicamente equivalentes. Los autores concluyeron que comunidades de la rizósfera son un subgrupo de las del suelo, las cuales están influenciadas por las características fisico-químicas del mismo y la ubicación geográfica. La especificidad de la planta huésped juega un papel secundario en estas dos especies de Cactus ecológicamente equivalentes. Además, pocos estudios se han centrado en los cambios en la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a plantas por variaciones en la temporalidad en ambientes áridos y semiáridos, es decir, ¿disminuye la diversidad microbiana por los meses de sequía (aproximadamente 8 meses) que viven las plantas en estos ambientes? Hasta el momento, no se tienen estudios en Cactáceas que den cuenta de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos en conjunto, la mayoría se ha centrado en las comunidades bacterianas del suelo. Se desconoce por tanto, qué papel juegan los factores evaluados en la conformación de ambas comunidades.

Por lo tanto, un punto importante en esta investigación fue evaluar las diferencias y similitudes entre la diversidad microbiana asociada a dos especies de Cactus silvestres con crecimiento simpátrico, *M. geometrizzans* y *O. robusta*. Evaluar además, si la diversidad microbiana del suelo se ve afectada por la presencia de las dos especies de Cactus y del periodo prolongado de sequía comúnmente observado en estos sistemas de aridez. Para abordar lo antes planteado, se evaluó la diversidad de las comunidades microbianas de las muestras colectadas en el 2012, los resultados se comentan en este capítulo.

7.2.2 Diversidad de bacterias y arqueas en las Cactáceas

Con el fin de comparar la diversidad presente en las comunidades microbianas asociadas a las especies de Cactus, se empleó el perfil de entropía de Rényi, el cual ofrece un compilado de índices de diversidad conocidos dependiendo de sus valores de alfa (ver sección de análisis estadísticos de materiales y métodos). Los perfiles de entropía de Rényi globales de las comunidades de bacterias/arqueas de las estacionalidades de secas y lluvias, así como de los sitios de muestreo El Magueyal y San Felipe mostraron similar diversidad en los diferentes valores de alfa entre los niveles de cada factor evaluado (Figura 8a-b). En cambio, el perfil de entropía de Rényi de las dos especies de Cactus, mostró que la diversidad de bacterias/arqueas fue ligeramente mayor en *M. geometrizzans* que en *O. robusta* (Figura 8c). Así mismo, los perfiles de Rényi para los seis compartimentos revelaron claras diferencias entre la diversidad de cada microhábitat, siendo evidente que las muestras de suelo y suelo cercano a la raíz presentaron similar diversidad entre ellas y mayor que las comunidades asociadas directamente a las plantas. Interesantemente, el perfil de Rényi de las muestras de filósfera mostró mayor riqueza de especies (alfa = 0) y diversidad (alfa = 1 y 2), aunque menor dominancia (alfa infinito) que el perfil de las muestras de rizósfera. Adicionalmente, la endósfera de raíz fue más diversa que la correspondiente al tallo y que incluso a la rizósfera.

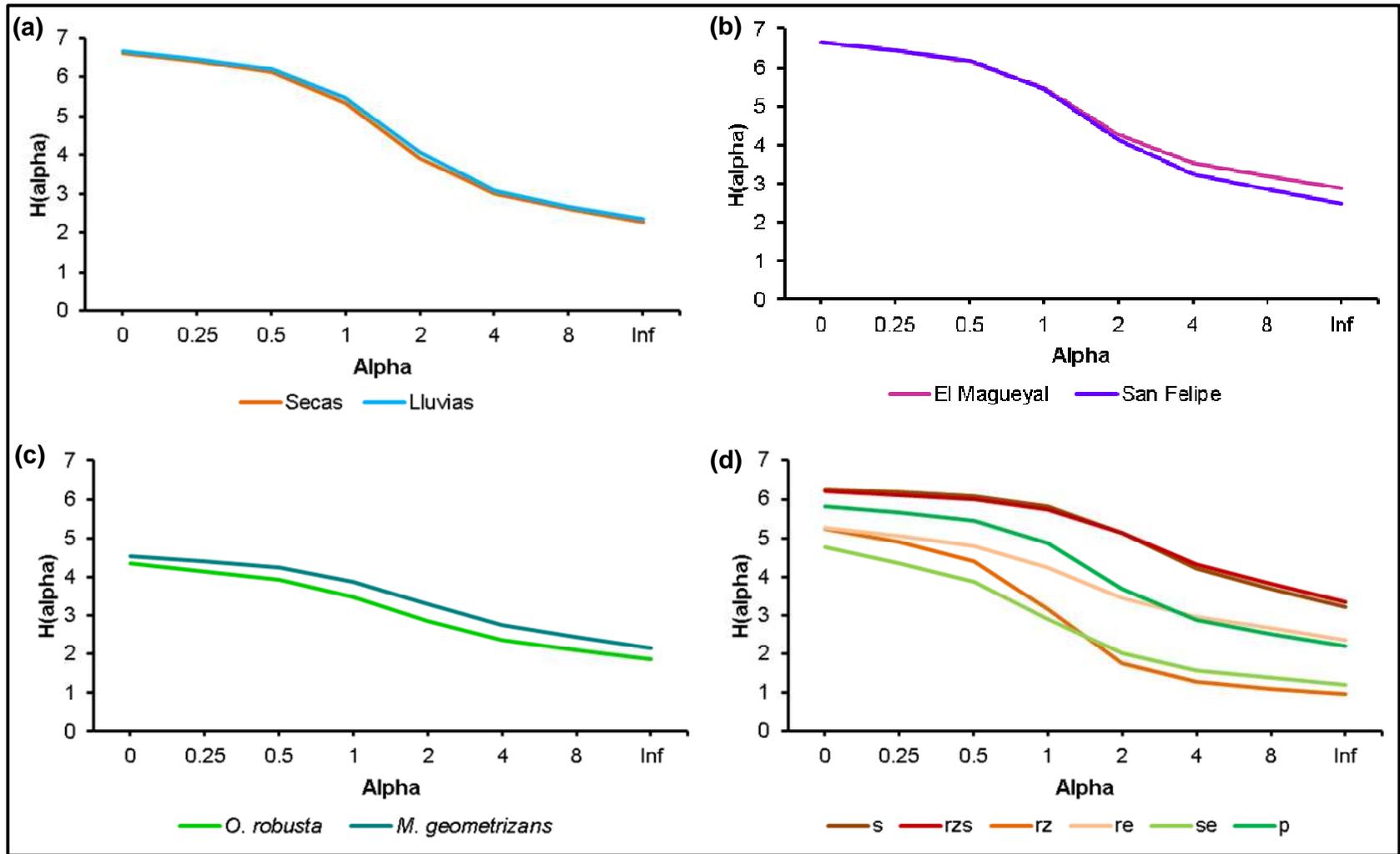


Figura 8. Perfiles de entropía de Rényi de las comunidades de bacterias/arqueas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* por factor analizado. Los perfiles indican la diversidad de bacterias/arqueas entre (a) la estacionalidad de secas y lluvias; (b) El Magueyal y San Felipe; (c) *M. geometrizans* y *O. robusta*; y (d) los seis compartimentos analizados.

Para corroborar estos resultados, realizamos un análisis de varianza tipo Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples tipo Dunn de los valores del índice de equidad de Shannon de los perfiles de entropía de Rényi analizados anteriormente. Nuestros análisis mostraron que no hubo diferencias significativas en la diversidad de Shannon entre las estaciones de secas y lluvias, y entre los sitios de muestreo como sugería el perfil de Rényi (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis para el índice de equidad de Shannon de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* en el 2012.

Comunidades de bacterias/arqueas					
Datos	Factor	Grados de libertad	Número de muestras	Índice de Shannon	
				χ^2	<i>P</i>
Global	Compartimento	5	47	34.906	1.57e-06
	Especie	1		1.272	0.2594
	Estacionalidad	1		0.011	0.9153
	Sitio	1		0.004	0.9491
<i>M. geometrizans</i>	Compartimento	5	23	17.588	0.0035
	Especie	1		0.378	0.5383
	Estacionalidad	1		0.242	0.6225
<i>O. robusta</i>	Compartimento	5	24	18.490	0.0023
	Especie	1		0.270	0.6033
	Estacionalidad	1		0.163	0.6861
Comunidades de hongos					
Datos	Factor	Grados de libertad	Número de muestras	Índice de Shannon	
				χ^2	<i>P</i>
Global	Compartimento	5	47	27.526	4.50e-05
	Especie	1		0.261	0.6095
	Estacionalidad	1		2.413	0.1203
	Sitio	1		1.043	0.3070
<i>M. geometrizans</i>	Compartimento	5	24	17.588	0.0030
	Especie	1		0.379	0.5383
	Estacionalidad	1		0.242	0.6225
<i>O. robusta</i>	Compartimento	5	23	12.865	0.0246
	Especie	1		0.458	0.4984
	Estacionalidad	1		0.136	0.7119

*Las diferencias significativas se resaltan en color gris con una $P \leq 0.05$

Sin embargo, tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre la diversidad de Shannon de las especies *M. geometrizzans* y *O. robusta*, a pesar de las ligeras diferencias observadas en el perfil de Rényi. Únicamente, se observaron diferencias significativas entre los seis compartimentos en ambas especies de Cactus (Tabla 7). Considerando entonces lo antes mencionado, realizamos la comparativa de la diversidad de Shannon entre los seis compartimentos analizados englobando las dos especies de Cactus (Tabla 7), confirmando que la diversidad de bacterias/arqueas de las comunidades del suelo fue significativamente mayor con respecto a la diversidad en las comunidades epífitas y endófitas asociadas a ambas especies. Además, también se confirmó que la diversidad de bacterias/arqueas de la filósfera fue significativamente mayor que la rizósfera a nivel global, mientras que la diversidad de la endósfera de la raíz fue ligeramente mayor que en la endósfera del tallo.

Tabla 7. Diversidad del índice de equidad de Shannon por tipo de muestra de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta* en el 2012.

Muestra	Comunidades de bacterias/arqueas			Comunidades de hongos		
	Global [§]	<i>M. geometrizzans</i> ^δ	<i>O. robusta</i> [¥]	Global	<i>M. geometrizzans</i> ^δ	<i>O. robusta</i> [¥]
Filósfera	4.06 ±0.82 ^b	4.385 ±0.26	3.74 ±1.09	2.62 ±0.68 ^b	3.055 ±0.26	2.176 ±0.71
Endósfera del tallo	2.4 ±0.67 ^c	2.654 ±0.52	2.139 ±0.78	1.89 ±0.68 ^b	1.905 ±0.44	2.173 ±1.03
Endósfera de raíz	3.32 ±0.96 ^{bc}	3.227 ±1.23	3.387 ±0.89	2.29 ±1.15 ^b	2.191 ±1.28	2.399 ±1.18
Rizósfera	2.46 ±1.45 ^c	3.004 ±1.76	1.919 ±1.01	3.6 ±0.29 ^a	3.803 ±0.11	3.393 ±0.25
Suelo cercano	4.88 ±0.15 ^a	4.948 ±0.14	4.806 ±0.13	3.79 ±0.47 ^a	3.936 ±0.06	3.647 ±0.6
Suelo lejano	4.89 ±0.16 ^a	4.908 ±0.15	4.879 ±0.17	3.91 ±0.35 ^a	4.099 ±0.17	3.723 ±0.40

Los valores de la tabla representan la media de cuatro repeticiones y su desviación estándar para cada caso.

[§] Diferencias estadísticamente significativas entre los compartimentos asociados a las especies de Cactus a nivel global después de la prueba Kruskal-Wallis y Dunn para el índice de Shannon, en las comunidades de bacterias/arqueas ($H_{5,47} = 34.906$, $P = 1.571e-6$) y de hongos ($H_{5,47} = 27.526$, $P = 4.504e-5$).

^δ Diferencias estadísticamente significativas entre los compartimentos asociados a *M. geometrizzans* después de la prueba Kruskal-Wallis para el índice de Shannon, en las comunidades de bacterias/arqueas ($H_{5,23} = 17.588$, $P = 0,0035$) y de hongos ($H_{5,24} = 15.480$, $P = 0,0084$).

[¥] Diferencias estadísticamente significativas entre los compartimentos asociados a *O. robusta* después de la prueba Kruskal-Wallis para el índice de Shannon, en las comunidades de bacterias/arqueas ($H_{5,24} = 18.490$, $P = 0,0023$) y de hongos ($H_{5,23} = 12.865$, $P = 0,0246$).

Estos resultados sugieren que el compartimento de la planta influye directamente en la diversidad de bacterias/arqueas, observándose una clara dominancia en algunos compartimentos.

7.2.3 Diversidad de hongos en las Cactáceas

Al igual que en las comunidades bacterias/arqueas, se empleó el perfil de entropía de Rényi para comparar la diversidad fúngica presente en las comunidades asociadas a las especies de Cactus. Los perfiles de entropía de Rényi mostraron que, la diversidad fúngica observada entre las estacionalidades y los sitios de muestreo fue similar para los niveles de cada factor (Figura 9a-b). En cambio, el perfil de entropía de Rényi de las dos especies de Cactus, mostró que la diversidad fue ligeramente mayor en *M. geometrizzans* que en *O. robusta* (Figura 9c). Así mismo, los perfiles de Rényi para los seis compartimentos revelaron diferencias entre la diversidad de la parte aérea de las plantas y la parte que está en contacto directo con el suelo, siendo evidente que las muestras de suelo, suelo cercano a la raíz y rizósfera presentaron similar diversidad entre ellas y mayor que las comunidades asociadas a la parte aérea y endósfera de raíz. Contrario a las comunidades de bacterias/arqueas, la diversidad de la filósfera fue menor que la diversidad de la rizósfera, y la endósfera de tallo mostró la menor riqueza de taxones tanto en hongos como en bacterias/arqueas.

Nuevamente, realizamos un análisis de varianza tipo Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples tipo Dunn de los valores del índice de equidad de Shannon para validar lo observado en los perfiles de entropía de Rényi de las comunidades de hongos. En este caso, tampoco observamos diferencias significativas entre las especies de Cactus, las estaciones de secas y lluvias, y los sitios de muestreo. Nuevamente, sólo se observó diferencias significativas entre los seis microhábitats (Tabla 6-7). Sin embargo, a diferencia de las comunidades de bacterias/arqueas, la diversidad de hongos en los suelos y la rizósfera fue significativamente similar, al igual que entre las endósferas y la filósfera; mostrando diferencias significativas únicamente entre estos dos grupos en ambas especies de Cactus.

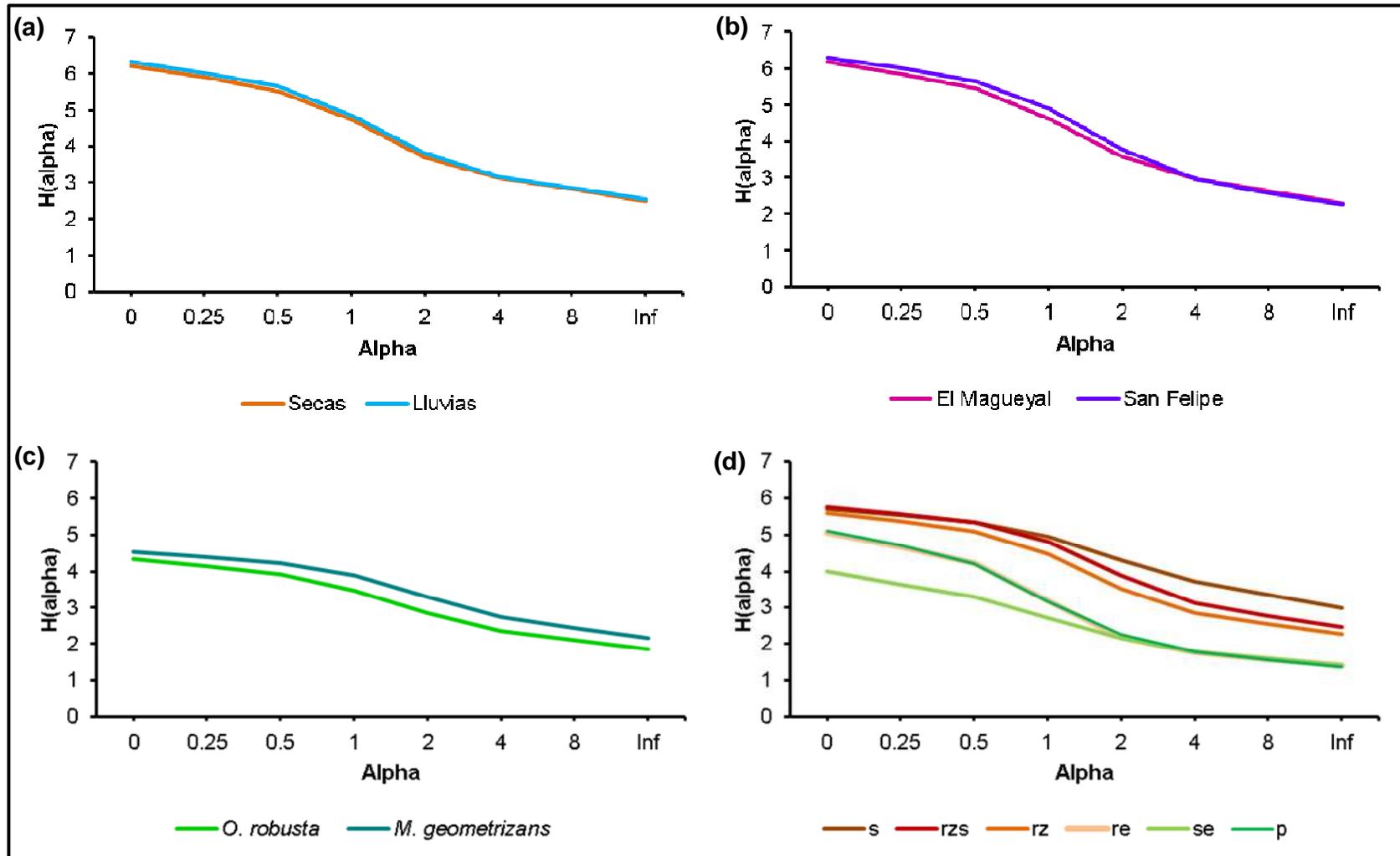


Figura 9. Perfiles de entropía de Rényi de las comunidades de hongos asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* por factor analizado. Los perfiles indican la diversidad de hongos entre (a) la estacionalidad de secas y lluvias; (b) El Magueyal y San Felipe; (c) *M. geometrizans* y *O. robusta*; y (d) los seis compartimentos analizados.

7.2.4 Discusión

La biodiversidad ha sido reconocida como el principal factor que afecta el funcionamiento de los ecosistemas (Balvanera et al., 2006; Wagg et al., 2014). Varios estudios han tratado de vincular alteraciones en la biodiversidad al funcionamiento del suelo, lo que demuestra que la estabilidad funcional del suelo es muy dependiente de la diversidad microbiana (Wagg et al., 2014). El incremento de la diversidad microbiana aumenta la resistencia y resiliencia de los procesos microbianos, y la presencia de equidad en la comunidad favorece la funcionalidad bajo condiciones de estrés (Wittebolle et al., 2009). Sin embargo, las comunidades microbianas asociadas a plantas no siempre presentan equidad en sus comunidades (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarennes et al., 2014; Edwards et al., 2015; Lundberg et al., 2012; Marasco et al., 2012; Zarraonaindia et al., 2015). En nuestro estudio, los resultados sugieren que, así como otros estudios con plantas suculentas y no suculentas (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarennes et al., 2014; Köberl et al., 2011; Lundberg et al., 2012; Makhalanyane et al., 2015; Marasco et al., 2012; Singh et al., 2009; Zarraonaindia et al., 2015), los suelos (lejano y cercano) mantienen la más alta diversidad taxonómica microbiana mientras que la endósfera del tallo tuvo la más baja, a pesar de que la distancia entre los suelos analizados fue considerablemente distinta. En suelos limitados de nutrientes se ha estimado que la diversidad microbiana puede ser más baja (Makhalanyane et al., 2013), sin embargo, los niveles observados en éste y otros estudios de sistemas áridos (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarennes et al., 2014; Fierer et al., 2012; Kavamura et al., 2013b) son comparables con sistemas ricos en nutrientes, al menos en el caso de las bacterias (Mendes et al., 2015).

Una considerable reducción de los niveles de equidad (índice de Shannon) fue observada en las comunidades externas de bacterias/arqueas (rizósfera y filósfera) e internas (endósfera de la raíz y del tallo) en comparación con los suelos, presentando además un considerable aumento de la dominancia (índice de Berger-Parker) de las comunidades. Este último resultado fue más notable en la rizósfera de ambas especies de Cactus, lo que podría ser un reflejo del llamado “efecto rizósfera” sobre la selección de las comunidades de bacterias/arqueas

asociadas, este término fue acuñado por Starkey (1938) el cual considera el efecto de los procesos colectivos que se producen en el suelo de la superficie de la raíz de una planta e incluye la exudación de la raíz, la actividad microbiana, el intercambio genético, la transformación y difusión de los nutrientes.

Además, cabe destacar que las comunidades de bacterias/arqueas de la filósfera de los Cactus mostraron mayor diversidad que las de la rizósfera, a pesar del hecho de que las comunidades de la filósfera están directamente expuestas a alta radiación UV y a gradientes de altas temperaturas. Este resultado coincide con la diversidad de bacterias/arqueas reportada en la filósfera y rizósfera de especies de *Agave* nativos (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarenes et al., 2014), lo que sugiere que los microorganismos en la filósfera de las plantas CAM nativas pueden tener patrones de colonización y funcionalidad similares. Hemos planteado el supuesto de que la alta diversidad de bacterias/arqueas observada podría estar relacionada con la presencia de la clase de Cianobacteria Oscillatoriothyraceae, representada principalmente por los géneros *Microcoleus* y *Phormidium* observados en el Capítulo I. Diferentes reportes han demostrado que las cianobacterias han sido especies pioneras en hábitats en superficies aéreas, debido a su capacidad para fijar nitrógeno y formar biopelículas que funcionan como reservorio de agua y nutrientes, los cuales se consideran protegen a las células ahí embebidas de las condiciones ambientales adversas incluyendo la radiación UV (Freiberg, 1998; Fürnkranz et al., 2008; Gorbushina, 2007; Makhallanyane et al., 2015; Omoregie et al., 2004; Pereg et al., 1994; Valverde et al., 2015). Particularmente, el género *Microcoleus* presenta especies pioneras en hábitats aéreos y suelos desérticos (Čapková et al., 2016; Nunes da Rocha et al., 2015; Zhang et al., 2015). Por lo tanto, es posible que las especies de cianobacterias aquí identificadas puedan proporcionar una entrada significativa de nitrógeno y un ambiente cómodo de humedad y protección ante estrés abiótico, favoreciendo la proliferación de otros grupos de bacterias/arqueas y hongos en condiciones de aridez.

Por otro lado, y contrario a las comunidades de bacterias/arqueas, las comunidades de hongos mostraron similares niveles de diversidad en los suelos y

en la rizósfera de las especies de Cactus. Este resultado coincide con la diversidad fúngica observada en el suelo y rizósfera de cinco especies de pastos nativos del desierto de Chihuahua en Nuevo México USA (Porrás-Alfaro et al., 2011), lo que sugiere que en las plantas xerófitas, la rizósfera ejerce bajos niveles de selección sobre las comunidades de hongos del suelo. Además en nuestro estudio, las comunidades endófitas y de la filósfera presentaron menor diversidad que las comunidades asociadas al suelo.

Capítulo III. Factores que determinan la estructura de las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta*

Los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en: **Fonseca-García, C.**, Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. 2016. The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 150 doi:10.3389/fmicb.2016.00150.

7.3.1 Introducción

En la actual era genómica, diferentes estudios han utilizado secuenciación etiquetada de alto rendimiento para proporcionar nuevos conocimientos sobre la composición microbiana y la organización de diferentes microbiomas de plantas. En ambientes áridos, se ha observado que la estructura microbiana está influenciada por factores abióticos, tales como las fluctuaciones extremas de temperatura, radiación UV elevada, bajo contenido en nutrientes, contenido de humedad del suelo y localización geográfica (Aguirre-Garrido et al., 2012; Andrew et al., 2012; Coleman-Derr et al., 2016), y por factores bióticos, tales el compartimento de la planta huésped (Aguirre-Garrido et al., 2012; Coleman-Derr et al., 2016; Desgarenes et al., 2014; Khidir et al., 2010). Estos estudios han abierto camino hacia una nueva comprensión de la composición y estructura del microbioma de las plantas xerófitas y de los factores que los afectan.

Sin embargo, esta comprensión se encuentra aún en las etapas iniciales, y varias preguntas clave están aún sin respuesta debido a las limitaciones de los modelos. Una de esas preguntas es, si la estructura de las comunidades microbianas esta mediada por la planta huésped, factor que no ha podido ser evaluado debido a que las especies comparadas hasta el momento no se desarrollan en el mismo hábitat. Es por ello, que nos cuestionamos qué factores modulan la estructura de las comunidades microbianas asociadas a especies de Cactáceas que se desarrollan en el mismo hábitat, como se ha venido planteando en los capítulos anteriores. Para abordar esta pregunta, analizamos la estructura de las comunidades microbianas de las muestras colectadas en el 2012 mediante análisis estadísticos multivariados, los resultados se discuten en este capítulo.

7.3.2 Factores que modulan las comunidades de bacterias/arqueas en Cactáceas

Con el propósito de evaluar cual o cuales factores modulan las comunidades de bacterias/arqueas en los Cactus, como primer paso empleamos un Análisis de Similitud (AnoSim, siglas en inglés) considerando todos los factores bióticos y abióticos incluidos en el diseño experimental (Tabla 8). Los resultados indicaron

que el compartimento fue el único factor que presentó efecto significativo en la composición de las comunidades, mostrando una R_{AnoSim} de 0.628 y $P=0.001$ a nivel global. Así mismo, las comparaciones a nivel global del compartimento sobre los factores especie de Cactus, sitio y estacionalidad presentaron un efecto significativo con una R_{AnoSim} de 0.628 y $P=0.001$. Adicionalmente, la comparación global entre especie de Cactus y sitio sobre el compartimento presentaron efecto significativo con un valor de $P<0.05$ pero con un valor de R negativo, lo cual sugiere que existen diferencias significativas entre las especies de Cactus y entre los sitios de muestreo en algunos compartimentos, pero la disimilitud no es tan grande.

Basándonos en las diferencias significativas observadas entre los seis compartimentos, evaluamos los factores que influyen de manera individual en cada compartimento analizado, en dos subgrupos asociados a las plantas: parte aérea (filósfera y endósfera del tallo) y zona en contacto con el suelo (rizósfera y endósfera de raíz), así como las comunidades epífitas (rizósfera y filósfera), endófitas (endósfera de raíz y tallo) y de los suelos (suelo y suelo cercano a la raíz). El AnoSim de la endósfera de la raíz y tallo mostró un efecto significativo en la especie de Cactus, así como la comparación entre la especie de Cactus sobre la estacionalidad y sitio de muestreo con valores de R_{AnoSim} de 0.46 hasta 0.76. Lo que sugiere una fuerte influencia de la especie en estos dos compartimentos. El AnoSim de los subgrupos de la parte aérea y de la zona en contacto con el suelo, mostró nuevamente que el compartimento es el factor más importante en el ensamblado de la comunidad de bacterias/arqueas en ambas zonas de las plantas con valores de R_{AnoSim} de 0.70 hasta 0.98.

Por otro lado, el AnoSim del grupo de los suelos mostró como único efecto significativo el sitio de muestreo con una R_{AnoSim} de 0.248, sugiriendo diferencias en los suelos entre los sitios de muestreo, aunque debido, al ligeramente bajo valor de R, dicha disimilitud es pequeña como se había observado en el análisis de distribución taxonómica. De igual manera, el AnoSim de la epífera presentó únicamente efecto significativo el compartimento con una R_{AnoSim} de 0.574, evidenciando las diferencias entre la rizósfera y filósfera.

Tabla 8. Análisis de similitud (AnoSim) a partir de una matriz de disimilitud calculada con distancia Bray-Curtis de todos los factores evaluados para el 2012.

	Factor	Bacterias/Arqueas		Hongos	
		AnoSim R	P	AnoSim R	P
Global (s, rzs, rz, p, re, se: las 48 muestras)	^a Compartimento _{6,48,999}	0.6285	0.001	0.6600	0.001
	^b Compartimento ₆ por Especie _{2,8,999}	0.6285	0.001	0.6600	0.001
	^b Compartimento ₆ por Estacionalidad _{2,8,999}	0.6285	0.001	0.6600	0.001
	^b Compartimento ₆ por Sitio _{2,8,999}	0.6285	0.001	0.6600	0.001
	^b Especie ₂ por Compartimento _{6,24,999}	-0.0022	0.005	0.0142	0.001
	^b Estacionalidad ₂ por Compartimento _{6,24,999}			0.0004	0.016
	^b Sitio ₂ por Compartimento _{6,24,999}	-0.0080	0.016	0.0459	0.001
Filósfera	^a Especie _{2,8,999}			0.2708	0.057
Endósfera del tallo	^a Especie _{2,8/7,999}	0.7604	0.027	0.3148	0.056
	^b Especie ₂ por Estacionalidad _{2,4/3,576/144}	0.7604	0.057	0.3148	0.041
	^b Especie ₂ por Sitio _{2,4,576}	0.7604	0.050		
Endósfera de raíz	^a Especie _{2,7,999}	0.4630	0.030		
	^b Especie ₂ por Estacionalidad _{2,3,144}	0.4630	0.056		
	^b Estacionalidad ₂ por Sitio _{2,4,576}			0.2188	0.054
Rizósfera	^a Sitio _{2,8,999}			0.6979	0.031
	^b Sitio ₂ por Estacionalidad _{2,4,576}			0.6979	0.054
Suelo cercano	^a Sitio _{2,8,999}			0.4792	0.027
	^b Sitio ₂ por Especie _{2,4,576}			0.4792	0.039
Suelo	^a Sitio _{2,8,999}			0.8646	0.027
	^b Sitio ₂ por Estacionalidad _{2,4,576}			0.8646	0.038
Parte aérea (p-se)	^a Compartimento _{2,16/15,999}	0.9782	0.001	0.9978	0.001
	^b Compartimento ₂ por Especie _{2,8/7,999}	0.9782	0.001	0.9978	0.001
	^b Compartimento ₂ por Estacionalidad _{2,8/7,999}	0.9782	0.002	0.9978	0.001
	^b Compartimento ₂ por Sitio _{2,8/7,999}	0.9782	0.001	0.9978	0.001
	^b Especie ₂ por Compartimento _{2,8/7,999}	-0.02623	0.050	-0.02551	0.033
Zona en contacto con el suelo (re-rz)	^a Compartimento _{2,15/16,999}	0.7063	0.002	0.4900	0.001
	^b Compartimento ₂ por Especie _{2,7/8,999}	0.7063	0.001	0.4900	0.002
	^b Compartimento ₂ por Estacionalidad _{2,7/8,999}	0.7063	0.001	0.4900	0.002
	^b Compartimento ₂ por Sitio _{2,7/8,999}	0.7063	0.001	0.4900	0.002
	^b Especie ₂ por Compartimento _{2,8,999}			0.0820	0.017
^b Sitio ₂ por Compartimento _{2,8,999}			0.1066	0.013	
Epísfera (rz-p)	^a Compartimento _{2,16,999}	0.5742	0.001	0.9944	0.001
Endósfera (re-se)	^a Compartimento _{2,15,999}	0.8061	0.001	0.8214	0.001
	^a Especie _{2,15,999}	0.2128	0.044	0.0627	0.217
Suelos (s-rsz)	^a Sitio _{2,16,999}	0.2483	0.036		

a. Los subíndices separados por comas indican para cada factor: el número de niveles, el número de réplicas totales y permutaciones empleadas en cada prueba de AnoSim.

b. Los subíndices indican para el primer factor el número de niveles y para el segundo factor, los subíndices separados por comas: el número de niveles, el número de réplicas totales y permutaciones empleadas en cada prueba de AnoSim.

En casos particulares, la diagonal separa los datos de bacteria/arqueas (izquierda) y los hongos (derecha).

Finalmente, el AnoSim de la endósfera mostró diferencias significativas en el compartimento con una R_{AnoSim} de 0.806 y $P=0.001$, y en la especie de Cactus con una R_{AnoSim} de 0.213 y $P=0.044$, sugiriendo, además de las diferencias entre la endósfera de raíz y del tallo, ligeras diferencias entre las especies de Cactus como ya lo había indicado el AnoSim individual de ambos compartimentos.

Para corroborar los resultados obtenidos en el AnoSim, se utilizó un análisis de ordenamiento no paramétrico, Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS, siglas en inglés). Los análisis de NMDS se basaron en matrices de disimilitud calculadas con la distancia Bray-Curtis. Estos análisis mostraron que el conjunto de datos a nivel global se agrupó en la coordenada 1, las muestras de los suelos (suelo y suelo cercano), seguido de las muestras epífitas (rizósfera y filósfera) de lado izquierdo (todas comunidades externas a las plantas) y las muestras de endófitos (endósfera de la raíz y tallo) de lado derecho. Mientras que en la coordenada 2, se agruparon en el centro las muestras de suelo, en la parte superior las comunidades que están en contacto con el suelo (rizósfera y endósfera de raíz) y en la parte inferior de la coordenada la parte aérea de la planta (filósfera y endósfera del tallo) (Figura 10a). Empleando únicamente las muestras de la endósfera el análisis de agrupamiento mostró nuevamente una clara separación entre las muestras de endósfera de raíz y de tallo con una influencia de las plantas huésped, siendo más evidente este efecto en la endósfera del tallo (Figura 10b). Estos resultados en conjunto con los resultados del AnoSim sugieren que el factor que más influye en las comunidades de bacterias/arqueas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* es el compartimento (microhábitat) influenciado de forma secundaria por la especie de Cactus.

7.3.3 Factores que modulan las comunidades de hongos en Cactáceas

Al igual que en las comunidades de bacterias/arqueas, se empleó un AnoSim para evaluar la similitud entre las comunidades de hongos considerando también los factores planteados en el diseño experimental, corroborando los resultados con el análisis de ordenamiento NMDS. El AnoSim reveló que, a nivel global el factor

biótico compartimento y en las combinaciones entre compartimentos y especie de Cactus, sitio y estacionalidad fueron significativas con una R_{AnoSim} de 0.660 y $P=0.001$ (Tabla 8).

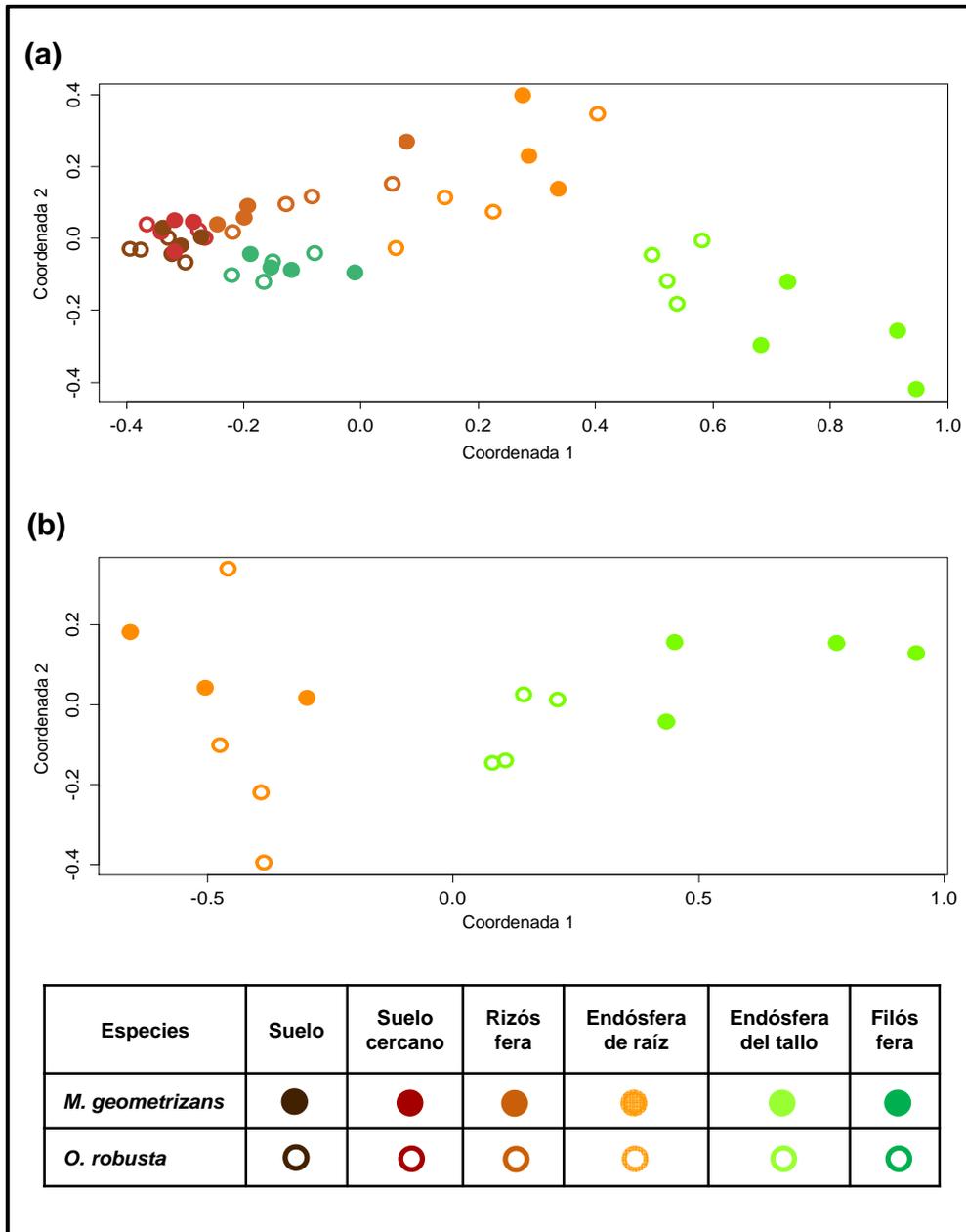


Figura 10. NMDS de las comunidades de bacterias/arqueas asociadas a *M. geometrizans* (símbolos rellenos) y *O. robusta* (símbolos vacíos). (a) NMDS global (NMDS stress: 0.07), y (b) NMDS de las comunidades endófitas (NMDS stress: 0.07).

Adicionalmente, y similar a las comunidades de bacterias/arqueas, la combinación global entre especie de Cactus, sitio y estacionalidad sobre el compartimento, presentaron efecto significativo con un valor de $P \leq 0.01$ pero con valores de R cercanos al cero, lo cual sugiere que existen diferencias significativas entre las especies de Cactus, entre los sitios de muestreo y entre la estacionalidad de secas y lluvias en algunos compartimentos, pero dicha disimilitud es pequeña.

Basándonos nuevamente en las diferencias significativas observadas entre los seis compartimentos, evaluamos los factores que influyen de manera individual en cada compartimento analizado, en dos subgrupos asociados a las plantas: parte aérea y zona en contacto con el suelo, así como las comunidades epífitas, endófitas y de los suelos. A diferencia de la comunidades de bacterias/arqueas, en las comunidades de hongos el sitio de muestreo fue el único factor que mostró un efecto significativo en la rizósfera, suelo cercano y suelo lejano, así como la combinación del sitio sobre la estacionalidad, sugiriendo diferencias significativas en la comunidad fúngica entre ambos sitios y estacionalidades en los compartimento mencionados. Nuevamente, el AnoSim de los subgrupos de la parte aérea y de la zona en contacto con el suelo, mostró que el compartimento es el factor más importante en el ensamblado de la comunidad de hongos en ambas zonas de las plantas con valores de R_{AnoSim} de 0.50 hasta 0.99.

El AnoSim de la epífera y endósfera presentaron diferencias significativas en el compartimento, con una R_{AnoSim} de 0.994 y $P=0.001$ para la epífera, y con una R_{AnoSim} de 0.821 y $P=0.001$ para la endósfera, evidenciando claramente las diferencias entre la rizósfera y filósfera, y entre la endósfera de raíz y del tallo (Tabla 8).

Por su parte, el NMDS que representa las comunidades de hongos, muestra cuatro grupos claramente diferenciados agrupados por los compartimentos analizados, observándose de lado izquierdo la endósfera del tallo, la endósfera de la raíz en la parte superior del centro, la filósfera en la parte inferior derecha de la coordenada 1 y un grupo mixto en el centro del lado derecho de la coordenada 1, integrado principalmente por las muestras de la rizósfera y suelos, además de dos muestras de endófitos de raíz del estadio de lluvias del sitio San Francisco (Figura

11a). El NMDS de las muestras de la endósfera también mostró una clara diferencia entre la endósfera de raíz y del tallo, influenciadas por las plantas huéspedes (Figura 11b).

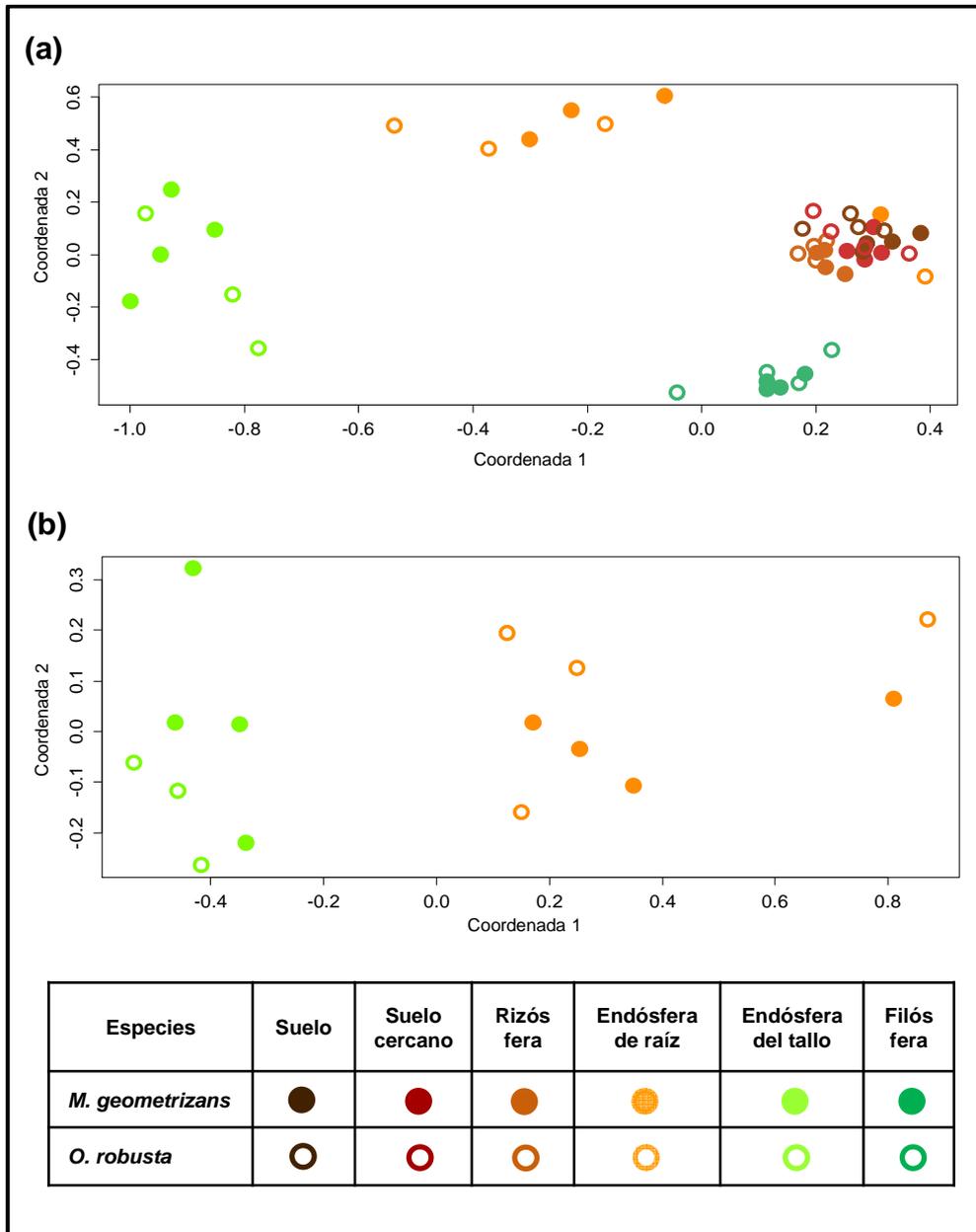


Figura 11. NMDS de las comunidades de hongos asociadas a *M. geometrizans* (símbolos rellenos) y *O. robusta* (símbolos vacíos). (a) NMDS global (NMDS stress: 0.11), y (b) NMDS de las comunidades endófitas (NMDS stress: 0.09).

Estos resultados en conjunto con los resultados del AnoSim sugieren que, similar que en las comunidades de bacterias/arqueas, el factor que más influye en las comunidades de hongos asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* es el microhábitat influenciado de forma secundaria por la especie de Cactus.

7.3.4 Discusión

El ensamblado de las comunidades microbianas asociadas a las plantas se ve influido por los filtros ambientales, como las características del suelo, cambios estacionales, la especie huésped y las fuerzas estocásticas (Benson et al., 2010; Bulgarelli et al., 2015; Caruso et al., 2011; Chaparro et al., 2014; Coleman-Derr et al., 2016; Costa et al., 2006; Edwards et al., 2015; Gaidos et al., 2009; Grayston et al., 1998; Kembel et al., 2014; Lebeis, 2014; Lundberg et al., 2012; Maignien et al., 2014; Makhalanyane et al., 2015; Massimo et al., 2015; Schlaeppi et al., 2014; Shakya et al., 2013; Vorholt, 2012; Zarraonaindia et al., 2015).

En este estudio, se evaluó el efecto de factores bióticos, como especie huésped y sus compartimentos, y abióticos como sitio y temporalidad, sobre la estructura de las comunidades microbianas asociadas a plantas xerófitas suculentas. Nuestros resultados mostraron que la especificidad de la planta huésped, la biogeografía de las especies de plantas, y la temporada no influyeron de manera importante en el ensamblado de la composición microbiana a nivel global. Sin embargo, hubo diferencias claras entre las comunidades microbianas de los microhábitats analizados (suelo, suelo cercano, rizósfera, endósfera de la raíz, endósfera del tallo y filósfera), revelando a este factor biótico como el factor con mayor influencia sobre las comunidades microbianas. La biogeografía de las especies de Cactus no presentó efecto significativo sobre las comunidades asociadas a las plantas y sólo sutiles diferencias en la rizósfera y suelos de las comunidades de hongos, probablemente, debido a las similares características del suelo y condiciones ambientales entre los sitios de El Magueyal y San Felipe en 2012, que se encuentran únicamente a 130 kilómetros de distancia.

Además, a diferencia de otros estudios sobre comunidades microbianas de suelo donde la estacionalidad ha sido uno de los factores más determinantes en el

ensamblado de las comunidades (Aguirre-Garrido et al., 2012; Andrew et al., 2012; Chhabra et al., 2013; Docherty et al., 2015; Jansa and Angue, 2010; Makhalanyane et al., 2015; Singh et al., 2009; Torres-Cortés et al., 2012), en el nuestro, la estacionalidad sólo presentó una ligera influencia sobre la estructura de las comunidades microbianas del suelo y ninguna en las comunidades asociadas a la planta. Estos resultados son consistentes con los patrones encontrados en *A. salmiana*, una tercera especie simpátrica de las especies de Cactus aquí estudiadas (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarenes et al., 2014).

Estudios recientes en sistemas modelo de plantas suculentas y no suculentas han demostrado que el tipo de compartimiento de la planta o microhábitat explica la mayor parte de la variación en la composición microbiana (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarenes et al., 2014; Edwards et al., 2015; Jin et al., 2014; Khidir et al., 2010; Lundberg et al., 2012; Massimo et al., 2015; Singh et al., 2009; Zarraonaindia et al., 2015). Estos resultados, junto con nuestro estudio sugieren que las comunidades de Bacterias, Arqueas y Hongos se seleccionan generalmente por el compartimiento de la planta y están influenciadas en menor medida por la planta huésped.

Capítulo IV. “Core” microbiano con otras especies CAM

Parte de los datos utilizados en este capítulo fueron colectados y procesados experimentalmente por la M. en C. Damaris del Carmen Desgarenes Valido y publicados en el artículo: Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., **Fonseca-García, C.**, Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P. and Tringe, S. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol.* 209:2, 798. doi:10.1111/nph.13697.

7.4.1 Introducción

Una de las preguntas clave que abordamos también en este trabajo fue, en qué medida las especies de plantas CAM que viven en el mismo hábitat seleccionan similares taxones microbianos, es decir, evaluar el efecto del hábitat contra la especificidad del huésped sobre las comunidades microbianas. Para responder esto de una manera amplia, se hizo uso de los datos generados en el Laboratorio de Interacciones Microbianas sobre *Agave salmiana*, una tercer especie simpátrica también con metabolismo CAM (Coleman-Derr et al., 2016), comparando la distribución taxonómica de sus comunidades microbianas asociadas con las comunidades microbianas de las especies de Cactus aquí descritas. Cabe señalar que los datos generados de *A. salmiana* fueron obtenidos simultáneamente con los datos de las especies de Cactus para el 2012 empleando el mismo diseño experimental, además de haber sido procesados y analizados bajo los mismos protocolos experimentales y de calidad para las tres especies CAM.

A partir de este capítulo, utilizaremos la definición del "Core microbiano de las especies CAM" (Shade and Handelsman, 2012; Vandenkoornhuyse et al., 2015) para todos los taxones de bacterias/arqueas y hongos compartidos entre las tres especies de plantas CAM en los compartimentos de la rizósfera, endósfera de tallo, endósfera de raíz y filósfera.

7.4.2 “Core” de bacterias/arqueas entre las simpátricas especies CAM

El análisis de distribución de los taxones de bacterias/arqueas en los compartimentos de las plantas mostraron que, en general, las tres especies CAM compartieron alrededor del 70% del número de OTUs en los suelos, el 50% en la rizósfera y en la filósfera, mientras que en la endósfera de raíz compartieron únicamente el 18% de los OTUs y el 12% en la endósfera del tallo (Figura 12a). Sin embargo, los OTUs compartidos representaron en cada especie CAM del 80 al 98% de la abundancia relativa total en los seis compartimentos, sin importar el bajo porcentaje compartido en la endósfera de raíz y tallo (Figura 12b).

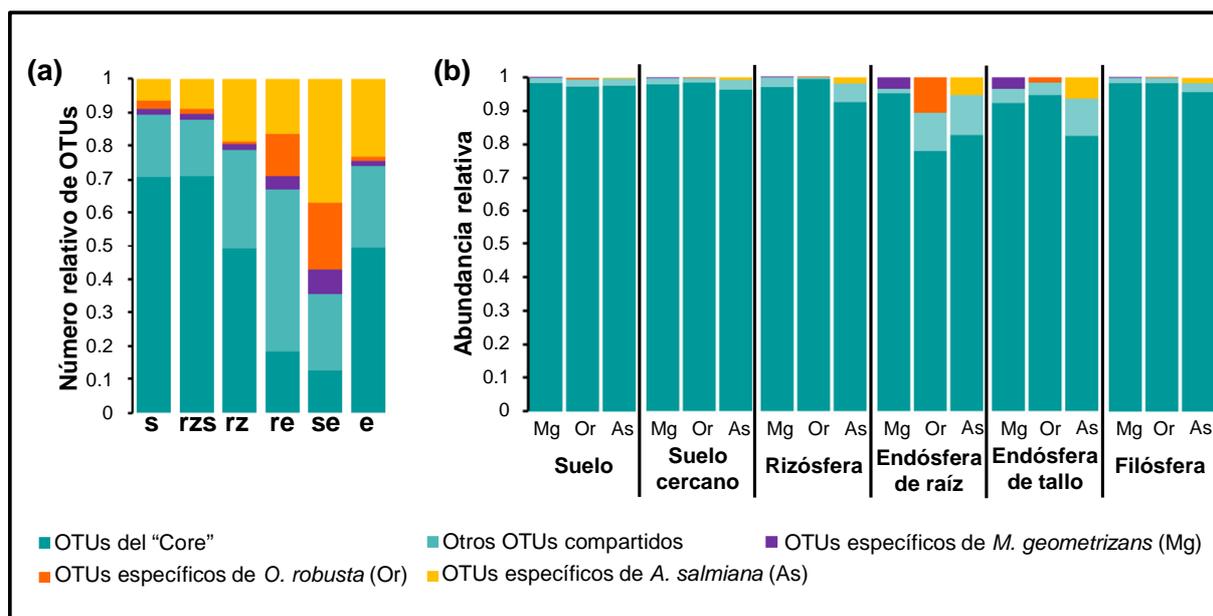


Figura 12. Número (a) y abundancia relativa (b) de los OTUs de bacterias/arqueas específicos y del "Core" de las tres especies CAM en cada compartimento analizado.

A pesar de los altos porcentajes de abundancia relativa que representan los OTUs compartidos en las tres especies CAM, algunos grupos taxonómicos presentaron diferencias significativas entre las tres especies en los cuatro compartimentos asociados directamente a las plantas (Figura 13). Tres clases cambiaron significativamente su abundancia entre especies CAM, las Gammaproteobacterias, Flavobacterias y Shpingobacteria cambiaron en la rizósfera, mientras la última también lo hizo en la endósfera de raíz y tallo, sugiriendo un efecto de la planta huésped sobre estas tres clases bacterianas.

Con base en estos resultados, hicimos uso del concepto de Pareto (la regla del 20-80, donde el 20% o menos de los taxones representan en conjunto el 80% de la abundancia relativa) para evaluar si el "Core" de bacterias/arqueas de las especies CAM presenta patrones similares de frecuencia y abundancia en cada planta huésped, además de identificar los taxones indicadores de cada compartimento. Estos análisis revelaron que la clase Bacilli (principalmente el OTU No. 7) dominó la rizósfera de las tres especies CAM; miembros de las clases Gammaproteobacteria y Oscillatorioophycideae, esta última perteneciente al filum Cyanobacteria, fueron indicativos de la filósfera de bacterias/arqueas.

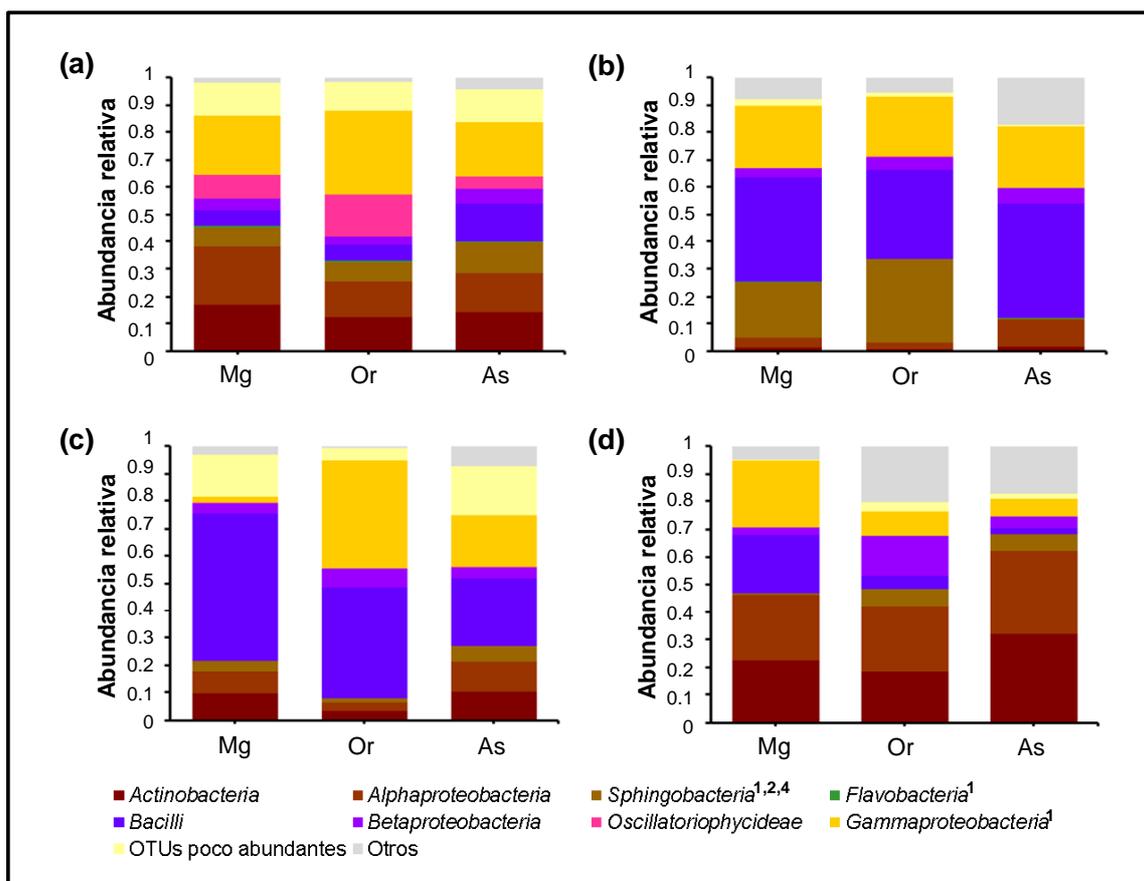


Figura 13. Abundancia relativa de la distribución taxonómica del "Core" de bacterias/arqueas las tres especies CAM en (a) la filósfera, (b) endósfera del tallo, (c) rizósfera y (d) endósfera de raíz. Las clases de bacterias/arqueas marcadas representan diferencias estadísticamente significativas entre las tres especies huésped después de la prueba de Kruskal-Wallis, con $P \leq 0.05$ en los siguientes compartimentos: ¹rizósfera, ²endósfera de raíz, ³filósfera y ⁴endósfera del tallo.

En cuanto a la endósfera de la raíz, las clases Actinobacteria y Alphaproteobacteria fueron indicativas de este compartimento, mientras que nuevamente la clase Bacilli (especialmente el OTU No. 19), en conjunto con la clase Sphingobacteria fueron taxones indicadores de la endósfera del tallo en las tres especies CAM (Figura 14). Interesantemente, algunos OTUs compartidos identificados en la endósfera del tallo también fueron identificados en el filósfera y en la endósfera de raíz de las tres especies de plantas, sugiriendo su posible procedencia externa.

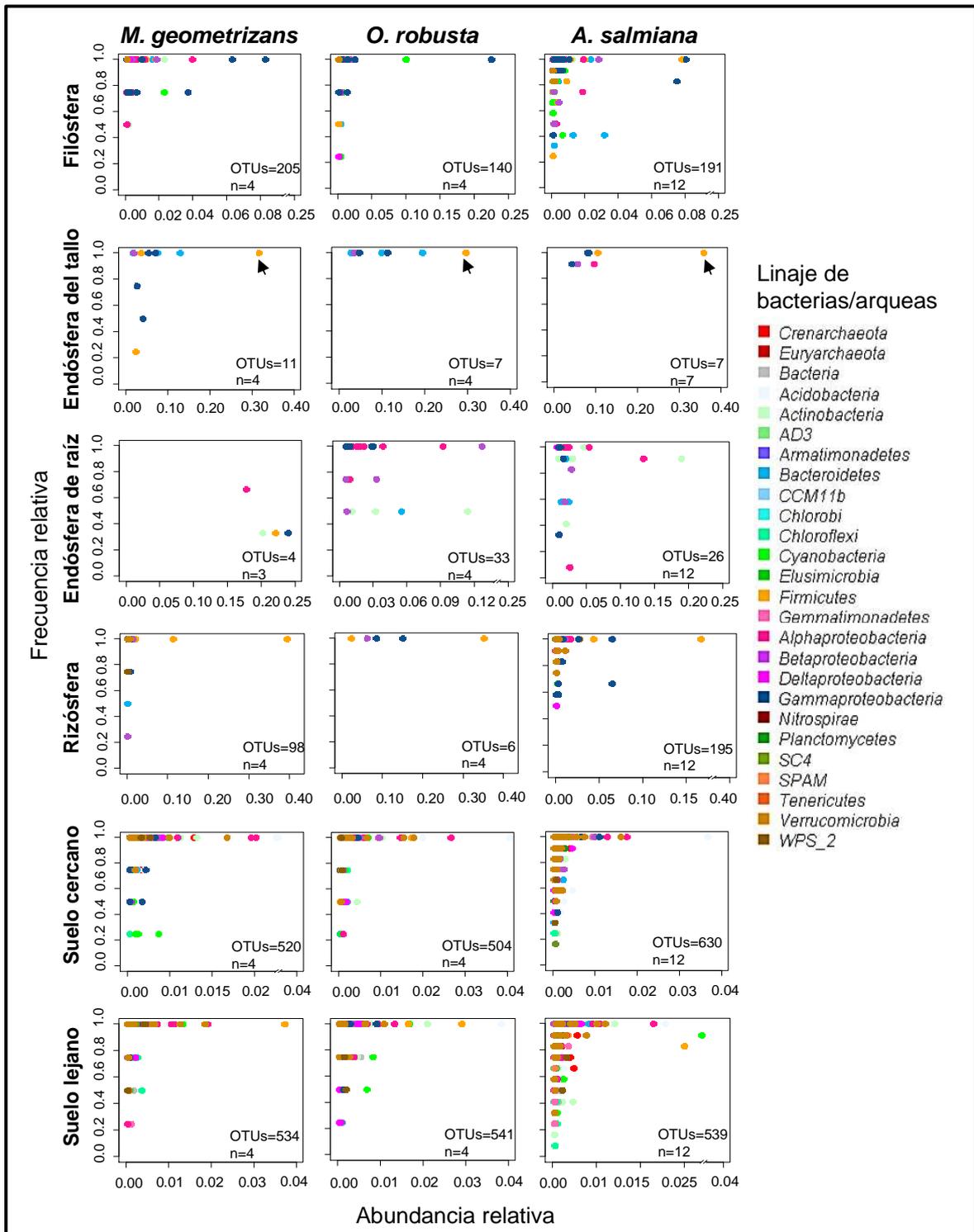


Figura 14. Análisis de Pareto del “Core” de bacterias/arqueas observado en las especies CAM en los seis compartimentos, donde el 20% o menos del total del número de OTUs representa el 80% de la abundancia relativa acumulada. La flecha negra indica el OTU 19 – *Bacillus*. El número de OTUs y el número de muestras (n) se indican en la esquina inferior derecha de cada gráfico.

Conjuntamente, el análisis de Pareto mostró que la rizósfera de *O. robusta* estuvo dominada por sólo seis OTUs compartidos con las especies CAM y la endósfera de la raíz de *M. geometrizans* por sólo cuatro, mientras que los respectivos compartimentos en las otras especies CAM albergaban un número notablemente mayor de miembros compartidos. Estos resultados sugieren que las comunidades de bacterias/arqueas epífitas y endófitas siguieron patrones de ensamblaje similares en las tres especies CAM, y que la selección por el hábitat es el factor más significativo dentro de cada compartimiento, aunque las comunidades están ligeramente influenciadas por cada especie huésped.

7.4.3 “Core” de hongos entre las simpátricas especies CAM

El análisis de distribución de los taxones de hongos en los compartimentos de las plantas CAM mostraron, en menor porcentaje que en las comunidades de bacterias/arqueas, que las tres especies compartieron el 38% del número de OTUs en los suelos y rizósfera, y el 46% en filósfera, mientras que en la endósfera de raíz compartieron el 18% de los OTUs y 2% en la endósfera del tallo (Figura 15a). Sin embargo, a diferencia de las comunidades de bacterias/arqueas, la contribución de estos taxones compartidos en la composición total de cada compartimento variaba dependiendo de la comunidad analizada, siendo más alto en la filósfera con 98% de la abundancia relativa, seguido de los suelos, rizósfera y endósfera de raíz con un porcentaje que va del 68% al 90% dependiendo del compartimento y la especie huésped, y la más baja, en la endósfera del tallo que también va del 20% al 52% de la abundancia relativa dependiendo también de la especie huésped (Figura 15b). Interesantemente, en el compartimento de la endósfera del tallo los OTUs específicos a cada especie representaron del 40% al 70% de la abundancia relativa de cada especie CAM (Figura 15b), lo que sugiere una especificidad por el huésped de ciertos taxones en las comunidades endófitas del tallo en comparación con los otros compartimentos asociados a las plantas.

Sin embargo, a pesar del variado porcentaje que representan de abundancia relativa los OTUs compartidos en las tres especies CAM, algunos grupos taxonómicos presentaron diferencias significativas entre las tres especies en cada

compartimento (Figura 16). En la filósfera los órdenes Pleosporales y Chaetothyriales mostraron diferencias significativas entre las tres especies CAM, en la endósfera del tallo los órdenes Pleosporales y Capnodiales, en la rizósfera y en la endósfera de raíz el orden Chaetothyriales, sugiriendo un efecto de la planta huésped sobre estos tres órdenes fúngicos (Tabla 9).

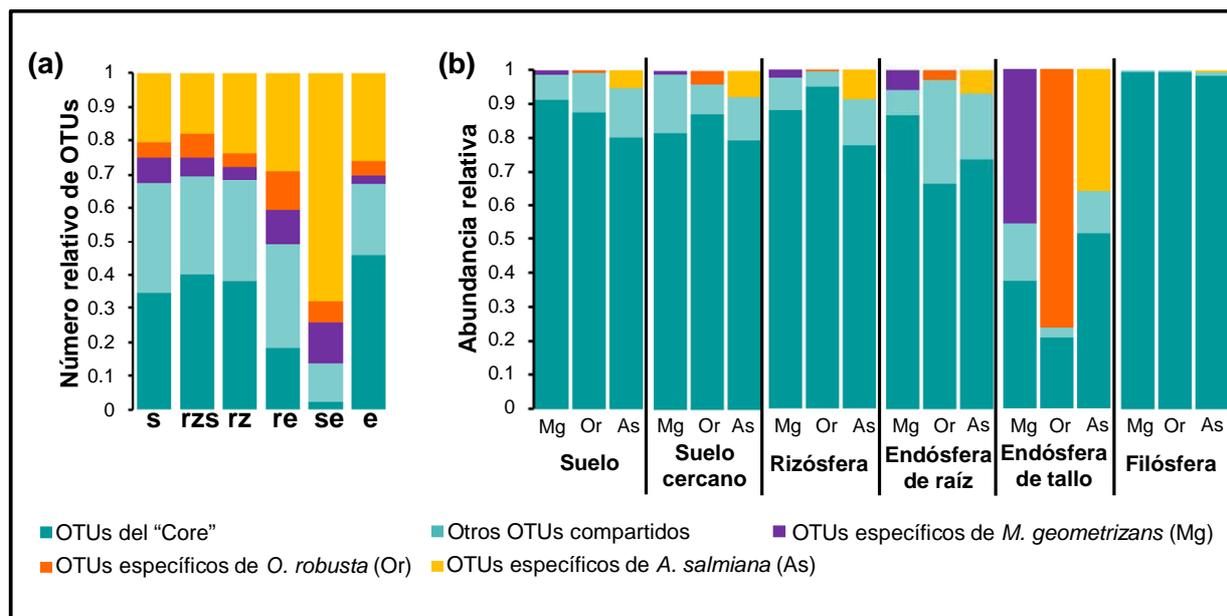


Figura 15. Número (a) y abundancia relativa (b) de los OTUs de hongos específicos y del "Core" entre las tres especies CAM en cada compartimento analizado.

Por otro lado, los análisis de Pareto demostraron que los miembros de los órdenes Hypocreales y Sordariales (principalmente OTU No. 8), así como OTUs que sólo se identificaron a nivel del filum Ascomycota, fueron taxones indicadores de la rizósfera; miembros de los órdenes Capnodiales, Dothideales, Chaetothyriales y Pleosporales dominaron la filósfera de las especies CAM analizadas (Figura 17). Cabe destacar que estos taxones de hongos fueron identificados en todas las plantas CAM muestreadas, aunque en *O. robusta* y *A. salmiana* tuvieron un número reducido de OTUs en comparación con *M. geometrizans*. Los órdenes Pleosporales, Hypocreales y Sordariales fueron taxones indicadores de la endósfera de la raíz en las dos especies de Cactus,

mientras que el orden Chaetothyriales lo fue de la endósfera de raíz en *Agave* (Figura 17).

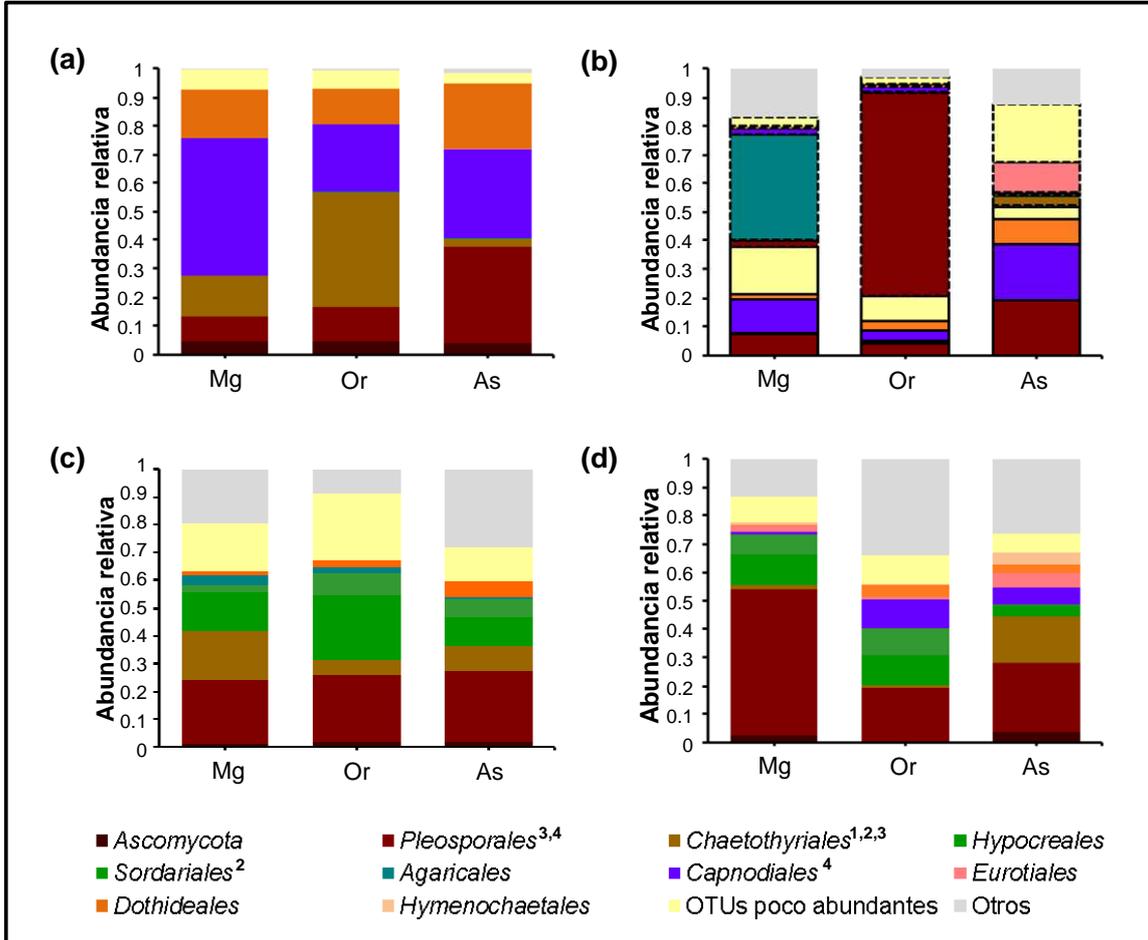


Figura 16. Abundancia relativa de la distribución taxonómica del “Core” de hongos de las tres especies CAM en (a) la filósfera, (b) endósfera del tallo, (c) rizósfera y (d) endósfera de raíz. Los taxones marcados con línea discontinua en la endósfera del tallo representan los OTUs especie-específicos. Los órdenes marcadas representan diferencias estadísticamente significativas entre las tres especies huésped después de la prueba de Kruskal-Wallis, con $P \leq 0.05$ en los siguientes compartimentos: ¹rizósfera, ²endósfera de raíz, ³filósfera y ⁴endósfera del tallo.

Por otro lado, el orden Capnodiales fue común en la endósfera de tallo de las tres especies CAM, a pesar del hecho de que este compartimento presentó la más alta especificidad de la especie huésped.

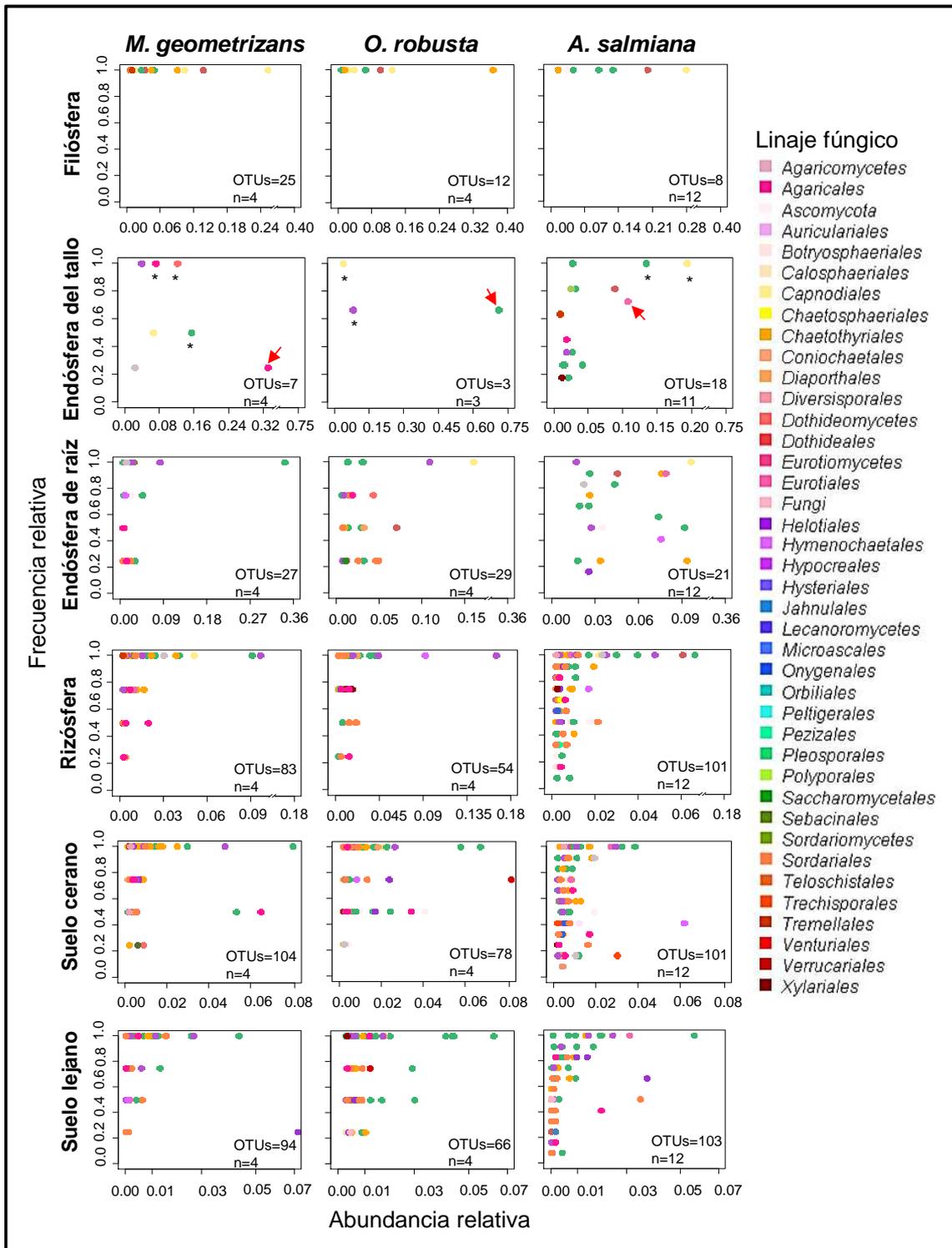


Figura 17. Análisis de Pareto del “Core” de hongos observado en las especies CAM en los seis compartimentos, donde el 20% o menos del total del número de OTUs representa el 80% de la abundancia relativa acumulada. Los asteriscos indican los OTUs compartidos en la endósfera del tallo, y las flechas rojas, los OTUs especie-específicos. El número de OTUs y el número de muestras (n) se indican en la esquina inferior derecha de cada gráfico.

Considerando los taxones compartidos y específicos (Tabla 10), el análisis de Pareto de la comunidad de hongos de la endósfera de tallo reveló que los Agaricales (principalmente el género *Henningsomyces*, con el OTU No. 339) estuvieron asociados con *M. geometrizzans*, Pleosporales (principalmente el género *Prathoda*, con el OTU No. 103) se encuentra principalmente en *O. robusta*, mientras que Eurotiales (principalmente el género fue encontrado *Sagenoma*, con el OTU No. 12) en conjunto con OTUs pertenecientes a *Cladosporium*, *Alternaria* y *Aureobasidium* fueron abundantes en *A. salmiana* (Figura 17). En términos generales, estos resultados sugieren que las comunidades de hongos fueron más propensas a establecer interacciones específicas con sus plantas huésped en la endósfera del tallo que en los otros compartimentos.

Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis de las diferentes clases de bacterias/arqueas y órdenes de hongos de los OTUs del “Core” de las tres especies CAM en los cuatro compartimentos de las plantas en el 2012. Únicamente se presentan las clases y órdenes con diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

Clases de bacterias/arqueas					
Compartimento	Clases	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	P
Endósfera del tallo	<i>Sphingobacteria</i>	3	20	14.099	0.0008
Endósfera de raíz	<i>Sphingobacteria</i>	3	19	6.052	0.0484
Rizósfera	<i>Flavobacteria</i>	3	20	10.100	0.0002
	<i>Gammaproteobacteria</i>			10.509	0.0052
	<i>Sphingobacteria</i>			7.295	0.0260
Órdenes de hongos					
Compartimento	Clases	Grados de libertad	Número de muestras	χ^2	P
Filósfera	<i>Pleosporales</i>	3	20	9.142	0.0103
	<i>Chaetothyriales</i>			10.728	0.0046
Endósfera del tallo	<i>Capnodiales</i>	3	18	10.045	0.0065
	<i>Pleosporales</i>			7.641	0.0219
Rizósfera	<i>Chaetothyriales</i>	3	20	6.938	0.0311
Endósfera de raíz	<i>Chaetothyriales</i>	3	20	7.381	0.0249
	<i>Sordariales</i>			7.401	0.0247

Tabla 10. OTUs del “Core” de las tres especies CAM de la endósfera del tallo observados en el análisis de Pareto. Los OTUs sombreados en gris son taxones especie-específicos.

OTU	Linaje	Abundancia relativa (%)	Frecuencia relativa (%)
	Reino Filum Clas Orden Familia Género Especie		
Comunidades de bacterias/arqueas			
<i>M. geometrizzans</i>			
19 ^{abc}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales Bacillaceae Bacillus	31.64	100
237 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	12.85	100
174 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	7.47	100
4 ^{abc}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Leclercia	6.96	100
20 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Moraxellaceae Acinetobacter	5.35	100
10 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Moraxellaceae Acinetobacter	4.06	50
99 ^{abc}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales Staphylococcaceae Staphylococcus	3.55	100
371 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Escherichia	2.53	75
73 ^{ab}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales BacillalesOR BacillalesOR	2.34	25
24 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Burkholderiaceae Burkholderia	1.9	100
372 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	1.57	100
<i>O. robusta</i>			
19 ^{abc}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales Bacillaceae Bacillus	29.6	100
237 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	19.5	100
12 ^{abc}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Xanthomonadales Xanthomonadaceae Stenotrophomonas	11.26	100
174 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	9.9	100
371 ^{abd}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Escherichia	4.75	100
24 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Burkholderiaceae Burkholderia	3.59	100
372 ^{ab}	Bacteria Bacteroidetes Sphingobacteria Sphingobacteriales SphingobacterialesOR SphingobacterialesOR	2.67	100
<i>A. salmiana</i>			
19 ^{abc}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales Bacillaceae Bacillus	35.77	100

99 ^{abc}	Bacteria Firmicutes Bacilli Bacillales Staphylococcaceae Staphylococcus	10.43	100
367 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Alphaproteobacteria Sphingomonadales Sphingomonadaceae Sphingomonas	9.45	90.91
4 ^{abc}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Enterobacteriales Enterobacteriaceae Leclercia	8.4	100
20 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Moraxellaceae Acinetobacter	7.95	100
25 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Betaproteobacteria Burkholderiales Oxalobacteraceae Massilia	5.6	90.91
64 ^{ab}	Bacteria Proteobacteria Gammaproteobacteria Pseudomonadales Pseudomonadaceae Pseudomonas	4.23	90.91
Hongos			
<i>M. geometrizans</i>			
339 ^b	Fungi Basidiomycota Agaricomycetes Agaricales Marasmiaceae Henningsomyces	32.94	25
5 ^{abc}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Alternaria	15.4	50
1575 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes	12.04	100
1316 ^{ab}	Fungi Basidiomycota Agaricomycetes Agaricales	7.09	100
2 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Capnodiales Davidiellaceae Cladosporium	6.56	50
320 ^{ab}	Fungi Ascomycota Sordariomycetes Hypocreales Cordycipitaceae Beauveria	3.8	100
50 ^{ab}	Fungi Basidiomycota Agaricomycetes	2.28	25
<i>O. robusta</i>			
103 ^a	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Prathoda	70.77	66.67
320 ^{ab}	Fungi Ascomycota Sordariomycetes Hypocreales Cordycipitaceae Beauveria	8.03	66.67
2 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Capnodiales Davidiellaceae Cladosporium	3.65	100
<i>A. salmiana</i>			
2 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Capnodiales Davidiellaceae Cladosporium	19.26	100
5 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Alternaria	13.33	100
12 ^{ab}	Fungi Ascomycota Eurotiomycetes Eurotiales Trichocomaceae Sagenoma	10.68	72.73
3 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Dothideales Dothioraceae Aureobasidium	8.82	81.82
134 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales	4.05	27.27
1 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Leptosphaeriaceae Peyronellaea	3.11	81.82
99 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Epicoccum	2.7	100

13 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Prathoda	2.55	36.36
912 ^{ab}	Fungi Ascomycota Saccharomycetes Saccharomycetales Saccharomycetaceae Kurtzmaniella	2.44	81.82
203 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Pleosporaceae Alternaria	2.08	18.18
139 ^b	Fungi Ascomycota	1.9	27.27
320 ^{ab}	Fungi Ascomycota Sordariomycetes Hypocreales Cordycipitaceae Beauveria	1.83	36.36
380 ^{ab}	Fungi Basidiomycota Agaricomycetes Agaricales Marasmiaceae Tetrapyrgos	1.82	45.45
207 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales	1.5	27.27
77 ^{ab}	Fungi Ascomycota Dothideomycetes Pleosporales Massarinaceae Massarina	1.27	27.27
258 ^{ab}	Fungi Ascomycota Sordariomycetes Xylariales Xylariaceae Halorosellinia	1.2	18.18
7 ^{ab}	Fungi Ascomycota Eurotiomycetes Chaetothyriales Chaetothyriaceae Cyphellophora	0.91	63.64
647 ^{ab}	Fungi Basidiomycota Tremellomycetes Tremellales Tremellaceae CryptococcusTremellales	0.83	63.64

^aOTUs presente en la filósfera en las tres especies CAM.

^bOTUs presente en la endósfera de raíz en las tres especies CAM.

^cOTUs con 98% de homología con respecto a las cepas aisladas de las tres especies CAM y que están en proceso de secuenciación.

7.4.4 Discusión

Nuestro análisis de la distribución taxonómica de las comunidades de bacterias/arqueas y hongos entre *M. geometrizans*, *O. robusta* y *A. salmiana* mostró que estas especies de plantas CAM simpátricas compartieron un número considerable de OTUs de bacterias/arqueas y hongos en la rizósfera y filósfera, lo que representa en cada caso alrededor del 90% de la composición microbiana de estas comunidades. Estos resultados sugieren que el hábitat (zonas áridas) y el microhábitat (compartimento) ejercen una fuerza superior que la especie huésped en la conformación de estas comunidades microbianas. Sin embargo, los análisis de Pareto revelaron que las comunidades microbianas fueron influenciadas de forma secundaria por la planta huésped, donde los principales miembros microbianos se diferenciaron en su identidad, abundancia y prevalencia entre las especies CAM. Teniendo en cuenta que las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae divergieron aproximadamente hace 16 y 18 millones de años, respectivamente, mientras que el género *Agave* hace menos de 10 millones de años (Hernández-Hernández et al., 2014; Reina-Bueno et al., 2012), es de llamar la atención que las comunidades epífitas son todavía muy similares entre estas tres especies. En plantas modelo y en cultivos agrícolas, la especificidad a la planta huésped en la rizósfera se ha atribuido principalmente a los exudados radicales y compuestos volátiles producidos por la planta huésped (Starkey, 1938), a pesar que la mayoría de las variedades son muy cercanas en términos evolutivos (Bulgarelli et al., 2015; Haichar et al., 2008; Hardoim et al., 2011; Hunter et al., 2010; Müller et al., 2015; Sapkota et al., 2015; Schlaeppi et al., 2014; Weinert et al., 2010; Wieland et al., 2001; Yang et al., 2001), por lo que sería interesante cuantificar y comparar los diferentes exudados radicales y compuestos volátiles de nuestras tres especies CAM. Estos resultados refuerzan la idea de que las condiciones ambientales adversas en las que los Cactus y los Agaves habitan promueven similares asociaciones planta-microorganismo, que pueden contribuir a su adaptación y supervivencia (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarenes et al., 2014; Lebeis, 2014).

Contrario a las comunidades microbianas epífitas, el ensamblaje en las comunidades microbianas de la endósfera mostró indicios de especificidad al huésped. Estos rasgos fueron más evidentes en las comunidades fúngicas de la endósfera del tallo. Hasta ahora, los estudios realizados en las plantas xerófitas no han mostrado especificidad por parte de las comunidades de hongos por las plantas huésped en la endósfera del tallo (Massimo et al., 2015; Suryanarayanan et al., 2005), únicamente se ha observado en los hongos endófitos asociados a las raíces de dos especies de gramíneas forrajeras en comparación con la Agavaceae *Yucca glauca* (Khidir et al., 2010). El Core de los endófitos microbianos en la raíz y el Core de las comunidades bacterias/arqueas observados en las tres especies CAM, pueden representar microorganismos con características benéficas para estas especies de plantas en su entorno de aridez, como se ha observado en cepas bacterianas que presentan homología del 97% con OTUs de dichos “Core” con potencial diazotrófico *in vitro* (Desgarennnes et al., 2014) y con cepas bacterianas aisladas de las dos especies de Cactus que se describen en el capítulo VI.

Sin embargo, la comunidad fúngica de la endósfera del tallo reveló la presencia de microorganismos específicos a la planta huésped con alta abundancia relativa sugiriendo una posible especificidad funcional, que podría estar relacionada con las características fisiológicas específicas de cada planta huésped. No obstante, no se cuentan con reportes en la literatura acerca de los géneros a los que pertenecen los OTUs específicos encontrados en las tres especies CAM, que nos pudiesen indicar su posible mecanismos de interacción con la planta, únicamente el género *Henningsomyces* encontrado en *M. geometrizzans* ha sido reportado como degradador ligninolítico (Freitag and Morrell, 1992).

Capítulo V. Endófitos bacterianos sujetos a perturbaciones temporales

7.5.1 Introducción

Estudios recientes han mostrado que, en general, las comunidades microbianas no son resistentes a las perturbaciones ambientales, que incluso, dentro de varios años muchas comunidades no se recuperan totalmente (Shade et al., 2012). Las perturbaciones son eventos causales que, o bien (1) alteran el entorno y tienen posibles repercusiones para una comunidad o (2) modifican directamente una comunidad, donde miembros de la misma pueden morir o cambiar en sus abundancias relativas (Rykiel, 1985). Las perturbaciones se producen a diferentes escalas espaciales y temporales con diferentes frecuencias, intensidades, medidas y periodicidades (regularidad de ocurrencia (Shade et al., 2012)).

Si bien, en nuestro sistema de estudio la estacionalidad no ejerció una influencia significativa sobre las comunidades microbianas, y en cambio, determinamos que el compartimento fue el principal factor influenciado de forma secundaria por la planta huésped; nos preguntamos si se mantendrían los principales grupos taxonómicos observados en el año 2012 en el siguiente año, después de volver a experimentar un periodo más de estrés hídrico. Para abordar esta pregunta, nos enfocamos en la comunidad de bacterias y arqueas de las comunidades endófitas de raíz y tallo, partiendo del supuesto de que las comunidades endófitas puedan encontrarse en un ambiente de protección en los tejidos de las plantas huésped que las mantendría estables ante una nueva perturbación.

7.5.2 Dinámica de las comunidades de bacterias/arqueas endófitas

Para evaluar lo antes mencionado, se utilizó la técnica de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) de la huella genética del gen ARNr 16S (V6-V8) de las muestras de endósfera de raíz y tallo del 2012 y 2013. Si bien, la técnica de DGGE no tiene la misma resolución que la secuenciación de alto rendimiento por la plataforma Illumina (iTags), permite analizar los patrones generales de comportamiento de los principales grupos taxonómicos de la

comunidad de bacterias/arqueas endófitas, y además, es económicamente más accesible.

Se colectaron y procesaron un total de 96 muestras de endósfera de *M. geometrizzans* y *O. robusta* durante los dos años, de los cuales 48 correspondieron a la endósfera del tallo y 48 a la de raíz. La huella genética del gen ARNr 16S dio como resultado 1,066 bandas en total, las cuales, después de un minucioso análisis de imagen, se agruparon en 69 OTUs observados a lo largo del 2012 y 2013.

Con la finalidad de obtener un panorama global de la comunidad de bacterias/arqueas endófitas asociada con las dos especies de Cactus a través del tiempo, como primer paso comparamos los grupos taxonómicos observados en los datos obtenidos con la técnica de DGGE del gen ARNr 16S (V6-V8) correspondientes para el año 2012 con los datos generados con secuenciación iTags también del gen ARNr 16S (V4). La secuenciación de todos los OTUs asignados mostró que, se lograron identificar 5 filas bacterianas subdivididos en 9 clases, siendo las Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Actinobacteria las clases más abundantes con alrededor del 90% de la abundancia de cada año analizado (Figura 18). Estos resultados concuerdan con lo observado en los datos generados con la secuenciación iTags, donde también las clases Gamaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Actinobacteria representaron del 40% al 70% de la abundancia de la endósfera de las dos especies de Cactus. Sin embargo, al contrario de los datos de secuenciación masiva, la clase Bacilli fue muy poco detectada en DGGE, y en cambio, principalmente en *M. geometrizzans*, se detectó mayor número de secuencias de la clase Clostridia. Así mismo, la clase Sphingobacteria y secuencias del dominio Arquea no se lograron detectar en los datos obtenidos con el DGGE, representando la clase bacteriana en los datos de secuenciación más del 20% de la abundancia de la endósfera del tallo en las dos especies de Cactus. Esto último, es posiblemente el resultado de no haber empleado la misma región hipervariable del gen ARNr 16S en ambas técnicas moleculares, sesgando la amplificación a solo ciertos grupos taxonómicos en cada caso.

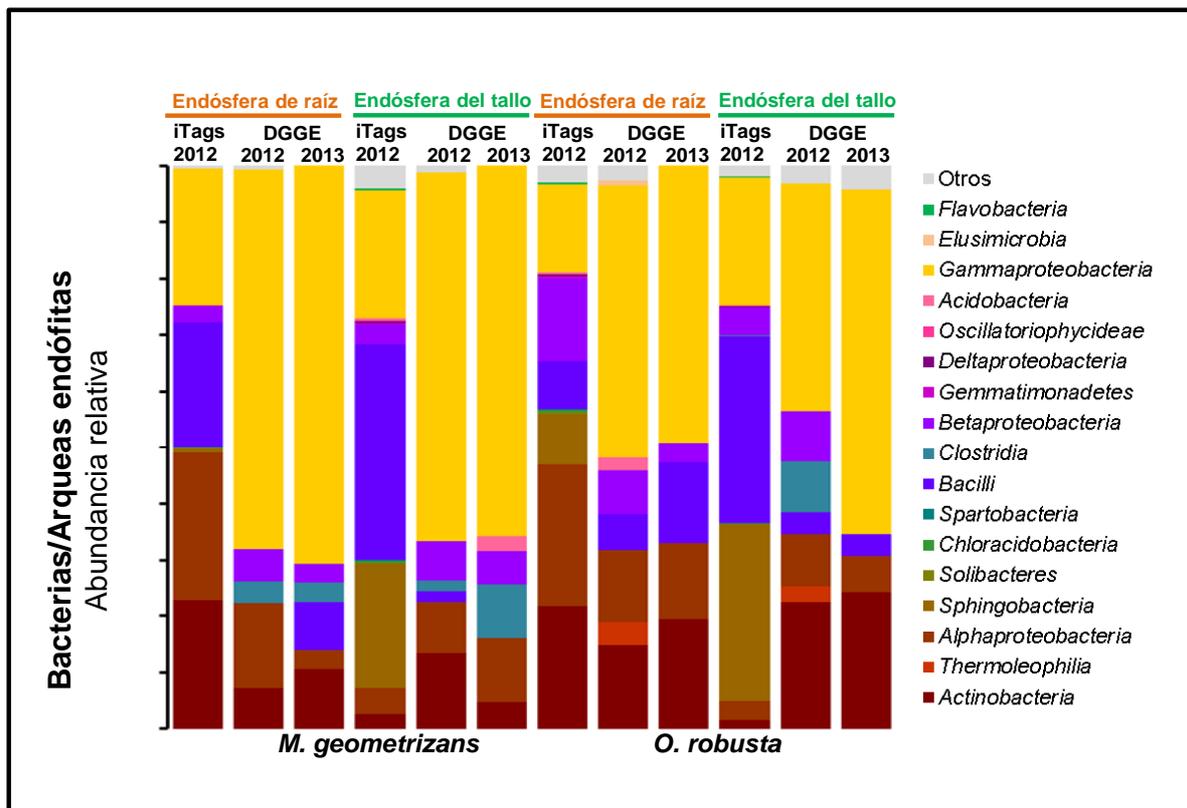


Figura 18. Comparación de la distribución taxonómica a nivel de clase de las comunidades endófitas de bacterias/arqueas asociadas con *M. geometrizans* y *O. robusta* en los años 2012 y 2013 por DGGE vs. secuenciación etiquetada (iTags) del 2012.

No obstante, pese a la menor resolución presentada por la técnica de DGGE y el efecto de la parcialidad de los oligonucleótidos sobre los taxones amplificados, observamos que el 75% de los taxones más abundantes observados en los datos de secuenciación para la endósfera del tallo y raíz en el 2012 se comparten en ambos análisis. Como segundo paso, se analizó la distribución de los OTUs identificados en los factores compartimento y especie de Cactus a lo largo de los dos años de muestreo. Las comparaciones de cada factor mostraron que a lo largo del 2012 y 2013, las comunidades de bacterias/arqueas endófitas en *M. geometrizans* compartieron el 26% y 33% de los OTUs identificados en la raíz y tallo, respectivamente, mientras que en *O. robusta* se compartió el 49% y 18% (Figura 19a). En términos de abundancia relativa, los OTUs compartidos representaron para *M. geometrizans* alrededor del 50% de la endósfera de tallo y raíz en los dos años, y en contraste, en *O. robusta* dependiendo del

compartimento y año representaron del 29% al 76% de la abundancia relativa (Figura 19b). Por otro lado, interesantemente, los grupos taxonómicos correspondientes a los OTUs observados únicamente en el 2012 o en el 2013 pertenecen, en la mayoría de los casos, a los mismos taxones observados en los dos años (Figura 20a-c), esto principalmente observado en la endósfera del tallo de *M. geometrizzans* y en la endósfera de raíz de las dos especies de Cactus. Estos resultados nos dan indicio de que en la endósfera de ambas especies de Cactus existe una continua selección por ciertos grupos taxonómicos en las comunidades de bacterias en *M. geometrizzans* y *O. robusta* a lo largo del tiempo. Respecto a la endósfera del tallo de *O. robusta*, se observó una ausencia de las clases Betaproteobacteria y Clostridia en el 2013 en comparación con el 2012.

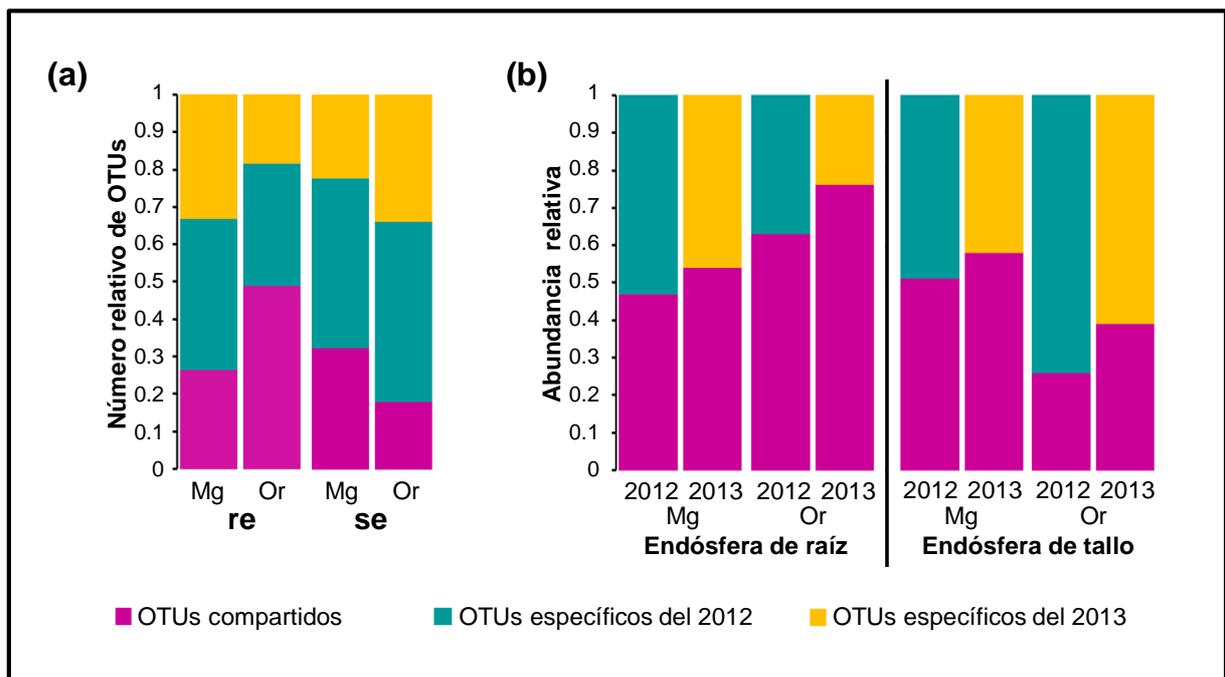


Figura 19. Número (a) y abundancia relativa (b) de los OTUs de bacterias/arqueas endófitas específicos y compartidos entre los años 2012 y 2013 en la endósfera de la raíz y el tallo.

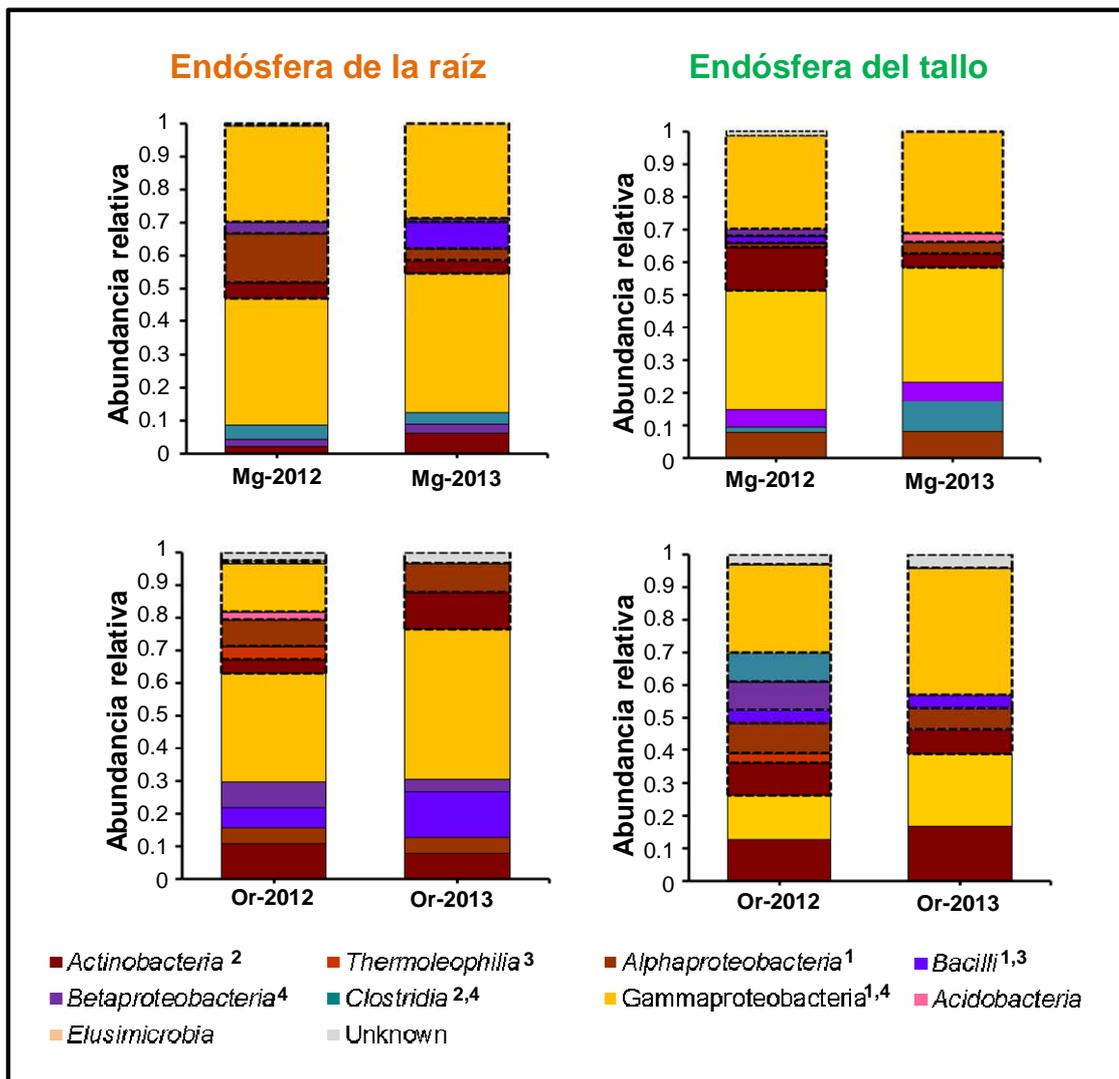


Figura 20. Abundancia relativa de la distribución taxonómica de los taxones endófitos compartidos entre los dos años (marcados con línea continua) y específicos a cada año (marcados con línea discontinua) en (a-b) *M. geometrizans* y (c-d) *O. robusta* en la (a,c) endósfera de raíz y en la (b,d) endósfera del tallo. Las clases marcadas representan diferencias estadísticamente significativas entre los dos años después de la prueba de Kruskal-Wallis, con $P \leq 0.05$ en los siguientes compartimentos de las dos especies de Cactus: *M. geometrizans* en la ¹endósfera de raíz y en la ²endósfera del tallo, *O. robusta* en la ³endósfera de raíz y en la ⁴endósfera del tallo.

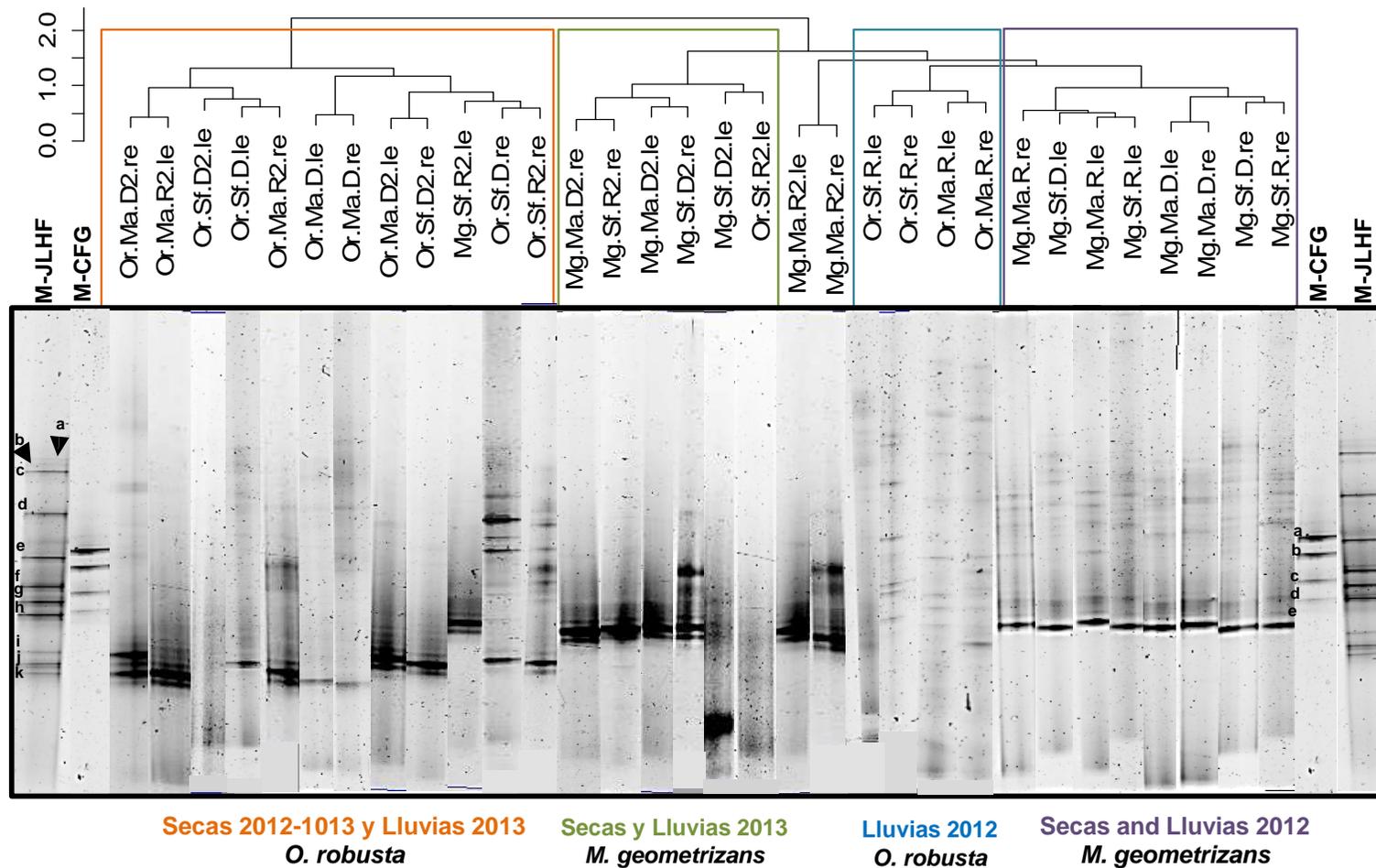


Figura 21. Agrupamiento de los perfiles de DGGE de las comunidades de bacterias/arqueas endófitas asociadas a *M. geometrizans* y *O. robusta* en los años 2012 y 2013. El dendrograma tipo “Ward” muestra el agrupamiento de las muestras promedio de las réplicas biológicas de cada condición evaluada, representado por los perfiles de DGGE de una de las tres réplicas biológicas. M-JLHF representa las cepas a:Cp, b:Ec, c:At, d:Pf, e:Pa, f:Na, g:Rl. h:Av, i:Ka, j:Nat, k:Ap. M-CFG representa las cepas a:E, b:Esp, c:Ps, d:Bsp, e:Bs.

Si bien, se observaron en su mayoría los mismos grupos taxonómicos bacterianos en los dos años evaluados, algunos de estos presentaron diferencias significativas entre años, lo que nos indica también de una dinámica comunidad de bacteriana (Figura 20a-c). Donde en *M. geometrizzans* las clases Alfaproteobacteria y Bacilli variaron significativamente en la endósfera de raíz y las clases Actinobacteria y Clostridia en la endósfera de tallo; las clases Bacilli y Thermoleophilia variaron significativamente en la endósfera de raíz, y las clases Betaproteobacteria, Gamaproteobacteria y Clostridia en la endósfera de tallo de *O. robusta*.

Con el objetivo de evaluar las diferencias encontradas en los dos años de muestreo, realizamos un Análisis de Varianza Multivariado basado en Permutaciones (PERMANOVA, siglas en inglés), basado en una matriz de distancia Bray-Curtis, el cual reveló que todos los factores evaluados (especie de Cactus, compartimento, estacionalidad, sitio y año de muestreo) y sus interacciones fueron significativas (Tabla 11). Sin embargo, los factores que explicaron mayor porcentaje de variación fueron la especie de Cactus seguido del año de muestreo con el 18% y el 11% de la varianza total, respectivamente. Este mismo resultado fue validado por un análisis de agrupamiento tipo "Ward" con distancia Bray-Curtis de los datos promedio de cada condición evaluada, observándose en el agrupamiento dos ramas principales: una con los datos de *O. robusta* de la estacionalidad de secas de los dos años y los datos de lluvias del 2013, y otra con todos los datos de *M. geometrizzans* y los restantes de *O. robusta* (Figura 21). Estos resultados muestran una clara separación entre los datos de *M. geometrizzans* y los datos de *O. robusta* subdivididos en los años 2012 y 2013, confirmando el efecto de los factores especie de Cactus y año de muestreo en la comunidad de bacterias, aunque a nivel de grupos taxonómicos, estas diferencias entre años no son tan marcadas.

Tabla 11. Análisis de PERMANOVA de las comunidades de bacterias/arqueas endófitas asociadas a las especies de Cactus considerando todos los factores del 2012 y 2013.

Factor ^a	F	R ²	P
Especie _{1, 64}	178.472	0.17932	0.001
Año de muestreo _{1, 64}	109.180	0.10970	0.001
Estacionalidad _{1, 64}	29.690	0.02983	0.001
Compartimento _{1, 64}	25.134	0.02525	0.001
Sitio _{1, 64}	21.973	0.02208	0.001
Compartimento: Especie _{1, 64}	19.338	0.01943	0.001
Compartimento: Estacionalidad _{1, 64}	10.378	0.01043	0.001
Especie: Estacionalidad _{1, 64}	32.032	0.03218	0.001
Compartimento: Sitio _{1, 64}	27.386	0.02752	0.001
Especie: Sitio _{1, 64}	23.796	0.02391	0.001
Estacionalidad: Sitio _{1, 64}	35.265	0.03543	0.001
Compartimento: Año de muestreo _{1, 64}	11.065	0.01112	0.001
Especie: Año de muestreo _{1, 64}	37.643	0.03782	0.001
Estacionalidad: Año de muestreo _{1, 64}	36.441	0.03661	0.001
Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	29.732	0.02987	0.001
Compartimento: Especie: Estacionalidad _{1, 64}	10.286	0.01033	0.001
Compartimento: Especie: Sitio _{1, 64}	18.619	0.01871	0.001
Compartimento: Estacionalidad: Sitio _{1, 64}	26.207	0.02633	0.001
Especie: Estacionalidad: Sitio _{1, 64}	18.949	0.01904	0.001
Compartimento: Especie: Año de muestreo _{1, 64}	25.931	0.02605	0.001
Compartimento: Estacionalidad: Año de muestreo _{1, 64}	8.399	0.00844	0.001
Especie: Estacionalidad: Año de muestreo _{1, 64}	32.759	0.03291	0.001
Compartimento: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	27.171	0.02730	0.001
Especie: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	17.002	0.01708	0.001
Estacionalidad: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	31.136	0.03128	0.001
Compartimento: Especie: Estacionalidad: Sitio _{1, 64}	13.006	0.01307	0.001
Compartimento: Especie: Estacionalidad: Año de muestra _{1, 64}	11.676	0.01173	0.001
Compartimento: Especie: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	22.192	0.02230	0.001
Compartimento: Estacionalidad: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	12.825	0.01289	0.001
Especie: Estacionalidad: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	15.501	0.01557	0.001
Compartimento: Especie: Estacionalidad: Sitio: Año de muestreo _{1, 64}	12.090	0.01215	0.001

a. Los números en el subíndice indican los grados de libertad y los residuales de la prueba de F.

7.5.3 Discusión

Recientemente se ha descrito que las comunidades microbianas no son resistentes a las perturbaciones, y que incluso dentro de varios años muchas comunidades no se recuperan totalmente, esto ha sido observado principalmente en comunidades microbianas de sistemas de suelos, marinos, de aguas residuales y en comunidades intestinales (Shade et al., 2012). Sin embargo, recientes estudios en sistemas modelo de plantas suculentas, incluyendo las especies de Cactus aquí estudiadas, y no suculentas han demostrado que los factores abióticos (perturbaciones ambientales) no han explicado la mayor parte de la variación en la composición microbiana asociada, sino los factores bióticos como el tipo de compartimiento de la planta huésped (Coleman-Derr et al., 2016; Desgarnes et al., 2014; Edwards et al., 2015; Jin et al., 2014; Khidir et al., 2010; Lundberg et al., 2012; Massimo et al., 2015; Singh et al., 2009; Zarraindia et al., 2015). No obstante, nos cuestionamos si las constantes perturbaciones ambientales presentes en los sistemas áridos y semiáridos, como los periodos prolongados de sequía, mantendrían estables las comunidades microbianas asociadas a las dos especies de Cactus por un tiempo más prolongado, teniendo el entendido de que las comunidades bacterianas tienen un grado de plasticidad fisiológica que no presentan las comunidades eucariontes (Shade et al., 2012).

Por tal motivo, en nuestro estudio partimos de la suposición de que las comunidades bacterias asociadas a las dos especies de Cactus, principalmente las endófitas, pueden encontrarse en un ambiente de protección en los tejidos de las plantas huésped que las mantienen inalterables al efecto de las perturbaciones ambientales. Nuestros resultados mostraron que todos los factores evaluados tuvieron efecto significativo sobre la composición de la comunidad endófitas asociada a las dos especies de Cactus, pero los factores que explicaron mayor porcentaje de variación fueron la especie huésped y el año de muestreo. Sin embargo, los parámetros ambientales como fluctuaciones en la temperatura y precipitación anual no mostraron diferencias significativas entre los dos años, además de que la estacionalidad representó menos del 3% de la variación, lo que

sugiere que las perturbaciones ambientales no ejercieron un papel determinante en la variación de las comunidades bacterias endófitas.

¿Pero entonces a qué se debe el efecto del año de muestreo observado en el análisis estadístico, si las perturbaciones ambientales no tuvieron tanta influencia? Si analizamos a nivel de grupos taxonómicos, observamos que las comunidades endófitas bacterianas asociadas a las raíces se mantuvieron en su mayoría sin cambios significativos a lo largo de los dos años de análisis, con excepción de la clase Bacilli, en ambas especies de Cactus. En contraste, los grupos taxonómicos asociados a los tallos mostraron mayores cambios significativos entre los dos años y las dos especies de Cactus. Principalmente en *M. geometrizzans* las clases Actinobacteria y Clostridia, y además de esta última, las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria en *O. robusta*. Este último resultado, puede estar relacionado con la mayor diversidad taxonómica observada en la filósfera en el año 2012 con respecto a la rizósfera, característica que hemos hipotetizado puede estar relacionada con la presencia de especies de cianobacterias por su capacidad de fijación de nitrógeno y formación de biopelículas. Esta particularidad podría favorecer un flujo diverso de taxones de la filósfera hacia el interior de los tejidos de los tallos. Mientras que la rizósfera dominada por la clase Bacilli posiblemente favorecería un flujo menos diverso de taxones hacia el interior de las raíces. Estos resultados confirman nuevamente que el microhábitat ejerce una importante influencia sobre las fluctuaciones de su comunidad de bacterias endófitas y que muy posiblemente está interactuando con las comunidades de la epísfera.

Capítulo VI. Patrones funcionales de las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta*

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en: **Fonseca-García, C.**, Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. 2016. The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 150 doi:10.3389/fmicb.2016.00150.

7.6.1 Bacterias de posible transferencia vertical y su capacidad de promoción de crecimiento

7.6.1.1 Introducción

Para las espermatofitas, las semillas representan una fase notable en su ciclo de vida: pueden persistir durante años en un estado latente y cuando se cumplen las condiciones adecuadas, se desarrollan en una nueva planta (Nelson, 2004). Diferentes reportes en la literatura han confirmado la presencia de microorganismos endófitos en los órganos reproductores de las plantas, como flores, frutos y semillas (Nelson, 2004; Truyens et al., 2015). Aunque la importancia de los microorganismos asociados a las plantas para el crecimiento y bienestar vegetal ha tenido mayor reconocimiento recientemente, el papel de los microorganismos asociados a las semillas, todavía se subestima. Sin embargo, estas asociaciones podrían contribuir a la germinación y establecimiento de plántulas, debido a que están presentes en etapas muy tempranas del crecimiento de las plantas. Hasta ahora, pocas investigaciones se han llevado a cabo para dilucidar el papel exacto y las posibles aplicaciones de los endófitos de semillas. Los estudios existentes se centran principalmente en el uso de los endófitos de semillas como agentes que promueven el crecimiento de las plantas (Nelson, 2004).

En Cactus, Puente *et al.*, (2009a) aislaron e identificaron bacterias endófitas de semillas de la especie *Pachycereus pringlei*, comúnmente conocido como cardón. Las bacterias aisladas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, mostraron la capacidad de promover el crecimiento de las plántulas sobre un sustrato rocoso, después de 12 meses de ser inoculadas en semillas libres de microorganismos. Adicionalmente, los mismos autores han considerado a los microorganismos asociados a Cactus como termotolerantes, halotolerantes y xerotolerantes debido a las condiciones en las que se encuentran estas plantas. Sin embargo, a pesar del gran potencial biotecnológico que estos microorganismos presentan, aún se tiene poco conocimiento de los mecanismos de interacción que presentan los microorganismos asociados a las semillas de los Cactus y que función pueden tener en la adecuación de las plantas. En esta

sección del presente capítulo, abordaremos la microbiota asociada a las semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta* colectadas en Mayo del 2012 y sus posibles mecanismos de interacción mediante métodos microbiológicos y bioquímicos tradicionales.

7.6.1.2 Aislamiento de microorganismos asociados a semilla de *M. geometrizans* y *O. robusta*

Con la intención de explorar la microbiota asociada a las semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*, se desinfectaron, germinaron y propagaron *in vitro* semillas de ambas especies colectadas en tiempo de fructificación del año 2012 en El Magueyal y San Felipe. Después de diferentes técnicas y condiciones microbiológicas tradicionales se aislaron 17 bacterias en el medio nutritivo Agar Soya Trypticase (TSA, siglas en inglés) (Apéndice VIII). De éstas, dos cepas se aislaron de tejido propagado a partir de semilla de *M. geometrizans* y 15 a partir de semillas de tejido de *O. robusta*. La identificación molecular mostro que las cepas pertenecen a los fila Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (Tabla 12), donde 10 cepas pertenecen al género *Paenibacillus*, tres cepas al género *Bacillus* y una cepa a los géneros *Staphylococcus*, *Leclercia*, *Agrococcus* y *Nocardiopsis*.

Interesantemente, algunas de las cepas aisladas fueron detectadas en los conjuntos de datos de secuenciación iTags y de DGGE generados con el marcador ARNr 16S tanto en *M. geometrizans* y en *O. robusta*, a pesar de que se aislaron solamente en una de las dos especies huésped. En los datos generados con el DGGE, se detectaron las cepas *Staphylococcus hominis* L12 y *Leclercia adecarboxylata* L16 en OTUs presentes en las dos especies de Cactus, las cuales representan del 3% al 6% en la endósfera de raíz y tallo de ambas especies. Respecto a los datos generados por secuenciación iTags, se detectaron siete cepas aisladas, pero en particular, la cepa de *Bacillus pumilus* L14, aislado de *O. robusta*, representa alrededor del 30% del total de la comunidad bacteriana asociada con *M. geometrizans* y *O. robusta*. Este resultado sugiere que la cepa de *Bacillus pumilus* L14, bacteria probable de transmisión vertical, pudiese desempeñar un papel significativo en la planta huésped adulta (Tabla12).

Tabla 12. Identificación de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizzans* y *O. robusta*.

Cepa	Aislada de	OTU iTags al 98%	Abundancia relativa en <i>M. geometrizzans</i>						Abundancia relativa en <i>O. robusta</i>					
			S	rzs	rz	p	re	se	S	rzs	rz	p	re	se
<i>Bacillus pumilus</i> L14	<i>O. robusta</i>	19	0.07	0.03	0.4	1.2	0.11	29.19	0.07	0.06	0.12	0.27	0.89	28.02
<i>Bacillus pumilus</i> L1	<i>O. robusta</i>													
<i>Bacillus pumilus</i> L3	<i>O. robusta</i>													
<i>Staphylococcus hominis</i> L12	<i>O. robusta</i>	99	-	-	-	0.25	0.07	3.28	0.01	-	-	0.11	0.57	2.09
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L4	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L5	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L6	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L7	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L8	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L9	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L2	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L10	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L11	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L13	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Agarococcus terreus</i> L15	<i>O. robusta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leclercia adecarboxylata</i> L16	<i>M. geometrizans</i>	4	0.02	0.16	0.81	6.22	0.17	6.42	0.02	0.08	14.9	2.42	0.71	0.5
<i>Nocardiopsis prasina</i> L17	<i>M. geometrizans</i>	680	-	-	-	0.01	-	-	-	-	-	0.01	-	0.1

7.6.1.3 Caracterización bioquímica de la capacidad de promoción de crecimiento y tolerancia a estrés hídrico de las bacterias asociadas a semilla

Después de haber aislado e identificado a nivel morfológico y molecular las 17 cepas bacterianas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*, nos interesamos en evaluar si dichas cepas tenían la capacidad de promover crecimiento y tolerar el estrés hídrico. Este interés surge, como se mencionó en la parte introductoria de esta sección, en que los microorganismos asociados a Cactus pueden presentar características de tolerancia a estrés hídrico a través de varios mecanismos tales como la producción de exopolisacáridos (EPS) y la formación de biopelículas. Además, los microorganismos también pueden ofrecer protección a las plantas contra la desecación mediante el mantenimiento de un ambiente húmedo y propicio para el desarrollo de las raíces, así como suministrar nutrientes y hormonas mediante mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

Los resultados de la caracterización bioquímica se resumen en el mapa de calor de la Figura 22. Como primer paso, se evaluó la tolerancia a estrés hídrico *in vitro* a través del crecimiento bacteriano en medio de cultivo con baja disponibilidad de agua, crecimiento a alta temperatura y la capacidad de producir exopolisacáridos. Los experimentos mostraron que el 80% de las cepas fueron capaces de crecer en medio con diferentes concentraciones de actividad de agua (A_w), mientras que el 45% fue capaz de crecer a 40 °C (Apéndice IX). Las cepas de *S. hominis* L12, *Bacillus pumilus* L14 y *Bacillus pumilus* L3 fueron capaces de producir exopolisacáridos (Apéndice IX).

Como segundo paso, se evaluó la capacidad de estimular el crecimiento a través de mecanismos directos como fijación de nitrógeno, producción de hormonas, solubilización de fosfato y producción de sideróforos mediante procedimientos cualitativos y cuantitativos. Los experimentos mostraron que el 47% de las cepas fueron capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Apéndice X), el 100% de las cepas produjeron ácido indol acético por encima de 1.0 mg/ml (sólo

Psychrobacillus psychrodurans L5 produjo más de 21 mg/ml), el 100% de las cepas fueron capaces de solubilizar fosfato, donde alrededor de 24% solubiliza por encima de 100 mg/ml (Apéndice XI) y sólo las cepas de *P. psychrodurans* L5 y *L.adecarboxylata* L16 fueron capaces de producir sideróforos en el medio CAS (Apéndice XII).

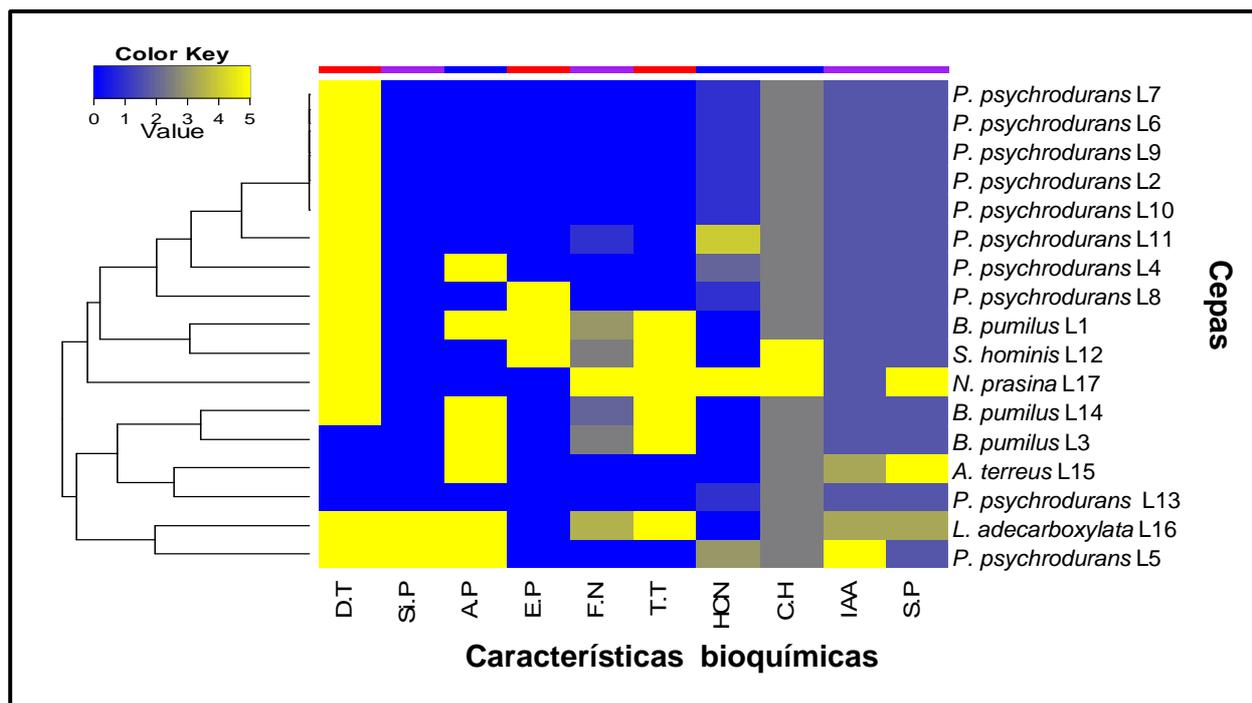


Figura 22. Mapa de calor de las características bioquímicas de las cepas aisladas de plántulas propagadas a partir de semilla. D-T: tolerancia estrés hídrico; Si-P: producción de sideróforos; A-P: producción de amoníaco; E-P: producción de exopolisacáridos; F-N: fijación de nitrógeno; T-T: tolerancia a 40 °C; HCN: producción de cianuro de hidrógeno; C-H: hidrólisis de celulosa; IAA: producción de ácido indol acético (1-30 µgIAA/ml); S-P: solubilización de fosfatos (1-300 µgPO₄/ml).

Como tercer paso, se evaluó la capacidad de estimular el crecimiento a través de mecanismos indirectos como producción de compuestos volátiles, tales como cianuro de hidrógeno (HCN) y amoníaco como agentes de antibiosis; así como la producción de enzimas líticas tales como celulasas. Los experimentos mostraron que alrededor del 40% de las cepas fueron capaces de producir amoníaco (Apéndice XIII), se detectó la producción de cianuro en alrededor del 60% de las cepas y el 100% de estas fueron capaces de hidrolizar carboximetilcelulosa como

fuelle de carbono (únicamente *S. hominis* L12 y *Nocardiopsis prasina* L17 produjeron halo de hidrólisis) (Apéndice XIV). Estos resultados mostraron que las 17 cepas bacterianas aisladas de semillas de *M. geometrízans* y *O. robusta* presentan al menos una característica de los tres grupos de mecanismos bioquímicos evaluados, lo que nos sugiere que estas cepas podrían complementarse funcionalmente.

7.6.2 Análisis metagenómico de las comunidades rizosféricas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta*

7.6.2.1 Introducción

La rizósfera de las plantas es un microhábitat donde reside una gran diversidad microbiana (Ahmad et al., 2008), como ya se mencionó en la parte introductoria de este documento. En este hábitat se llevan a cabo diversas interacciones abióticas y bióticas, como hemos descrito en los capítulos anteriores. Sin embargo, los microorganismos han evolucionado diversos mecanismos que pueden ser exitosos en la ocupación de espacios, y así, obtener nutrientes excretados por la raíz de la planta, por lo que se puede considerar a la rizósfera como un entorno, que en comparación con la mayor parte del suelo, está enriquecido por determinados taxones microbianos. Un gran número de reportes en la literatura han demostrado que los rizomicrobios son microorganismos beneficiosos que, además de tener la capacidad de colonizar las raíces, presentan capacidad de promover el crecimiento de las plantas a través de la acción directa o indirecta, siendo los hongos micorrízicos y los géneros bacterianos *Pseudomonas* y *Bacillus* los más ampliamente estudiados (Ahmad et al., 2008; Bonfante and Anca, 2009; Chaparro et al., 2014; Costa et al., 2007; Hilton et al., 2013; Kavamura et al., 2013a; Lambers et al., 2009; Lottmann et al., 2010; Saleem et al., 2007).

En nuestra investigación, las comunidades fúngicas asociadas a la rizósfera de *M. geometrizzans* y *O. robusta* presentaron taxones similares a las comunidades asociadas a los suelos y con bajos niveles de colonización de micorrizas, sin embargo, las comunidades bacterianas presentaron una clara selección por bacterias de la clase Bacilli. Aunado a esto, la mayoría de las bacterias aisladas de las semillas de nuestras dos especies de Cactus pertenecen a la misma clase bacteriana, las cuales, también mostraron capacidad de promover crecimiento y tolerar estrés hídrico a nivel *in vitro*. Considerando lo antes mencionado, nos preguntamos si las comunidades asociadas a la rizósfera de *M. geometrizzans* y *O. robusta* presentan patrones funcionales similares a los encontrados en la comunidad de bacterias aisladas de semillas. Partiendo también del supuesto que los microorganismos asociados a Cactus son considerados termotolerantes,

halotolerantes y xerotolerantes debido a las condiciones en las que se encuentran estas plantas (Puente et al., 2004a, 2004b). Para abordar esta pregunta, empleamos secuenciación de alta resolución de los metagenomas de las muestras mezcladas equimolarmente de rizósfera colectadas en el 2012 en la estacionalidad de secas, para evaluar el impacto de la perturbación temporal en la funcionalidad de las comunidades microbianas de rizósfera. Los resultados se plantean en la siguiente sección del presente capítulo.

7.6.2.2 Perfiles funcionales de los metagenomas de rizósfera

Con el objetivo de conocer los patrones funcionales de las comunidades de rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* cuando éstas están sometidas a una perturbación temporal, se secuenció las muestras de rizósfera colectadas en la temporalidad de secas de cada especie de Cactus en cada sitio de muestreo (ver materiales y métodos). Los análisis comparativos de los diferentes grupos funcionales de la base datos KEEG mostraron la presencia de genes involucrados en “tolerancia al calor, la desecación y bajo contenido de nutrientes” y “promoción de crecimiento por mecanismos directos e indirectos”, con diferente recuento de genes para cada caso. Estos resultados sugieren que estos rasgos pueden estar relacionados con aspectos beneficios para la planta y por lo tanto, dan indicio de que *M. geometrizans* y *O. robusta* seleccionan una comunidad microbiana específica en la rizósfera basado en rasgos funcionales beneficiosos para su propio desempeño.

Tolerancia al calor, la desecación y bajo contenido de nutrientes. La respuesta a la sequía, al estrés por calor y al estrés osmótico en los microorganismos implican mecanismos de adaptación muy complejos, pero un elemento común de ambas respuestas es la síntesis de moléculas protectoras llamados solutos compatibles. De hecho, el papel de los solutos compatibles va más allá de un ajuste osmótico para la protección de las células y componentes celulares de la congelación, desecación, de alta temperatura y radicales de oxígeno, así como fuentes de carbono, energía y nitrógeno. La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) se ha encontrado como el principal soluto

compatible en casi cualquier microorganismo hasta ahora. A la fecha, se conocen cinco diferentes vías de síntesis de trehalosa distribuidas en todos los reinos conocidos (Reina-Bueno et al., 2012). En primer lugar, la ruta OtsA-OtsB, que está muy bien conservada entre insectos, plantas, hongos y bacterias, implica la transferencia de glucosa a partir de UDP-glucosa a glucosa-fosfato para formar trehalosa-6-fosfato por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA). Entonces, una fosfatasa trehalosa-6-fosfato (OtsB) desfosforila este intermediario para producir trehalosa (Reina-Bueno et al., 2012). En segundo lugar, la trehalosa sintasa (TreS), se describió por primera vez en micobacterias y cataliza la conversión reversible de maltosa y trehalosa. Una tercera vía, convierte la unidad terminal de una maltodextrina lineal (por ejemplo, el glucógeno o almidón) a través de trehalosa maltooligosil trehalosa sintasa (TreY) y maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TreZ) (Reina-Bueno et al., 2012). Aparte de protector de estrés, la trehalosa también sirve como una fuente de carbono y energía para muchos microorganismos.

Hay varias vías conocidas para el catabolismo de trehalosa, la enzima principal involucrada en la degradación de trehalosa es la trehalasa (α,α -hidrolasa-1,1-glucosilo), por lo general pertenece a las familias 37 y 15 de glucósido hidrolasas. En otros casos, la degradación de trehalosa implica una trehalosa fosforilasa (TreP). La degradación de trehalosa-6-fosfato puede estar mediada por trehalosa 6-fosfato hidrolasa (TreC), perteneciente a la familia 13 de glicósido hidrolasas, o una fosforilasa trehalosa-6-fosfato (TrePP) (Reina-Bueno et al., 2012). En el análisis comparativo de los metagenomas de rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*, encontramos siete genes que codifican para enzimas involucradas en las vías de síntesis y degradación de trehalosa (Figura 23a): (1) Trehalose 6-fosfato sintasa (OtsA) [EC:2.4.1.15], (2) Trehalosa 6-fosfato fosfatasa (OtsB) [EC:3.1.3.12], (3) Trehalosa-6-fosfato hidrolasa (TreC) [EC:3.2.1.93], (4) Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (TreC) [EC:3.2.1.141], (5) α,α -Trehalosa fosforilasa (TreP) [EC:2.4.1.64], (6) Trehalosa sintasa (TreS) [EC:2.4.1.245] y (6) Trehalosa 6- fosfato sintasa/fofatasa (TrePS) [EC:2.4.1.15 3.1.3.12].

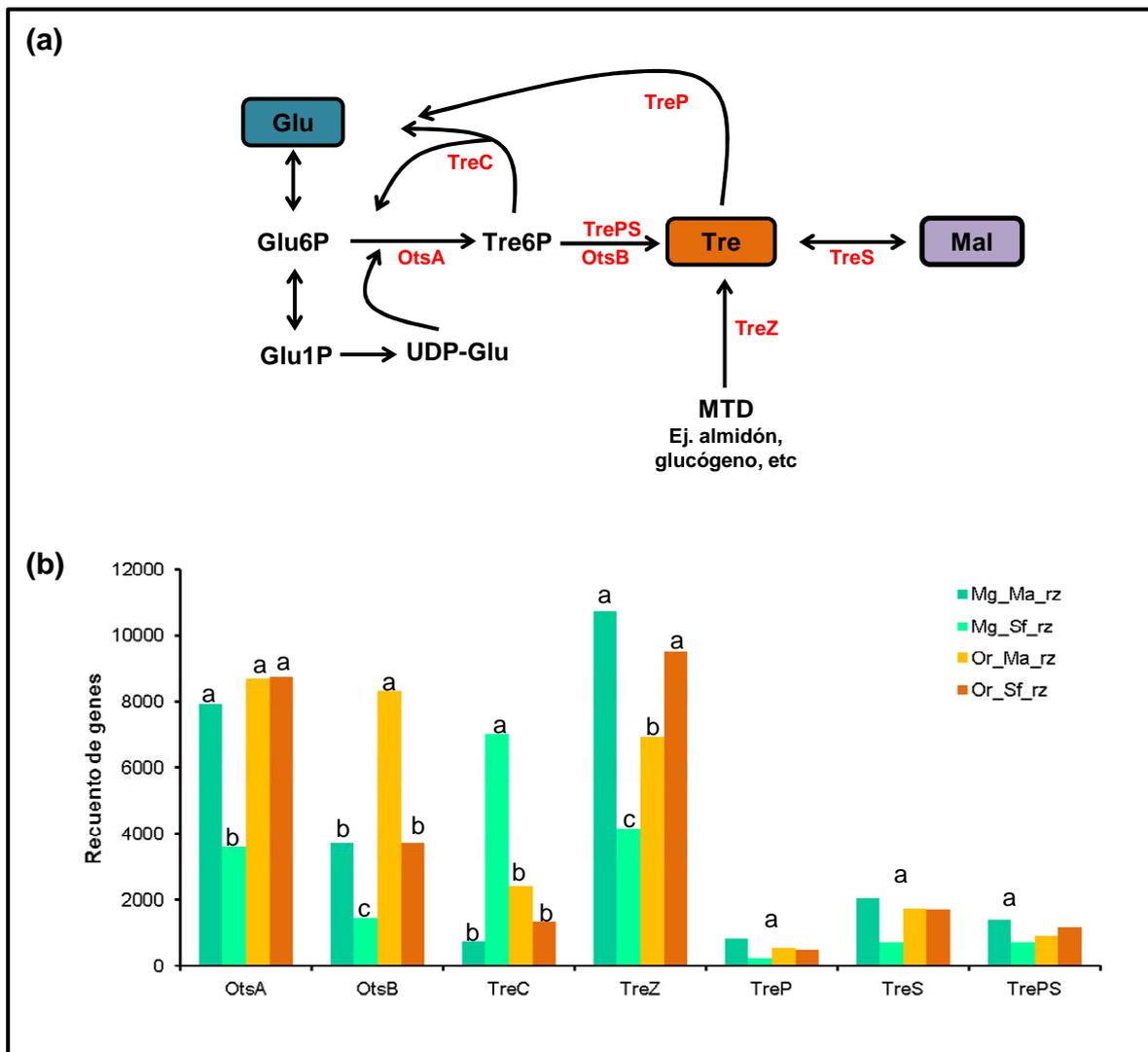


Figura 23. Metabolismo de trehalosa presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. (a) Representación esquemática de la síntesis y catálisis de trehalosa presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*. (b) Niveles de los recuentos de genes que codifican para las enzimas del metabolismo de trehalosa encontrados en el análisis metagenómico. Las letras ubicadas sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$. Abreviaciones usadas: Glu, D-glucosa; Glu6P, D-glucosa-6-fosfato; Glu1P, D-glucosa-1-fosfato; UDP-Glu, Uridina difosfato glucosa; Tre6P, Trehalosa-6-fosfato; Tre, Trehalosa; Mal, Maltosa; MDT, Maltodextrinas; OtsA, Trehalosa 6-fosfato sintasa; OtsB, Trehalosa 6-fosfato fosfatasa; TreC, Trehalosa 6-fosfato hidrolasa; TreZ, Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa; TreP, Trehalosa fosforilasa ; TreS, Trehalosa sintasa; TrePS Trehalosa 6- fosfato sintasa/fofatasa.

Se encontraron diferencias significativas de algunas enzimas entre los cuatro metagenomas analizados (Figura 23b), lo que nos sugiere que el mecanismo de trehalosa esta conservado entre los cuatro, pero con algunas preferencias por

ciertas vías de síntesis. Además, encontramos el gen que codifica para la proteína Serina/Treonina Protein Kinasa (PrkC) bacteriana [EC:2.7.11.1] con el mayor recuento de genes observado en el análisis, incluso superior a la ADN Helicasa II proteína esencial en los procesos de replicación de ADN (Figura 24). Esta proteína está descrita en la literatura como la proteína kinasa responsable de desencadenar la germinación de esporas en respuesta a muropéptidos, como señal bacteriana para salir de la latencia. El PrkC es un receptor de germinación que se une a fragmentos de peptidoglicano que contienen m-Dpm (meso-diaminopimelato), los cuales actúan como germinantes de esporas (Shah et al., 2013). Estos resultados sugieren que la comunidad bacteriana de la rizósfera está preparada genómicamente para entrar y sobreponerse a la latencia.

Promoción de crecimiento por mecanismos directos. Diferentes mecanismos de promoción de crecimiento con acción directa son empleados por los microorganismos en la rizósfera con el fin de adquirir nutrientes y aumentar la biomasa vegetal, como fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de elementos como el fósforo y hierro, producción y regulación de hormonas (Kavamura et al., 2013a). En el análisis comparativo de los metagenomas de rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*, encontramos enzimas involucradas en el proceso de fijación de nitrógeno, en la síntesis de auxinas, en la regulación de los niveles de etileno vegetal y en la asimilación de fósforo.

La enzima nitrogenasa es el complejo enzimático conformado por dos proteínas que trabajan en tándem: la proteína hierro (Fe) (dímero de NifH) y la proteína hierro-molibdeno (FeMo) (tetramero de NifH-NifK), encargadas de transferir electrones y reducir el N_2 a $2NH_3$, respectivamente (Kneip et al., 2007). En nuestro análisis, encontramos los tres genes que codifican las seis subunidades que conforman las dos proteínas: NifH [EC:1.18.6.1], NifK [EC:1.18.6.1] y NifD [EC:1.18.6.1] (Figura 25). Así mismo, encontramos el gen que codifica la enzima indolpiruvato descarboxilasa (IPDC) [EC:4.1.1.74], una enzima clave en la síntesis de ácido indol acético a partir de triptófano que cataliza el paso de indol-3-piruvato a indol-3-acetaldehído (Fu and Wang, 2011). Observamos niveles significativamente superiores de esta enzima en el metagenoma de *O.*

robusta del sitio de San Felipe, sin embargo, ésta marcada diferencia podría estar influenciada porque esta muestra representa la combinación de las estacionalidades de secas y de lluvias.

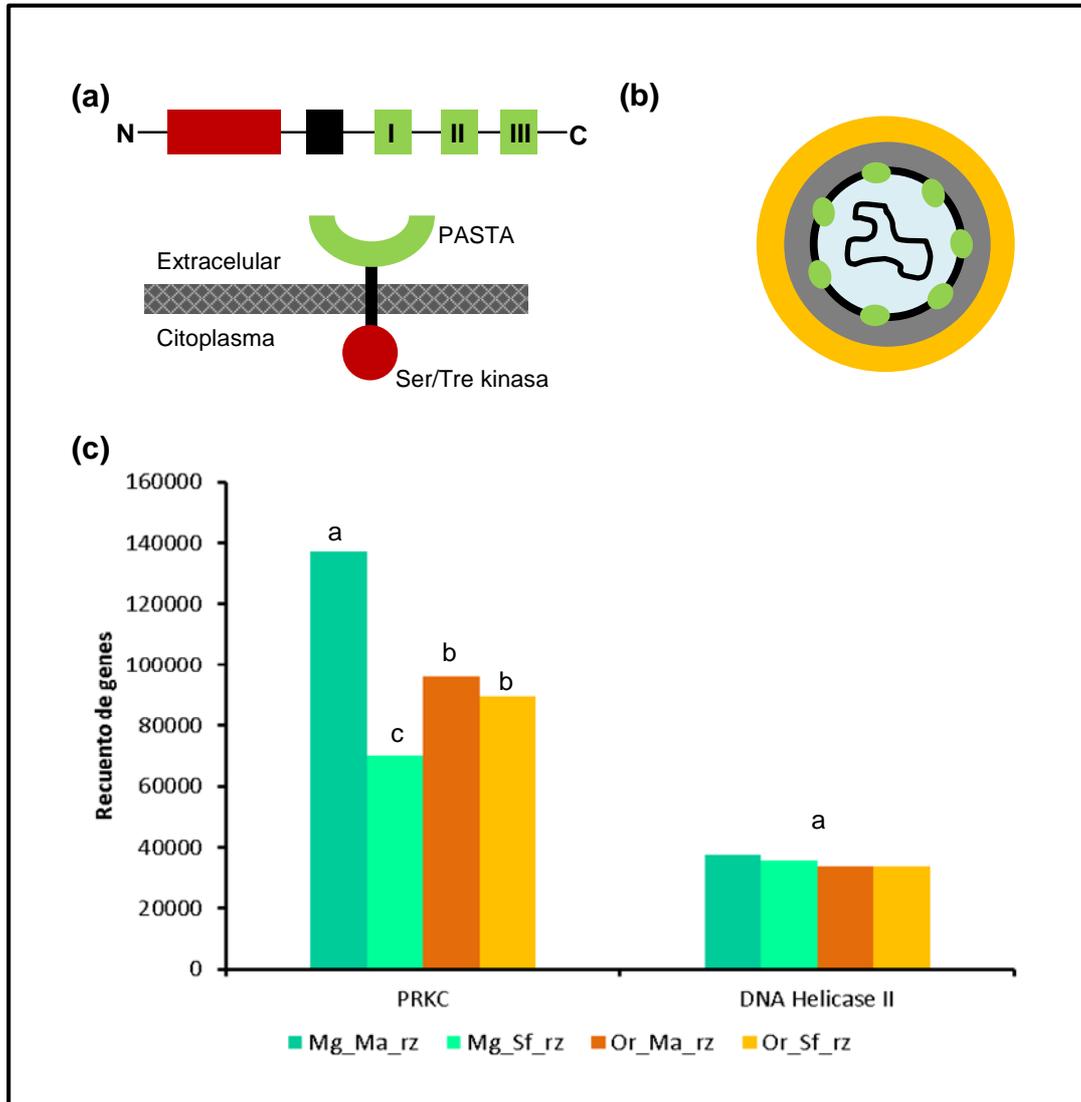


Figura 24. Serina/Treonina Protein Kinasa (PrkC) presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. **(a)** Representación esquemática de la estructura de PrkC, conformado por un dominio N-terminal kinasa (en rojo), una secuencia transmembranal (en negro), y tres repeticiones PASTA (por sus siglas en inglés, *penicillin and Ser/Thr kinase associated*) (en verde) en el dominio extracelular. **(b)** Esquema de localización de PrkC, el ADN se encuentra en el núcleo (en azul) y está rodeada por la corteza (en gris), la cubierta (en amarillo) y el PrkC (en verde) se asocia con la membrana interna (en negro) de la espora. **(c)** Niveles de los recuentos de genes que codifican para las proteínas PRKC y ADN Helicasa II (control interno de metabolismo central) encontrados en análisis metagenómico. Las letras ubicadas sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$.

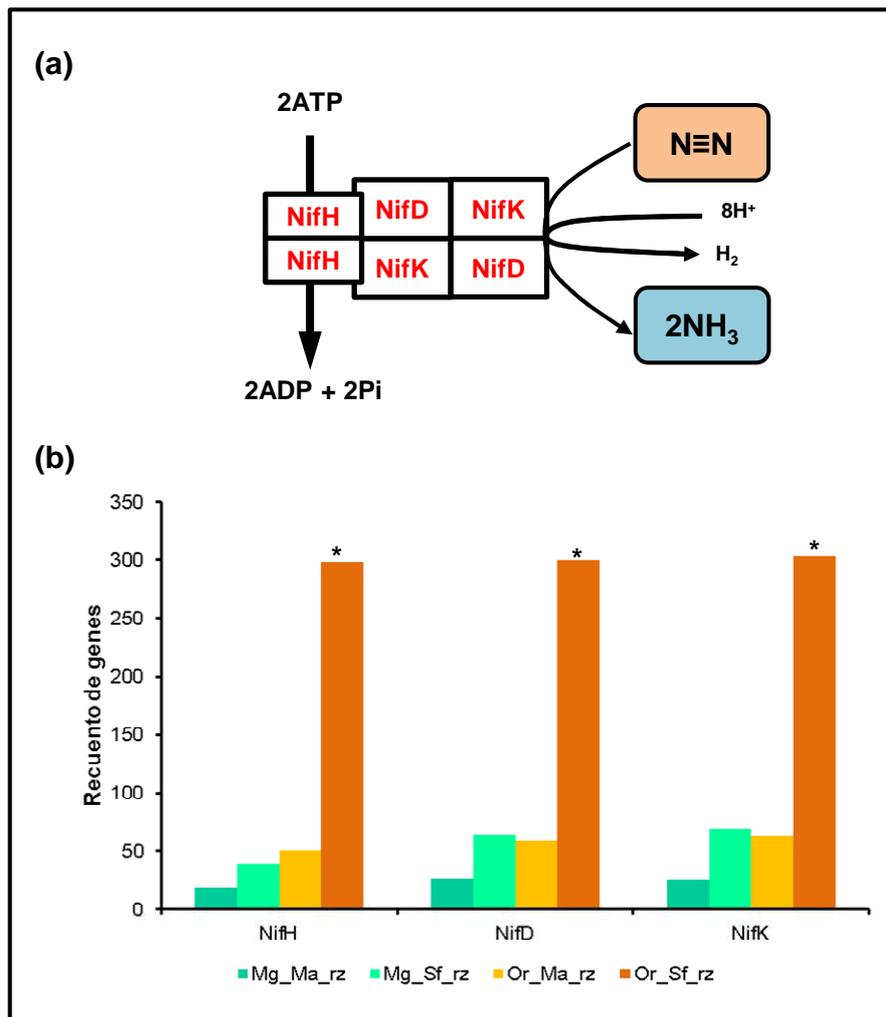


Figura 25. Fijación de nitrógeno atmosférico presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. **(a)** Representación esquemática del proceso de fijación de nitrógeno presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*. **(b)** Niveles de los recuentos de genes que codifican para las subunidades de la enzima Nitrogenasa encontrados en análisis metagenómico. Los asteriscos ubicados sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$.

El AIA exógeno junto con el AIA endógeno inducen la síntesis de la enzima ACC sintasa que convierte a S-adenosilmetionina (SAM) en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor de catálisis de la enzima ACC desaminasa (ACCD). La ACC desaminasa hidroliza al ACC en α -cetobutirato y amonio, reduciendo los niveles de etileno en la planta, y en conjunto con el AIA endógeno y exógeno, provoca una proliferación y elongación celular vegetal (Glick et al., 2007). Además de encontrar la enzima IPDC, encontramos niveles del gen

que codifica de la enzima ACC desaminasa [EC:3.5.99.7] en los cuatro metagenomas analizados (Figura 26a,b,d).

Los mecanismos de solubilización de fosfatos no están completamente dilucidados, sin embargo, se entiende que el ácido glucónico (GA) y ácido 2-cetoglucónico (2-KGA) pueden ser una base importante para la actividad de solubilización de fosfatos en muchas bacterias. La biosíntesis de GA se lleva a cabo por la enzima glucosa deshidrogenasa (GCD) en presencia del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), donde la enzima pirroloquinolina quinona-sintasa (PqqC) cataliza la reacción final de la síntesis de este último y es recientemente considerado un marcador de solubilización de fosfatos (Meyer et al., 2011). En los análisis de metagenoma de las comunidades de rizósfera asociadas a las dos especies de Cactus, detectamos niveles del gen que codifica la PqqC [EC:1.3.3.11] en los cuatro metagenomas similares a los niveles detectados de la ACC desaminada (Figura 26c-d).

Promoción de crecimiento por mecanismos indirectos. Los microorganismos de la rizósfera al igual que emplean mecanismos de promoción de crecimiento por acción directa, emplean mecanismos con acción indirecta mediante procesos de antibiosis por producción de compuestos volátiles y por la acción de enzimas líticas (Kavamura et al., 2013a). El cianuro de hidrógeno (HCN, por su siglas en inglés) es un metabolito secundario volátil producido por algunas bacterias, el cual, se forma a partir de glicina en una reacción oxidativa catalizada por la enzima HCN sintasa. El proceso de síntesis de HCN es aún poco conocido, estudios con las cepas de biocontrol *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Pseudomonas protegens* (previamente *fluorescens*) CHA0 han revelado que la HCN sintasa en *Pseudomonas* está codificada por 3 genes biosintéticos: *hcnA*, *hcnB*, y *hcnC*, organizados en una estructura de operón (Michelsen and Stougaard, 2012).

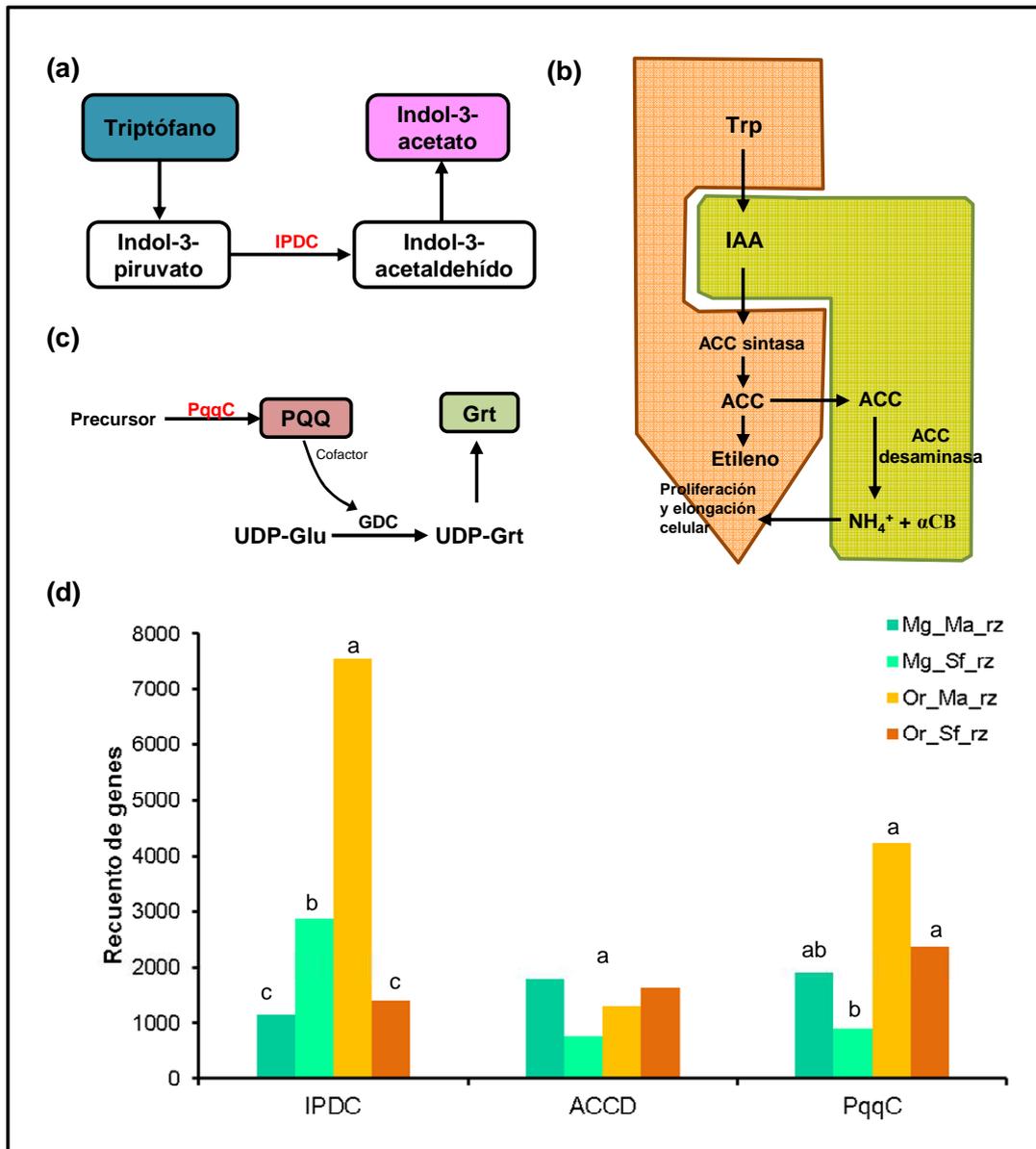


Figura 26. Metabolismo de mecanismos de promoción de crecimiento por IAA, ACC desaminasa y solubilización de fosfatos presentes en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. Representación esquemática de la actividad de la enzima indolepiruvato descarboxilasa (IPDC) involucrada en la síntesis indol-3-acetato (a), de la actividad de la enzima ACC desaminasa (b), de la actividad de la enzima pirroloquinolina-quinone sintasa (PqqC) involucrada en la síntesis de gluconato (Grt) (c). (d) Niveles de los recuentos de genes que codifican para las enzimas IPDC, ACCD y PqqC encontrados en análisis metagenómico. Las letras ubicadas sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$.

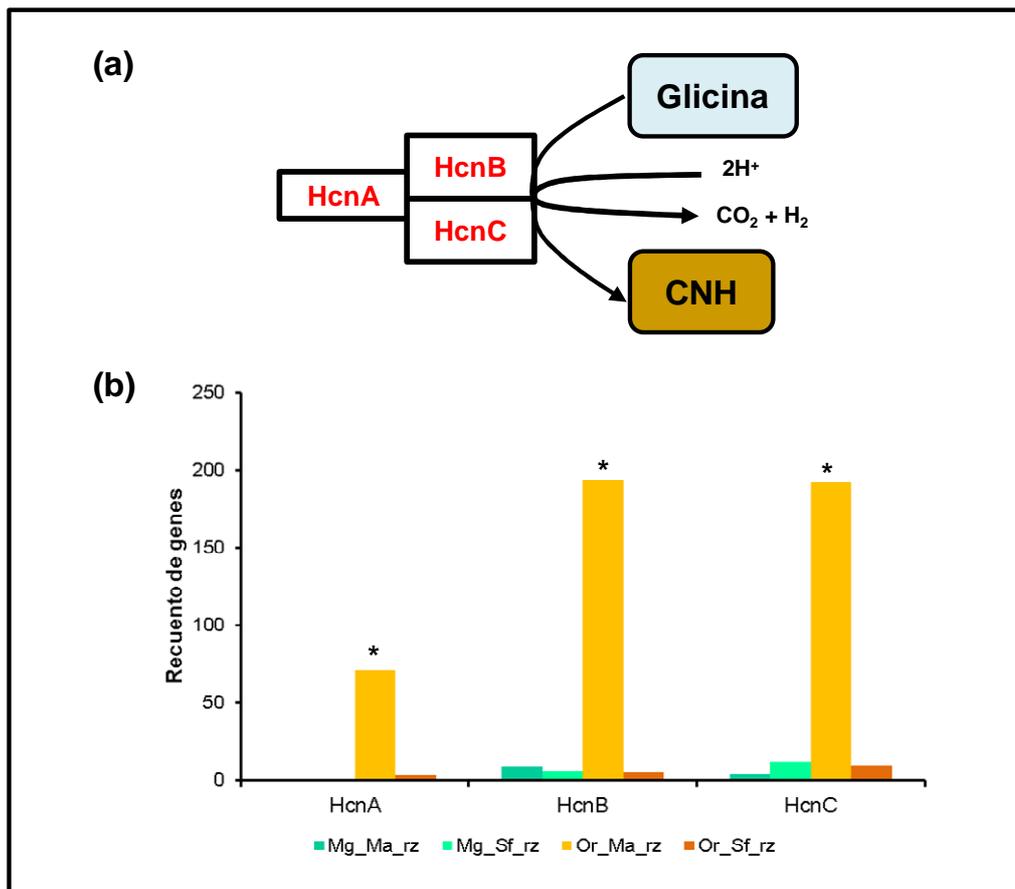


Figura 27. Síntesis de cianuro de hidrógeno presente en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. **(a)** Representación esquemática de la actividad de la enzima cianuro de hidrógeno sintasa involucrada en la síntesis cianuro de hidrógeno (CNH) a partir de glicina. **(b)** Niveles de los recuentos de genes que codifican para las subunidades de la enzima cianuro de hidrógeno sintasa encontrados en análisis metagenómico. Los asteriscos ubicados sobre las barras representan diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$.

El análisis comparativo de los metagenomas de rizósfera de las dos especies de Cactus mostró la presencia de los genes que codifican las proteínas cianuro de hidrógeno sintasa HcnA [EC:1.4.99.5], HcnB [EC:1.4.99.5] y HcnC [EC:1.4.99.5], aunque con niveles muy bajos (Figura 27a-b). Además, interesantemente encontramos enzimas como Endoglucanasa [EC:3.2.1.4] y Quitinasa [EC:3.2.1.14] con niveles superiores a los demás complejo enzimáticos encontrados (Figura 28a-b). Diversos microorganismos emplean la actividad de enzimas hidrolíticas de

pared celular como factores cruciales antagónicos y de colonización vegetal (Compant et al., 2005).

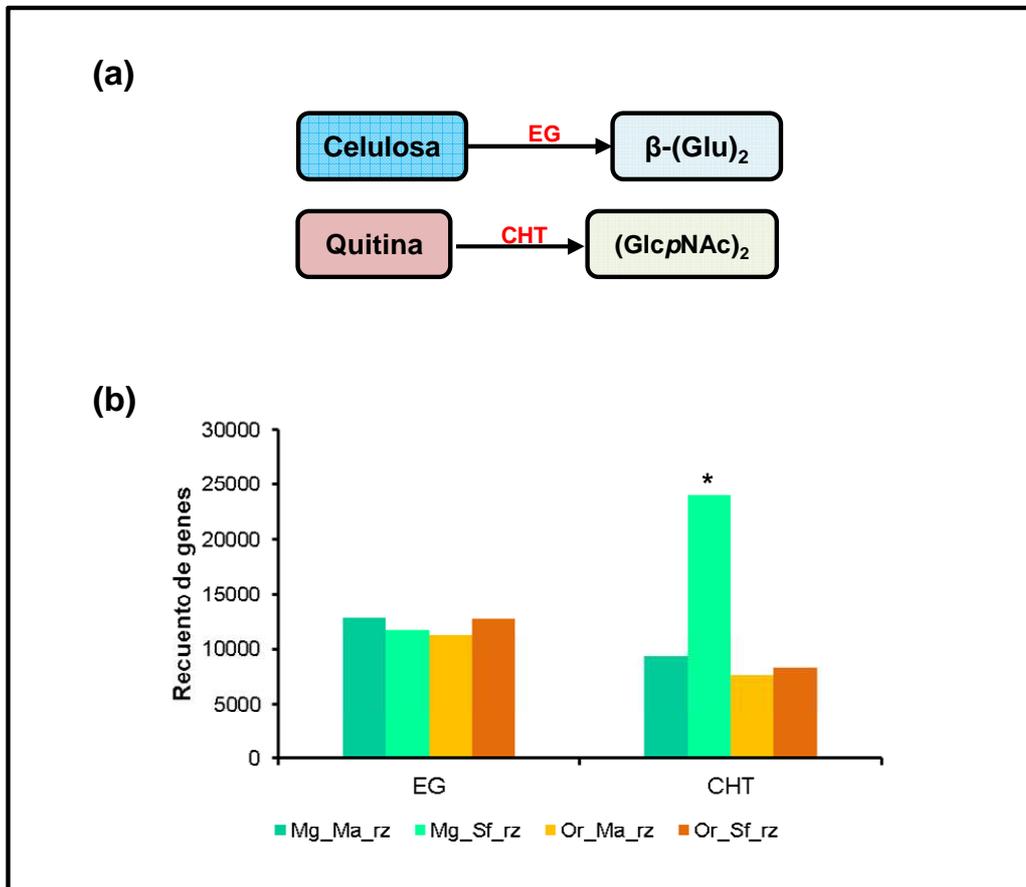


Figura 28. Enzimas hidrolíticas presentes en la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* basado en el análisis metagenómico. **(a)** Representación esquemática de la actividad de las enzimas endoglucanasa (EG) y quitinasa (CHT) involucradas en la hidrólisis de celulosa y quina, respectivamente. **(b)** Niveles de los recuentos de genes que codifican para las enzimas EG y CHT encontrados en análisis metagenómico. El asterisco ubicado sobre las barras representa diferencias estadísticamente significativas después de una comparación funcional R/Q con un D-score ≥ 1.96 y $P \leq 0.05$.

7.6.3 Discusión

Las interacciones entre los miembros de la microbiota de una planta y sus anfitriones cubren un espectro que va desde el mutualismo hasta las relaciones comensalistas y parasitarias. Numerosos estudios realizados sobre los microorganismos que fueron aislados de la filósfera, rizósfera, endósfera de hoja o

raíz han puesto de manifiesto una serie de rasgos microbianos, que son beneficiosos desde el punto de vista de la planta huésped (Lugtenberg y Kamilova 2009; Porrás-Alfaro y Bayman 2011; Vorholt 2012). En particular la adquisición de nutrientes del suelo, la tolerancia al estrés abiótico y la producción de hormonas, así como la protección indirecta de patógenos se han propuesto como mecanismos microbianos primarios que permiten la promoción de crecimiento de las plantas. En este apartado analizamos los patrones funcionales de los microorganismos asociados a las semillas y rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta* mediante métodos microbiológicos y bioquímicos tradicionales y por análisis metagenómicos básicos. Mediante los métodos microbiológicos y bioquímicos tradicionales observamos que las bacterias aisladas de las semillas de las dos especies de Cactus, que en su mayoría pertenecen a los géneros *Psychrobacillus* y *Bacillus*, presentaron la capacidad de tolerar estrés abiótico como lo es el estrés hídrico y altas temperaturas. Este resultado coincide con lo observado por Kavamura *et al.* (2013a) en cepas principalmente del género *Bacillus* aisladas de la rizósfera de tres especies de Cactus sudamericanos, *C. jamacaru*, *P. gounellei* y *Melocactus* sp., donde las cepas aisladas fueron capaces de crecer en medios con bajo contenido de agua. Así mismo, el análisis metagenómico de la rizósfera reveló que las comunidades microbianas asociadas a este microhábitat, presentaron mecanismos de tolerancia al estrés abiótico mediante la síntesis de moléculas protectoras como trehalosa y mediante proteínas moduladoras del proceso de latencia. Estos resultados sugieren que las comunidades bacterianas asociadas a las dos especies de Cactus aquí estudiadas, poseen mecanismos que les permiten tolerar y sobreponerse a perturbaciones ambientales como sequía y altas temperaturas.

Además de tolerar el estrés abiótico, con ambos enfoques metodológicos observamos que los microorganismos asociados a las semillas y rizósfera de las dos especies de Cactus, presentaron mecanismos de promoción de crecimiento por acción directa como fijación de nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos, producción y regulación de fitohormonas y además, por acción indirecta mediante antibiosis produciendo compuestos volátiles y enzimas líticas.

Estudios realizados en otras especies de Cactus y especies suculentas (Aguirre-Garrido et al., 2012; Desgarenes et al., 2014; Kavamura et al., 2013a, 2013b; Lançon et al., 2013; Puente et al., 2004a, 2004b, 2009a, 2009b) también han mostrado que las bacterias asociadas a las diferentes partes de las plantas huésped poseen la capacidad de promover crecimiento por distintos mecanismos. Cabe señalar que, los grupos taxonómicos observados en estos estudios fueron muy diversos, no obstante en el nuestro, la mayoría de las cepas aisladas pertenecen a la misma clase taxonómica (Bacilli), aunque también se aislaron algunas Gammaproteobacteria y Actinobacteria. En contraparte, el análisis metagenómico reveló no solo la presencia de Firmicutes sino también de los filo Proteobacteria, Actinobacteria, Cyanobacteria y Bacteroidetes. Sin embargo, debido a los patrones funcionales observados en este estudio, la diversidad taxonómica observada en estas especies CAM podría converger en un mismo tipo de función, lo que nos llevaría a agruparlos como grupos funcionales.

Partiendo del principio de que las plantas y sus asociaciones simbióticas son consideradas en conjunto como un holobionte, y gran parte de su fenotipo es el producto de la co-expresión de sus propios genes y de los genes microbianos (hologenoma), influenciados a su vez por el ambiente en el que se encuentran (Bordenstein and Theis, 2015; Partida-Martínez and Heil, 2011; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2011). Considerando que los mecanismos de adaptación al estrés abiótico en conjunto con los mecanismos de promoción de crecimiento que poseen los microorganismos asociados a las semillas y rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*, estos resultados sugieren fuertemente que la sobrevivencia de estos dos holobiontes a los sistemas áridos y semiáridos puede estar directamente influenciada por la interacción con su microbiota asociada.

8. Conclusiones

En el presente trabajo se analizó el ensamblaje de las comunidades microbianas asociadas a dos especies de Cactáceas silvestres con crecimiento simpátrico, bajo un enfoque global sobre los tres principales grupos microbianos: Arqueas, Bacterias y Hongos, ante la interacción con el ambiente. La era genómica ha permitido tener un análisis con mayor profundidad en la identificación de los taxones microbianos y bajo qué mecanismos están interaccionando con el huésped.

A lo largo de los seis capítulos de esta tesis, fuimos observando y concluyendo diferentes aspectos de las comunidades microbianas asociadas a nuestras dos especies de Cactus modelo, *M. geometrizzans* y *O. robusta*. En los capítulos del I-V, identificamos **quienes** son los taxones microbianos que están presentes en los seis compartimentos analizados, **cómo** es su diversidad, **cuál** o **cuáles** factores modulan la estructura de las comunidades y sí los **patrones de ensamblaje se conservan** en otra especie simpátrica con metabolismo CAM. Con lo anterior concluimos que, las comunidades microbianas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta*:

- estuvieron compuestas principalmente por los fila Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria; y por miembros del filum Ascomycota (Dothideomycetes, Eurotiomycetes y Sordariomycetes);
- mostraron que la composición taxonómica de las comunidades epífitas y endófitas difieren a través de los compartimentos de la planta y entre especies;
- mostraron también que los grupos taxonómicos encontrados en las comunidades epífitas y endófitas provienen principalmente del suelo;
- revelaron aparentemente baja colonización de taxones del dominio Arquea y de hongos micorrízicos en los compartimentos asociados directamente a las plantas;
- revelaron mayor diversidad microbiana en las comunidades del suelo y suelo cercano, y más baja en la comunidad de endósfera del tallo;

- interesantemente mostraron mayor diversidad de bacterias/arqueas en la filósfera que en la rizósfera, a pesar del importante efecto de los factores ambientales sobre la filósfera, en sentido opuesto a las comunidades fúngicas;
- fueron principalmente influenciadas por el microhábitat (factor biótico) a nivel global;
- mostraron efectos localizados por la especie de Cactus en la endósfera y por el sitio de muestreo en los suelos.
- fueron similares entre ambas especies y también con *A. salmiana* (la tercera especie simpátrica) en la rizósfera, endósfera de raíz y filósfera, sugiriendo similares interacciones planta-microorganismo en estas comunidades;
- fueron distintas entre las tres especies CAM simpátricas únicamente en la comunidad de hongos endófitos, sugiriendo especificidad por el huésped;
- mostraron una dinámica comunitaria bacteriana en la endósfera del tallo a través de periodos largos de tiempo y perturbaciones ambientales, y en cambio, una comunidad bacteriana estable en la endósfera de la raíz.

Una vez que abordamos **quienes** se asocian a las Cactáceas, en el capítulo VI nos interesamos en hacer un primer acercamiento en **qué** pueden estar haciendo las comunidades microbianas al interactuar con el huésped. Nos enfocamos en dos microhábitats particulares: endófitos de semilla (microorganismos de transferencia vertical) y rizósfera. La combinación de métodos moleculares con métodos tradicionales de cultivo nos permitió abordar el análisis de los posibles mecanismos de interacción planta-microorganismo. Con lo anterior concluimos que los endófitos asociados a las semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*:

- se aislaron e identificaron 17 bacterias de semilla, como posibles endófitos de transferencia vertical;
- se caracterizaron como xerotolerantes, termotolerantes y productoras de exopolisacáridos *in vitro*;

- presentaron capacidad de promover crecimiento vegetal *in vitro* por mecanismos directos como: producción de AIA, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno;
- presentaron capacidad de promover crecimiento vegetal *in vitro* por mecanismos indirectos como: producción de compuestos volátiles, como amónico y cianuro de hidrógeno, y sintetizar enzimas líticas;

los microorganismos asociados a la rizósfera de *M. geometrizans* y *O. robusta*:

- presentaron las cinco rutas descritas para la síntesis de trehalosa, el principal osmoprotector ante estrés abiótico en plantas;
- presentaron enzimas clave para la síntesis y regulación de hormonas: auxinas y etileno, principales mecanismos directos de promoción de crecimiento;
- presentaron enzimas necesarias para la adquisición de nitrógeno y fósforo, como síntesis de ácido glucónico y las subunidades de la enzima nitrogenasa;
- presentaron mecanismos de antibiosis mediante producción de compuestos volátiles y enzimas líticas.

9. Perspectivas

La información obtenida en el presente trabajo nos permitió conocer amplios aspectos de las comunidades microbianas asociadas a las Cactáceas, sin embargo, queda mucho por indagar todavía. Queda un abanico de interrogantes de aspectos básicos en la biología de los mecanismos de asociación e interacción planta-microorganismo, así como aspectos con enfoques biotecnológicos para una futura aplicación en el sector agrícola en zonas no aptas para la agricultura. Gracias al dinámico grupo del Laboratorio de Interacciones Microbianas, diversas líneas de investigación ya están siendo abordadas.

Un aspecto interesante a seguir elucidando son los **mecanismos de colonización e interacción planta-microorganismo**. Para abordar estas interrogantes, se han desarrollado metagenomas de las comunidades epífitas asociadas a *M. geometrizzans* y *O. robusta* gracias a la colaboración con el Departamento de Energía del JGI, los cuales permitirán analizar a mayor profundidad los principales mecanismos de interacción de la microbiota de la rizósfera y filósfera con el huésped. Así como, corroborar e indagar sobre la diversidad observada en la filósfera vs. rizósfera, un comportamiento poco usual en las comunidades microbianas asociadas a las plantas, evaluando si hay una correlación entre la diversidad taxonómica observada y la diversidad funcional en ambos microhábitats. Este conjunto de datos permitirá someter a comprobación el supuesto, propuesto en esta tesis, sobre la posible influencia de las especies de Cianobacterias presentes en la filósfera como pioneras en el proceso de colonización en los tallos de las Cactáceas. La información recabada permitirá diseñar estrategias experimentales para el aislamiento y corroboración *in vitro* de la capacidad de las especies de Cianobacterias asociadas a los Cactus de proveer una entrada continua de nitrógeno y un ambiente confortable de humedad.

Los **mecanismos de transmisión de la microbiota** a las siguientes generaciones es un aspecto vital para el entendimiento de la evolución de las asociaciones simbióticas. El conocimiento generado en este trabajo acerca de la presencia de bacterias en las semillas de *M. geometrizzans* y *O. robusta*, nos conduce a pensar que una significativa carga microbiana se está transfiriendo de

manera vertical en estas especies de Cactus. Es importante corroborar *in situ* con sondas específicas y universales la presencia de las cepas aisladas en las semillas, así como analizar la posible presencia de otros microorganismos como hongos y virus. Aunado a esto, algunas de las cepas bacterianas fueron detectadas con un 97% de homología en las plantas adultas con porcentajes mayores del 25% de abundancia total en los tallos, lo que conduce a pensar en una importante interacción de estas bacterias con las plantas huésped. Actualmente, se encuentra en proceso la secuenciación de los genomas de 15 cepas aisladas de semilla, lo que permitirá en primera instancia conocer más a profundidad los mecanismos de interacción, además de los ya observados a nivel *in vitro*. El estudiante de maestría Víctor Nuñez ha abordado el análisis de los mecanismos de interacción ante estrés abiótico que presentan los microorganismos de transferencia vertical en *M. geometrizzans* y *O. robusta*.

La **especificidad** observada por parte de los **hongos endófitos** de los tallos y hojas de las especies simpátricas de Cactus y Agaves dejó la pregunta abierta sobre cómo colonizan los microbios endófitos este compartimiento y la forma en que son heredados. Los Cactus y Agaves a menudo se reproducen en la naturaleza por reproducción vegetativa, lo que aumenta la probabilidad de heredar la microbiota interna de los tallos y hojas. Sería interesante diseñar estrategias experimentales para aislar y comprobar si los hongos endófitos especie-específicos solo son capaces de colonizar a su huésped seleccionado, o si esta especificidad observada se debe a eventos estocásticos que se han conservado y mantenido en las poblaciones locales, gracias a este modo de reproducción.

A pesar de que no detectamos altos niveles de taxones del dominio **Arquea y de hongos micorrizicos** en las comunidades asociadas a nuestras dos especies de Cactus, sería interesante realizar una aproximación con marcadores moleculares específicos para estas dos comunidades; pues es de más conocido las características que poseen estos microorganismos en los ambientes extremos (Bonfante et al., 2009).

La **aplicación biotecnológica** de los microorganismos ha tomado amplio reconocimiento en los últimos años. Una gran diversidad de reportes han

demostrado las diferentes aplicaciones que poseen en particular los microorganismos endófitos (Gaiero et al., 2013; Partida-Martínez and Heil, 2011; Turner et al., 2013a). En este trabajo demostramos que las bacterias aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta* poseen la capacidad de tolerar el estrés abiótico y promover el crecimiento vegetal por mecanismos directos e indirectos *in vitro*. Bajo este hallazgo, se ha tornado el interés de evaluar si las cepas de *M. geometrizans* y *O. robusta* son capaces de colonización otras especies huésped de interés agronómico como tomate y maíz. Los experimentos realizados hasta el momento por los estudiantes de licenciatura Pablo Ruíz, Berenice Cabrera y Omar Miranda (como parte de su trabajo de tesis y estancias profesionales) han sugerido que algunas de las cepas aisladas de semilla son capaces de colonizar plantas de tomate variedad Micro-Tom y estimular el crecimiento radicular y el peso fresco del área foliar con mayor intensidad que los controles de fertilización química y fertilización con inoculantes comerciales. Así mismo, están en proceso la evaluación de la capacidad de promover el crecimiento vegetal de *Arabidopsis thaliana* y variedades de maíz vía compuestos volátiles orgánicos por el estudiante de doctorado David Camarena.

La **producción de metabolitos secundarios** con actividad antimicrobiana y citotóxica es otro fuerte antecedente que se les ha atribuido a los microorganismos endófitos (Bacon and Hinton, 2006). Bajo este principio y haciendo uso de los datos generados por la secuenciación de los genomas de las cepas aisladas de semilla, sería interesante realizar una búsqueda dirigida de clústeres de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios. Recabando dicha información, se podría diseñar estrategias experimentales para aislar, identificar y probar los metabolitos secundarios ante diferentes blancos de interés.

10. Referencias

- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., et al. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 891–904. doi:10.1007/s10482-012-9705-3.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163, 173–181.
- Anaya-Pérez, M. (2003). “El Nopal (*Opuntia* spp.) como forraje,” in *Estudio FAO Producción y Protección Vegetal.*, eds. C. Mondragón-Jacobo and S. Pérez-González (Mexico, DF: FAO), 169.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.tb00081.x.
- Andrew, D. R., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., Racolta, A., Martinson, V. G., and Dontsova, K. (2012). Abiotic factors shape microbial diversity in Sonoran desert soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7527–7537. doi:10.1128/AEM.01459-12.
- Arias, S., Gamma, S., and Guzmán, L. (2012). “Fascículo 95. Cactaceae,” in *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, eds. R. Medina Lemos, J. G. Sánchez Ken, A. García Mendoza, and S. Arias Montes (Mexico, DF: CONABIO and Instituto de Biología UNAM), 1–246.
- Atlas, R. M., and Bartha, R. (1998). *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th edn. Redwood City, CA, USA: Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Aveni, A. F., Calnek, E. E., and Hartung, H. (1988). Myth, Environment, and the Orientation of the Templo Mayor of Tenochtitlan. *Am. Antiq.* 53, 287–309. doi:10.2307/281020.
- Bacon, C. W., Glenn, A. E., and Yates, I. E. (2008). *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Rev.* 27, 411–446. doi:10.1080/15569540802497889.
- Bacon, C. W., and Hinton, D. M. (2006). “Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility,” in *Plant-Associated Bacteria*, ed. S. S. Gnanamanickam (Nederland: Springer International Publishing AG), 155–194. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7_5.
- Bakker, A. W., and Schippers, B. (1987). Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biol. Biochem.* 19, 451–457. doi:10.1016/0038-0717(87)90037-X.
- Balvanera, P., Pfisterer, A., He, J., Nakashizuka, T., Raffaelli, D., and Schmid, B. (2006). Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol. Lett.* 9, 1146–1156. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00963.x.
- Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., et al. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A. 107, 18933–18938. doi:10.1073/pnas.1007028107.
- Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., and Köberl, M. (2015). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. *J. Exp. Bot.* doi:10.1093/jxb/erv466.
- Bertin, C., Yang, X., and Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256, 67–83. doi:10.1023/A:1026290508166.
- Bland, C., Ramsey, T., Sabree, F., Lowe, M., Brown, K., Kyrpides, N., et al. (2007). CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics* 18, 209.
- Bloembergen, G. V., and Lugtenberg, B. J. . (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 343–350. doi:10.1016/S1369-5266(00)00183-7.
- Bolaños-Carrillo, M. A., Ventura-Gallegos, J. L., Saldivar-Jiménez, A. D., Zentella-Dehesa, A., and Martínez-Vázquez, M. (2015). Effect of sterols isolated from *Myrtillocactus geometrizans* on growth inhibition of colon and breast cancer cells. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 589350. doi:10.1155/2015/589350.
- Bonfante, P., and Anca, I.-A. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 363–383. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073504.
- Bonfante, P., and Genre, A. (2015). Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak “plantish” or “fungish”? *Trends Plant Sci.* 20, 150–154. doi:10.1016/j.tplants.2014.12.002.
- Bordenstein, S. R., and Theis, K. R. (2015). Host Biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS One* 13, 1–23. doi:10.1371/journal.pbio.1002226.
- Bravo Hollis, H., and Sheinvar, L. (1999). *El interesante mundo de las Cactaceas*. Second. Mexico, DF: CONACYT-Fondo de Cultura Económica.
- Budinsky, A., Wolfram, R., Oguogho, A., Efthimiou, Y., Stamatopoulos, Y., and Sinzinger, H. (2001). Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 65, 45–50. doi:10.1054/plef.2001.0287.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., et al. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host Microbe* 17, 392–403. doi:10.1016/j.chom.2015.01.011.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., et al. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 488, 91–95. doi:10.1038/nature11336.
- Čapková, K., Hauer, T., Řeháková, K., and Doležal, J. (2016). Some like it high! Phylogenetic diversity of high-elevation cyanobacterial community from biological soil crusts of western Himalaya. *Microb. Ecol.* 71, 113–123. doi:10.1007/s00248-015-0694-4.
- Cappuccino, J. C., and Sherman, N. (1992). *Microbiology: A laboratory manual*. Third. New York: Benjamin/Cummings Publishing Company.

- Caruso, T., Chan, Y., Lacap, D. C., Lau, M. C. Y., McKay, C. P., and Pointing, S. B. (2011). Stochastic and deterministic processes interact in the assembly of desert microbial communities on a global scale. *ISME J.* 5, 1406–1413. doi:10.1038/ismej.2011.21.
- Cerutti, V., and Starosta, P. (1996). *Cactus*. First. Le Chêne.
- Céspedes, C. L., Salazar, J. R., Martínez, M., and Aranda, E. (2005). Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* 66, 2481–2493. doi:10.1016/j.phytochem.2005.07.010.
- Chanal, A., Chapon, V., Benzerara, K., Barakat, M., Christen, R., Achouak, W., et al. (2006). The desert of Tataouine: An extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ. Microbiol.* 8, 514–525. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00921.x.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., and Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME J.* 8, 790–803. doi:10.1038/ismej.2013.196.
- Chhabra, S., Brazil, D., Morrissey, J., Burke, J. I., O’Gara, F., and Dowling, D. N. (2013). Characterization of mineral phosphate solubilization traits from a barley rhizosphere soil functional metagenome. *Microbiologyopen* 2, 717–724. doi:10.1002/mbo3.110.
- Chou, H., and Holmes, M. (2001). DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17, 1093–1104.
- Clements, F. (1916). *Plant Succession: An Analysis of the Development of Vegetation*. Washington: Carnegie Institution of Washington.
- Cline, W. R. (2007). *Global warming and agriculture: impact estimates by country*. Washington: Center for Global Development and Peterson Institute for International Economics.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol.* 209, 798. doi:10.1111/nph.13697.
- Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porrás-Alfaro, A., Stursova, M., et al. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *J. Ecol.* 96, 413–420. doi:10.1111/j.1365-2745.2008.01362.x.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2012). *La biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado*. , eds. A. Cruz Angón, E. D. Melgarejo, E. A. V. Contreras Ruiz, M. A. González Gutiérrez, R. Becerril Patlán, D. Guzmán González, et al. Mexico: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)/Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato (IEE).
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Cle, C., and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951–4959. doi:10.1128/AEM.71.9.4951.
- Connon, S. A., Lester, E. D., Shafaat, H. S., Obenhuber, D. C., and Ponce, A.

- (2007). Bacterial diversity in hyperarid atacama desert soils. *J. Geophys. Res.* 112, G04S17. doi:10.1029/2006JG000311.
- Costa, R., Gomes, N. C. M., Krögerrecklenfort, E., Opelt, K., Berg, G., and Smalla, K. (2007). *Pseudomonas* community structure and antagonistic potential in the rhizosphere: Insights gained by combining phylogenetic and functional gene-based analyses. *Environ. Microbiol.* 9, 2260–2273. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01340.x.
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G., and Smalla, K. (2006). Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 236–249. doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00026.x.
- Cui, M., and Nobel, P. S. (1992). Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 122, 643–649. doi:10.1111/j.1469-8137.1992.tb00092.x.
- Dennis, P. G., Miller, A. J., and Hirsch, P. R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 313–327. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., et al. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069–5072. doi:10.1128/AEM.03006-05.
- Desgarennés, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., Peña-Cabriales, J. J., and Partida-Martinez, L. P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 844–857. doi:10.1111/1574-6941.12438.
- Djerassi, C., Burstein, S., Estrada, H., Lemmin, A., Lipmann, A. E., Manjarrez, A., et al. (1957). Terpenoids, XXVIII. The triterpene composition of the genus *Myrtillocactus*. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 3525–3528.
- Docherty, K. M., Borton, H. M., Espinosa, N., Gebhardt, M., Gil-Loaiza, J., Gutknecht, J. L. M., et al. (2015). Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. *PLoS One* 10, e0135352. doi:10.1371/journal.pone.0135352.
- Dumbrell, A. J., Nelson, M., Helgason, T., Dytham, C., and Fitter, A. H. (2010). Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *ISME J.* 4, 337–345. doi:10.1038/ismej.2009.122.
- Eddy, S. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLOS Comput. Biol.* 7, e1002195.
- Edgar, R. (2007). PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats. *BMC Bioinformatics* 8, 18.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–8. doi:10.1038/nmeth.2604.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., et al. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-

- associated microbiomes of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, E911–E920. doi:10.1073/pnas.1414592112.
- Edwards, K. J. (2001). “Miniprep procedures for the isolation of plant DNA,” in *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, eds. A. Karp, D. S. Ingram, and P. G. Isaac (The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 22–23.
- Eisen, J. A. (1998). Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *8*, 163–167. doi:10.1101/gr.8.3.163.
- Estrada-Luna, A. A. (1988). *Producción de brotes e injertación in vitro de seis especies de nopal (Opuntia spp) originarias del Altiplano Potosino-Zacatecano*. Texcoco: Colegio de Postgraduados.
- Fierer, N., Lauber, C. L., Ramirez, K. S., Zaneveld, J., Bradford, M. A., and Knight, R. (2012). Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *ISME J.* *6*, 1007–1017. doi:10.1038/ismej.2011.159.
- Fraser, C., Alm, E., Polz, M., Spratt, B., and Hanage, W. (2009). The bacterial species challenge: making sense of genetic and ecological diversity. *Science* *323*, 741–746. doi:10.1126/science.1159388.
- Fraser, C., Hanage, W. P., and Spratt, B. G. (2007). Recombination and the nature of bacterial speciation. *Science* *315*, 476–480. doi:10.1126/science.1127573.
- Freiberg, E. (1998). Microclimatic parameters influencing nitrogen fixation in the phyllosphere in a Costa Rican premontane rain forest. *Oecologia* *17*, 9–18.
- Freitag, M., and Morrell, J. (1992). Decolorization of the polymeric dye poly r-478 by wood-inhabiting fungi. *Can. J. Microbiol.* *38*, 811–822. doi:10.1139/m92-133.
- Fu, J., and Wang, S. (2011). Insights into Auxin Signaling in Plant-Pathogen Interactions. *Front. Plant Sci.* *2*, Article 74. doi:10.3389/fpls.2011.00074.
- Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F., and Sessitsch, A. (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J.* *2*, 561–570. doi:10.1038/ismej.2008.14.
- Gaidos, E., Marteinson, V., Thorsteinsson, T., Jóhannesson, T., Rúnarsson, A. R., Stefansson, A., et al. (2009). An oligarchic microbial assemblage in the anoxic bottom waters of a volcanic subglacial lake. *ISME J.* *3*, 486–497. doi:10.1038/ismej.2008.124.
- Gaiero, J. R., McCall, C. a., Thompson, K. a., Day, N. J., Best, A. S., and Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *Am. J. Bot.* *100*, 1738–1750. doi:10.3732/ajb.1200572.
- Gibbons, S. M., and Gilbert, J. A. (2015). Microbial diversity — exploration of natural ecosystems and microbiomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *35*, 66–72. doi:10.1016/j.gde.2015.10.003.
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., and Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* *119*, 329–339.
- Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environ. Microbiol.* *9*, 1613–1631. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x.
- Gordon, A. S., and Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic

- acid. *Plant Physiol.* 26, 192–195. doi:10.1104/pp.26.1.192.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D., and Edwards, A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30, 369–378. doi:10.1016/S0038-0717(97)00124-7.
- Guzmán, U., Arias, S., and Dávila, P. (2007). *Catálogo de autoridades taxónomicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) mexicanas*. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021.
- Haichar, F. el Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J. I., Prosser, J. I., Balesdent, J., et al. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2, 1221–1230. doi:10.1038/ismej.2008.80.
- Haque, M. A., Lee, J. H., and Cho, K. M. (2015). Endophytic bacterial diversity in Korean *kimchi* made of Chinese cabbage leaves and their antimicrobial activity against pathogens. *Food Control* 56, 24–33. doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.006.
- Hardoim, P. R., Andreote, F. D., Reinhold-Hurek, B., Sessitsch, A., van Overbeek, L. S., and van Elsas, J. D. (2011). Rice root-associated bacteria: Insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77, 154–164. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01092.x.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., et al. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 293–320. doi:10.1128/MMBR.00050-14.
- Hardy, R. W., Holsten, R. D., Jackson, E. K., and Burns, R. C. (1968). The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43, 1185–1207.
- Herman, R. P., Provencio, K. R., Herrera-matos, J., and Torrez, R. J. (1995). Resource islands predict the distribution of heterotrophic bacteria in chihuahuan desert soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1816–1821.
- Hernández-Hernández, T., Brown, J. W., Schlumpberger, B. O., Eguiarte, L. E., and Magallón, S. (2014). Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytol.* 202, 1382–1397. doi:10.1111/nph.12752.
- Hill, M. O. (1973). Diversity and Evenness: a unifying notation and its consequences. *Soc. Ecol.* 54, 427–432.
- Hilton, S., Bennett, A. J., Keane, G., Bending, G. D., Chandler, D., Stobart, R., et al. (2013). Impact of shortened crop rotation of oilseed rape on soil and rhizosphere microbial diversity in relation to yield decline. *PLoS One* 8, e59859. doi:10.1371/journal.pone.0059859.
- Hooper, D. U., Adair, E. C., Cardinale, B. J., Byrnes, J. E. K., Hungate, B. A., Matulich, K. L., et al. (2012). A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* 486, 105–108. doi:10.1038/nature11118.
- Hunter, P. J., Hand, P., Pink, D., Whipps, J. M., and Bending, G. D. (2010). Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca*

- species) phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8117–8125. doi:10.1128/AEM.01321-10.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., and Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
- Ikeda, S., Okubo, T., Anda, M., Nakashita, H., Yasuda, M., Sato, S., et al. (2010). Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: Plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51, 1398–1410. doi:10.1093/pcp/pcq119.
- Jansa, J., and Angue, M. A. (2010). Soil Biology and Agriculture in the Tropics. *Agriculture* 21, 81–107. doi:10.1007/978-3-642-05076-3.
- Jimenez-Guerrero, I., Cubo, M. T., Perez-Montano, F., Ldpez-Baena, F. J., Guash-Vidal, B., Ollero, F. J., et al. (2013). “Bacterial protein secretion systems: implications in beneficial associations with plants,” in *Beneficial Plant-microbial Interactions: Ecology and Applications*, eds. M. B. Rodelas González and J. Gonzalez-López (Granada Spain: CRC press), 183–213.
- Jin, H., Yang, X. Y., Yan, Z. Q., Liu, Q., Li, X. Z., Chen, J. X., et al. (2014). Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 376–385. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.001.
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., Da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., et al. (2013a). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol. Res.* 168, 183–191. doi:10.1016/j.micres.2012.12.002.
- Kavamura, V. N., Taketani, R. G., Lançon, M. D., Andreote, F. D., Mendes, R., and Soares de Melo, I. (2013b). Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. *PLoS One* 8, e73606. doi:10.1371/journal.pone.0073606.
- Kembel, S. W., O’Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J., and Green, J. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 1–6. doi:10.1073/pnas.1216057111.
- Khidir, H. H., Eudy, D. M., Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., and Sinsabaugh, R. L. (2010). A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *J. Arid Environ.* 74, 35–42. doi:10.1016/j.jaridenv.2009.07.014.
- Kindt, R., and Coe, R. (2005). *Tree diversity analysis*. Nairobi, Kenya: World Agroforestry Centre.
- Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., and Maier, U. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. *BMC Evol. Biol.* 7, 55. doi:10.1186/1471-2148-7-55.
- Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E. M., and Berg, G. (2011). Desert farming benefits from microbial potential in arid soils and promotes diversity and plant health. *PLoS One* 6, e24452. doi:10.1371/journal.pone.0024452.
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *ISME J.* 3, 1223–1230. doi:10.1038/ismej.2009.88.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B., and Hinsinger, P. (2009). Plant-microbe-soil

- interactions in the rhizosphere: An evolutionary perspective. *Plant Soil* 321, 83–115. doi:10.1007/s11104-009-0042-x.
- Lançon, M. D., Taketani, R. G., Kavamura, V. N., and de Melo, I. S. (2013). Microbial community biogeographic patterns in the rhizosphere of two Brazilian semi-arid leguminous trees. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1233–1241. doi:10.1007/s11274-013-1286-4.
- Lane, J. D., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1986). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6955–6959.
- Lebeis, S. L. (2014). The potential for give and take in plant – microbiome relationships. *Front. Plant Sci.* 5, 1–6. doi:10.3389/fpls.2014.00287.
- Li, W., and Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658–1659. doi:10.1093/bioinformatics/btl158.
- Lindow, S. E., and Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1875–1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875.
- Loera, T. M., Sánchez Yáñez, J. M., and Peña Cabriales, J. J. (1996). Acetylene reduction activity on the root of cactaceous plants. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 38, 7–15. doi:10.1007/BF02371199.
- Lopes, M. A., Takasaki, K., Bostwick, D. E., Helentjaris, T., and Larkins, B. A. (1995). Identification of two opaque modifier loci Quality Protein Maize. *Mol. Gen. Genet.* 247, 603–613.
- Lopez, B. R., Bashan, Y., and Bacilio, M. (2011). Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Arch. Microbiol.* 193, 527–541. doi:10.1007/s00203-011-0695-8.
- De los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G. C., Miranda-Salcedo, M. A., and Peña-Cabriales, J. J. (2012). *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 2615–2623. doi:10.1007/s11274-012-1071-9.
- Lottmann, J., O’Callaghan, M., Baird, D., and Walter, C. (2010). Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of field-grown genetically modified pine trees (*Pinus radiata* D.). *Environ. Biosafety Res.* 9, 25–40. doi:10.1051/ebr/2010007.
- Lowe, T., and Eddy, S. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955–64.
- Lukashin, A. V., and Borodovsky, M. (1998). GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* 26, 1107–15. doi:10.1093/nar/26.4.1107.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes Herreras, S., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., et al. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488, 86–90. doi:10.1038/nature11237.
- Lundberg, D. S., Yourstone, S., Mieczkowski, P., Jones, C. D., and Dangl, J. L. (2013). Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 999–1002. doi:10.1038/nmeth.2634.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2004). *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed., ed. I. Capella Madrid: Pearson educación, S.A.
- Magoč, T., and Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short

- reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. doi:10.1093/bioinformatics/btr507.
- Magurran, A. E. (1988). *Diversidad ecológica y su medición*. Barcelona: Ediciones Vedra.
- Maignien, L., DeForce, E. A., Chafee, M. E., Eren, M. A., and Simmons, S. L. (2014). Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio* 5, 1–10. doi:10.1128/mBio.00682-13.
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J. B., and Cowan, D. A. (2015). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 203–221. doi:10.1093/femsre/fuu011.
- Makhalanyane, T. P., Valverde, A., Gunnigle, E., Frossard, A., Ramond, J.-B., and Cowan, D. A. (2013). Microbial ecology of hot desert edaphic systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 203–221.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., et al. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *PLoS One* 7, e48479. doi:10.1371/journal.pone.0048479.
- Martin, K. J., and Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5, 28. doi:10.1186/1471-2180-5-28.
- Martiny, A. C., Treseder, K., and Pusch, G. (2013). Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. *ISME J.* 7, 830–838. doi:10.1038/ismej.2012.160.
- Masella, A. P., Bartram, A. K., Truszkowski, J. M., Brown, D. G., and Neufeld, J. D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* 13, 31. doi:10.1186/1471-2105-13-31.
- Massimo, N. C., Nandi Devan, M. M., Arendt, K. R., Wilch, M. H., Riddle, J. M., Furr, S. H., et al. (2015). Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. *Microb. Ecol.* 70, 61–76. doi:10.1007/s00248-014-0563-6.
- McGinnies, W. (1979). “Arid land ecosystems, volume I,” in *General description of desert areas*, eds. D. W. Goodall and R. Perry (Cambridge, UK: Cambridge University Press), 5–20.
- McLellan, C. a, Turbyville, T. J., Wijeratne, E. M. K., Kerschen, A., Vierling, E., Queitsch, C., et al. (2007). A rhizosphere fungus enhances *Arabidopsis* thermotolerance through production of an HSP90 inhibitor. *Plant Physiol.* 145, 174–182. doi:10.1104/pp.107.101808.
- Medina, M., and Sachs, J. L. (2010). Symbiont genomics, our new tangled bank. *Genomics* 95, 129–137. doi:10.1016/j.ygeno.2009.12.004.
- Mendes, L. W., Kuramae, E. E., Navarrete, A. A., van Veen, J. A., and Tsai, S. M. (2014). Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *ISME J.* 8, 1577–1587. doi:10.1038/ismej.2014.17.
- Mendes, L. W., Tsai, S. M., Navarrete, A. a., de Hollander, M., van Veen, J. a., and Kuramae, E. E. (2015). Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microb. Ecol.* 70, 255–265. doi:10.1007/s00248-014-0559-2.
- Meyer, J. B., Frapolli, M., Keel, C., and Maurhofer, M. (2011). Pyrroloquinoline quinone biosynthesis gene *pqqC*, a novel molecular marker for studying the

- phylogeny and diversity of phosphate-solubilizing pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7345–7354.
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., and Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *J. Exp. Bot.* 60, 1729–1742. doi:10.1093/jxb/erp053.
- Michelsen, C. F., and Stougaard, P. (2012). Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. *Can. J. Microbiol.* 58, 381–390. doi:10.1139/w2012-004.
- Müller, H., Berg, C., Landa, B. B., Auerbach, A., Moissl-Eichinger, C., and Berg, G. (2015). Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus antagonists* colonize Mediterranean olive trees. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00138.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270. doi:10.1016/S0378-1097(98)00555-2.
- Nelson, E. B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the Spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 271–309. doi:10.1146/annurev.phyto.42.121603.131041.
- Nobel, P. S. (2003). *Environmental biology of Agaves and Cacti*. first. Cambridge: Cambridge University Press.
- Nobel, P. S. (2010). *Desert Wisdom/Agaves and Cacti: CO₂, water, climate change*. first. New York, NY and Bloomington, IN: iUniverse, Inc.
- Noguchi, H., Taniguchi, T., and Itoh, T. (2008). Meta gene annotator: Detecting species-specific patterns of ribosomal binding site for precise gene prediction in anonymous prokaryotic and phage genomes. *DNA Res.* 15, 387–396. doi:10.1093/dnares/dsn027.
- Nunes da Rocha, U., Cadillo-Quiroz, H., Karaoz, U., Rajeev, L., Klitgord, N., Dunn, S., et al. (2015). Isolation of a significant fraction of non-phototroph diversity from a desert Biological Soil Crust. *Front. Microbiol.* 6, 227. doi:10.3389/fmicb.2015.00277.
- Odum, E. P. (2004). *Fundamentals of Ecology*. 5th ed. Belmont, California: Thomson Brooks/Cole.
- Oh, Y. M., Kim, M., Lee-Cruz, L., Lai-Hoe, A., Go, R., Ainuddin, N., et al. (2012). Distinctive bacterial communities in the rhizoplane of four tropical tree species. *Microb. Ecol.* 64, 1018–1027. doi:10.1007/s00248-012-0082-2.
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G. L., Solymos, P., et al. (2008). Community Ecology Package. 190. Available at: <http://vegan.r-forge.r-project.org/>.
- Omoregie, E. O., Omoregie, E. O., Crumbliss, L. L., Crumbliss, L. L., Bebout, B. M., Bebout, B. M., et al. (2004). Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp. and *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Society* 70, 2119–2128. doi:10.1128/AEM.70.4.2119.
- Pace, N. R. (2006). Time for a change. *Nature* 441, 289. doi:10.1038/441289a.
- Park, H. S., and Jun, C. H. (2009). A simple and fast algorithm for K-medoids clustering. *Expert Syst. Appl.* 36, 3336–3341. doi:10.1016/j.eswa.2008.01.039.

- Partida-Martínez, L. P., and Heil, M. (2011). The Microbe-Free Plant: Fact or Artifact? *Front. Plant Sci.* 2, 1–16. doi:10.3389/fpls.2011.00100.
- Paulo, E. M., Boffo, E. F., Branco, A., Valente, A. M. M. P., Melo, I. S., Ferreira, A. G., et al. (2012). Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 Strain. *Ann. Brazilian Acad. Sci.* 84, 495–507. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652012000200018.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., and McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 1633–1644. doi:10.5194/hess-11-1633-2007, 2007.
- Pereg, L. L., Lipkin, Y., and Sar, N. (1994). Different niches of the halophila-stipulacea seagrass bed harbor distinct populations of nitrogen-fixing bacteria. *Mar. Biol.* 119, 327–333.
- Pérez-González, S. (1992). *Myrtillocactus geometrizans*: A potential fruit crop for the semiarid regions of Central Mexico. *Hortscience* 20, 80.
- Pimienta-Barrios, E., Gonzalez Del Castillo-Aranda, M. E., Muñoz-Urias, A., and Nobel, P. S. (2003). Effects of benomyl and drought on the mycorrhizal development and daily net CO₂ uptake of a wild platyopuntia in a rocky semi-arid environment. *Ann. Bot.* 92, 239–245. doi:10.1093/aob/mcg133.
- Pointing, S. B., and Belnap, J. (2012). Microbial colonization and controls in dryland systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 551–562. doi:10.1038/nrmicro2831.
- Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., Lipinski, K., and Sinsabaugh, R. L. (2011). Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia* 103, 10–21. doi:10.3852/09-297.
- Porras-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R. L., Odenbach, K. J., Lowrey, T., and Natvig, D. O. (2008). Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2805–2813. doi:10.1128/AEM.02769-07.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., and Lebsky, V. K. (2004a). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biol.* 6, 629–642. doi:10.1055/s-2004-821100.
- Puente, M. E., Li, C. Y., and Bashan, Y. (2004b). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol.* 6, 643–650. doi:10.1055/s-2004-821101.
- Puente, M. E., Li, C. Y., and Bashan, Y. (2009a). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66, 402–408. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.04.007.
- Puente, M. E., Li, C. Y., and Bashan, Y. (2009b). Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ. Exp. Bot.* 66, 389–401. doi:10.1016/j.envexpbot.2009.04.010.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.
- Quinn, G. P., and Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for*

- biologists*. First. Cambridge University Press.
- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Nieto, J. J., Hidalgo-García, A., Iglesias-Guerra, F., Delgado, M. J., et al. (2012). Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiol.* 12, 207. doi:10.1186/1471-2180-12-207.
- Reinhold-Hurek, B., Bünker, W., Burbano, C. S., Sabale, M., and Hurek, T. (2015). Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 403–424. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102342.
- Rhoden, S. A., Garcia, A., Azevedo, J. L., and Pamphile, J. A. (2015). Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A . Juss . (Meliaceae). *Genet. Mol. Res.* 14, 1515–1525.
- Rodriguez Estrada, A. E., Jonkersb, W., Kistlerc, H. C., and May, G. (2012). Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genet. Biol.* 49, 578–587. doi:10.1016/j.fgb.2012.05.001.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., and Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.* 182, 314–330. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- Rosenberg, E., and Zilber-Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and development: The hologenome concept. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* 93, 56–66. doi:10.1002/bdrc.20196.
- Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J. Comput. Appl. Math.* 20, 53–65. doi:10.1016/0377-0427(87)90125-7.
- Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., Studer, M., and Hornik, K. (2015). cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions. R package version 2.0.3. 79.
- Rykiel, E. J. (1985). Towards a definition of ecological disturbance. *Aust. J. Ecol.* 10, 361–365. doi:10.1111/j.1442-9993.1985.tb00897.x.
- Salazar, J. R., Martínez-Vazquez, M., Cespedes, C. L., Ramírez-Apan, T., Nieto-Camacho, A., Rodríguez-Silverio, J., et al. (2011). Anti-inflammatory and cytotoxic activities of chichipegenin, peniocerol, and macdougallin isolated from *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff.) Con. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 66C, 24–30. doi:10.5560/ZNC.2011.66c0024.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., and Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 635–648. doi:10.1007/s10295-007-0240-6.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J. A., and Serna-Saldivar, S. O. (2011). Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7054–7061. doi:10.1021/jf200944y.
- Sapkota, R., Knorr, K., Jørgensen, L. N., O’Hanlon, K. A., and Nicolaisen, M. (2015). Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome. *New Phytol.* 4, 1134–44. doi:10.1111/nph.13418.
- Schlaeppli, K., Dombrowski, N., Oter, R. G., Ver Loren van Themaat, E., and Schulze-Lefert, P. (2014). Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 111, 585–92. doi:10.1073/pnas.1321597111.
- Schoch, C. L., Seifert, K. a., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. a., et al. (2012). From the Cover: Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Sessitsch, a., Hardoim, P., Döring, J., Weilharter, a., Krause, a., Woyke, T., et al. (2012). Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 28–36. doi:10.1094/MPMI-08-11-0204.
- Shade, A., and Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* 14, 4–12. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., et al. (2012). Fundamentals of Microbial Community Resistance and Resilience. *Front. Microbiol.* 3, Article 417. doi:10.3389/fmicb.2012.00417.
- Shah, I. M., Laaberki, M.-H., Popham, D. L., and Dworkin, J. (2013). A Eukaryotic-like Ser/Thr Kinase Signals Bacteria to Exit Dormancy in Response to Peptidoglycan Fragments. *Innate.* 135, 486–496. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.
- Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z. K., Gunter, L., Labbé, J., et al. (2013). A Multifactor Analysis of Fungal and Bacterial Community Structure in the Root Microbiome of Mature *Populus deltoides* Trees. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0076382.
- Singh, B., Dawson, L. A., Macdonald, C. A., and Buckland, S. M. (2009). Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Appl. Soil Ecol.* 41, 239–248. doi:10.1016/j.apsoil.2008.10.003.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846–849. doi:10.1099/00207713-44-4-846.
- Starkey, R. (1938). Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil. VI. Microscopic examination of the rhizosphere. *Soil Sci.* 45, 207–49.
- Sun, Y., Wang, Q., Lu, X., Okane, I., and Kakishima, M. (2012). Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. *Mycol. Prog.* 11, 781–790. doi:10.1007/s11557-011-0790-x.
- Suryanarayanan, T. S., Wittlinger, S. K., and Faeth, S. H. (2005). Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycol. Res.* 109, 635–639. doi:10.1017/S0953756205002753.
- Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., and Nishijima, M. (2014). Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. *PLoS One* 9, e105592. doi:10.1371/journal.pone.0105592.
- Teather, R. M., and Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777–780.
- Torres-Cortés, G., Millán, V., Fernández-González, A. J., Aguirre-Garrido, J. F.,

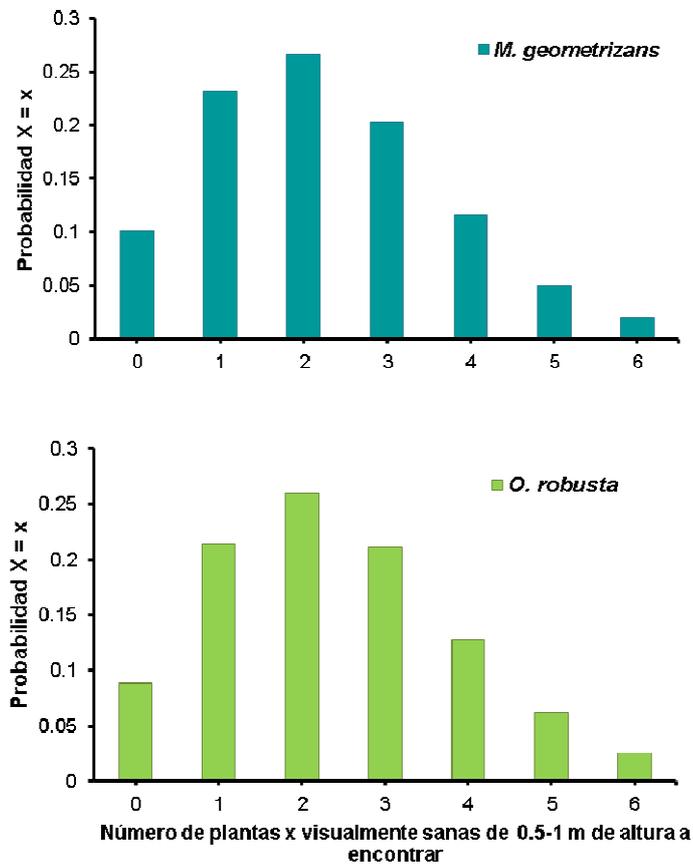
- Ramírez-Saad, H. C., Fernández-López, M., et al. (2012). Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. *Plant Soil* 357, 275–288. doi:10.1007/s11104-012-1152-4.
- Tóthmérész, B. (1998). On the characterization of scale-dependent diversity. *Abstr. Bot.* 22, 149–156.
- Trapp, M. A., Kai, M., Mithöfer, A., and Rodrigues-Filho, E. (2014). Phytochemistry antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. *Phytochemistry* 110, 72–82. doi:10.1016/j.phytochem.2014.11.005.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., and Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: Genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 40–50. doi:10.1111/1758-2229.12181.
- Turbyville, T. J., Wijeratne, E. M. K., Liu, M. X., Burns, A. M., Seliga, C. J., Luevano, L. a., et al. (2006). Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: Isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *J. Nat. Prod.* 69, 178–184. doi:10.1021/np058095b.
- Turner, T. R., James, E. K., and Poole, P. S. (2013a). The plant microbiome. *Genome Biol.* 14, 209. doi:10.1016/B978-0-12-417163-3.00011-1.
- Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., et al. (2013b). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J.* 7, 2248–2258. doi:10.1038/ismej.2013.119.
- Valverde, A., Makhalanyane, T. P., Seely, M., and Cowan, D. A. (2015). Cyanobacteria drive community composition and functionality in rock-soil interface communities. *Mol. Ecol.* 24, 812–821. doi:10.1111/mec.13068.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407–438. doi:10.1007/s12088-007-0022-x.
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., and Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* 206, 1196–1206. doi:10.1111/nph.13312.
- Venables, W. N., and Ripley, B. D. (2002). MASS: modern applied statistics with S. *Issues of Accuracy and Scale*, 868. doi:10.1198/tech.2003.s33.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., and Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5315–5321. doi:10.1021/jf0009293.
- Vorholt, J. A. (2012). Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840. doi:10.1038/nrmicro2910.
- Wagg, C., Bender, S., Widmer, F., and van der Heijden, M. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5266–5270.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., and Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5261–5267. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, X., Van Nostrand, J. D., Deng, Y., Lü, X., Wang, C., Zhou, J., et al. (2015).

- Scale-dependent effects of climate and geographic distance on bacterial diversity patterns across northern China's grasslands. *FEMS Microbiol. Ecol.*, fiv133. doi:10.1093/femsec/fiv133.
- Weinert, N., Meincke, R., Gottwald, C., Heuer, H., Schloter, M., Berg, G., et al. (2010). Bacterial diversity on the surface of potato tubers in soil and the influence of the plant genotype. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 114–123. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00936.x.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D., and Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1744–1755. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03906.x.
- Wieland, G., Neumann, R., and Backhaus, H. (2001). Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5849–5854. doi:10.1128/AEM.67.12.5849.
- Wittebolle, L., Massimo, M., Clement, L., Balloi, A., Daffonchio, D., Heylen, K., et al. (2009). Initial community evenness favours functionality under selective stress. *Nature* 458, 623–626.
- Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., and Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3889–3894. doi:10.1073/pnas.051633898.
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-marcell, J., Lax, S., et al. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* 6, 1–10. doi:10.1128/mBio.02527-14.Editor.
- Zhang, B., Li, R., Xiao, P., Su, Y., and Zhang, Y. (2015). Cyanobacterial composition and spatial distribution based on pyrosequencing data in the Gurbantunggut Desert, Northwestern China. *J. Basic Microbiol.* 55, 1–13. doi:10.1002/jobm.201500226.
- Zilber-Rosenberg, I., and Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 723–735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

11. Apéndices

Apéndice I. Tipo de distribución de las plantas de *M. geometrizans* y *O. robusta* en los sitios de muestreo.

La distribución de probabilidad discreta de encontrar un número de plantas visualmente sanas con altura de 0.5-1 m (variable aleatoria de Poisson), con valores de $\lambda = 2.29$ y $\lambda = 2.46$ para *M. geometrizans* y *O. robusta*, respectivamente.



Apéndice II. Características de las plantas colectadas y localización geográfica.

ID	Altura (cm)	Diámetro (cm)	H/D	Plantas vecinas	Día de colección	Estación	Sitio	Norte	Este	Altitud (masl)
Mg _{M 1-1}	71	32	2.22	Mg, As	04.06.12	Secas	Ma	21°05.403	100°17.559	2245
Mg _{M 1-2}	90	65	1.38	Oi	04.06.12	Secas	Ma	21°05.219	100°17.737	2185
Mg _{M 1-3}	74	69	1.07	Mg, As	04.06.12	Secas	Ma	21°04.097	100°16.100	2165
Mg _{Sf 1-1}	82	79	1.04		30.05.12	Secas	SF	21°38.528	101°03.409	1894
Mg _{Sf 1-2}	102	121	0.84	As, <i>Prosopis</i> sp.	30.05.12	Secas	SF	21°39.111	101°01.325	1887
Mg _{Sf 1-3}	70	60	1.17	<i>Prosopis</i> sp.	30.05.12	Secas	SF	21°40.212	101°02.719	1881
Mg _{M 2-1}	89	82	1.08		10.10.12	Lluvias	Ma	21°05.194	100°17.716	2174
Mg _{M 2-2}	92	89	1.03	As, <i>Opuntia</i> sp.	10.10.12	Lluvias	Ma	21°04.111	100°16.115	2173
Mg _{M 2-3}	73	59	1.24		10.10.12	Lluvias	Ma	21°04.113	100°16.111	2172
Mg _{Sf 2-1}	103	79	1.30		12.10.12	Lluvias	SF	21°40.280	101°02.667	1875
Mg _{Sf 2-2}	67	62	1.08		12.10.12	Lluvias	SF	21°40.266	101°02.729	1879
Mg _{Sf 2-3}	77	98	0.79		12.10.12	Lluvias	SF	21°38.568	101°03.275	1885
Or _{M 1-1}	63	72	0.88		04.06.12	Secas	Ma	21°05.398	100°17.541	2241
Or _{M 1-2}	46	65	0.71		04.06.12	Secas	Ma	21°05.269	100°17.662	2203
Or _{M 1-3}	79	87	0.91	As, Oi	04.06.12	Secas	Ma	21°04.116	100°16.107	2166
Or _{Sf 1-1}	64	72	0.89	Or	30.05.12	Secas	SF	21°38.470	101°03.437	1894
Or _{Sf 1-2}	73	87	0.84	Or	30.05.12	Secas	SF	21°40.223	101°02.681	1877
Or _{Sf 1-3}	0.6	48	1.25	<i>Mamillaria</i> sp.	30.05.12	Secas	SF	21°40.198	101°02.730	1879
Or _{M 2-1}	66	68	0.97		10.10.12	Lluvias	Ma	21°05.192	100°17.715	2176
Or _{M 2-2}	83	69	1.20		10.10.12	Lluvias	Ma	21°04.075	100°16.055	2176
Or _{M 2-3}	94	106	0.89		10.10.12	Lluvias	Ma	21°04.062	100°16.048	2181
Or _{Sf 2-1}	82	98	0.84		12.10.12	Lluvias	SF	21°10.202	101°02.652	1877
Or _{Sf 2-2}	59	74	0.80		12.10.12	Lluvias	SF	21°40.194	101°02.754	1880
Or _{Sf 2-3}	65	68	0.96		12.10.12	Lluvias	SF	21°38.526	101°03.225	1888
Mg _{M 3-1}	64	79	1.19	Oi, <i>Mamillaria</i> sp.	27.05.13	Secas	Ma	21°05.281	100°17.731	2170
Mg _{M 3-2}	61	47	1.30		27.05.13	Secas	Ma	21°05.182	100°17.754	2181
Mg _{M 3-3}	89	78	1.14	<i>Opuntia</i> sp.	27.05.13	Secas	Ma	21°04.128	100°16.645	2161

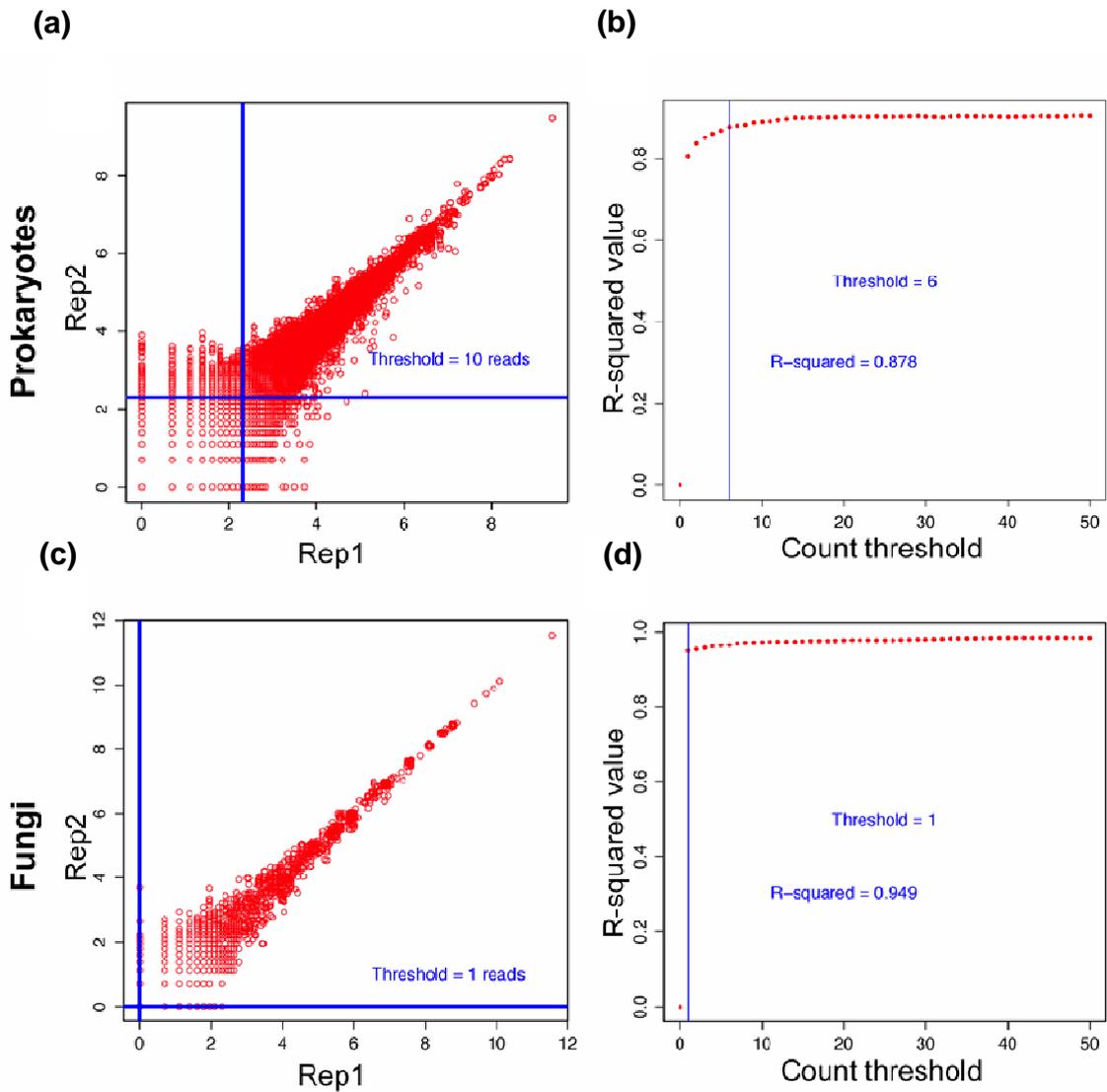
Mg _{Sf 3-1}	55	54	1.02	Oi, culebrillas	29.05.13	Secas	SF	21°39.955	101°02.793	1885
Mg _{Sf 3-2}	76	58	1.31	As	29.05.13	Secas	SF	21°39.975	101°02.870	1892
Mg _{Sf 3-3}	86	88	0.98	<i>Opuntia</i> sp.	29.05.13	Secas	SF	21°38.577	101°03.356	1888
Mg _{M 4-1}	73	44	1.66		30.09.13	Lluvias	Ma	21°05.198	100°17.700	2180
Mg _{M 4-2}	83	72	1.15	As, <i>Opuntia</i> sp.	30.09.13	Lluvias	Ma	21°05.219	100°17.724	2177
Mg _{M 4-3}	90	79	1.14		30.09.13	Lluvias	Ma	21°04.100	100°16.119	2174
Mg _{Sf 4-1}	68	83	0.82		02.10.13	Lluvias	SF	21°40.216	101°02.684	1874
Mg _{Sf 4-2}	64	78	0.82		02.10.13	Lluvias	SF	21°40.225	101°02.755	1877
Mg _{Sf 4-3}	53	43	1.23		02.10.13	Lluvias	SF	21°38.524	101°03.374	1889
Or _{M 3-1}	71	102	0.70	<i>Opuntia</i> sp.	27.05.13	Secas	Ma	21°05.373	100°17.651	2209
Or _{M 3-2}	51	79	0.65		27.05.13	Secas	Ma	21°05.182	100°17.754	2181
Or _{M 3-3}	59	53	1.11		27.05.13	Secas	Ma	21°04.128	100°16.108	2161
Or _{Sf 3-1}	73	80	0.91		29.05.13	Secas	SF	21°39.953	101°02.799	1885
Or _{Sf 3-2}	72	73	0.99		29.05.13	Secas	SF	21°40.067	101°02.908	1894
Or _{Sf 3-3}	87	98	0.89		29.05.13	Secas	SF	21°38.562	101°03.336	1888
Or _{M 4-1}	91	108	0.84		30.05.13	Lluvias	Ma	21°05.178	100°17.707	2173
Or _{M 4-2}	54	59	0.92	As	30.05.13	Lluvias	Ma	21°05.207	100°17.751	2171
Or _{M 4-3}	88	102	0.86		30.05.13	Lluvias	Ma	21°04.091	100°16.139	2180
Or _{Sf 4-1}	88	102	0.86		02.10.13	Lluvias	SF	21°40.252	101°02.666	1874
Or _{Sf 4-2}	91	108	0.84	As	02.10.13	Lluvias	SF	21°40.236	101°02.680	1873
Or _{Sf 4-3}	54	59	0.92		02.10.13	Lluvias	SF	21°38.549	101°03.330	1883

Material colectado en campo:



Apéndice III. Prueba de reproducibilidad técnica de secuenciación etiquetada de las muestras colectadas en el 2012.

Umbral de corte establecidos para la reproducibilidad técnica de los OTUs de los conjuntos de datos generados con ARNr 16S (a-b) e ITS2 (c-d). Esta imagen fue tomada de Coleman-Derr et al.,(2016).



Apéndice IV. Códigos diseñados para el paquete estadístico R.

Claves de etiquetas de las bases de datos: Especie.Sitio.Estacionalidad.Tipo de muestra (Ej. Mg.Ma.D.se)

Or: *O. robusta*

Ma: *El Magueyal*

Sf: San Felipe

D: estacionalidad de secas

R: estacionalidad de lluvias

s: muestra de suelo lejano

rzs: muestra de suelo cercano

rz: muestra de rizósfera

p: muestra de filósfera

re: muestra de endósfera de raíz

se: muestra de endósfera de tallo

Scripts para normalizar las bases de datos con los umbrales de reproducibilidad técnica y rarificación

#función measurable programada por Devin Coleman:

```
measurableOTUs = function(otu_table, numofcounts, numofsamples){
```

```
  otu_kept <- {}
```

```
  for (i in 1:dim(otu_table)[2]) {
```

```
    current_otu <- otu_table[,c(i)]
```

```
    if( sum(current_otu>numofcounts) > numofsamples) {
```

```
      otu_kept <- c(otu_kept, colnames(otu_table)[i])
```

```
    }
```

```
  }
```

```

otu_table_out <- otu_table[,colnames(otu_table) %in% otu_kept]
return(otu_table_out)
}

```

```
##### base measurable 16S Agaves-Cactus
```

```
base16S <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/ NOMBRE DEL ARCHIVO DE
ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

```
View(base16S)
```

```
T_base16S <- t(base16S)
```

```
T_base16S <-as.data.frame(T_base16S)
```

```
minreadcount=7
```

```
minsamplenumber=5
```

```
T_base16S_measurable <- measurableOTUs(T_base16S,minreadcount,minsamplenumber)
```

```
T_base16S_measurable <- T_base16S_measurable[,colSums(T_base16S_measurable)>0]
```

```
base16S_measurable <- t(T_base16S_measurable)
```

```
write.table (base16S_measurable, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/ NOMBRE DEL
ARCHIVO DE SALIDA.txt", col.names = T, row.names = T, quote=F,sep = "\t")
```

```
##### base measurable ITS agaves-cactus
```

```
baseITS <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE
ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

```
View(baseITS)
```

```
T_baseITS <- t(baseITS)
```

```
T_baseITS <-as.data.frame(T_baseITS)
```

```
minreadcount=2
```

```
minsamplenumber=5
```

```
T_baseITS_measurable <- measurableOTUs(T_baseITS,minreadcount,minsamplenumber)
```

```
T_baseITS_measureable <- T_baseITS_measureable[,colSums(T_baseITS_measureable)>0]
baseITS_measureable <- t(T_baseITS_measureable)
write.table (baseITS_measureable, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/ NOMBRE DEL
ARCHIVO DE SALIDA.txt", col.names = T, row.names = T, quote=F,sep = "\t")
```

```
#####Rarificar base measurable 16S
```

```
base16S <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/ NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt",
header=TRUE)
View(base16S)
T_base16S <- t(base16S)
T_base16S <-as.data.frame(T_base16S)
sort(rowSums(T_base16S))
T_base16S<- T_base16S[rowSums(T_base16S)>256,]
T_base16S_rare <- rrarefy(T_base16S,257)
write.table (T_base16S_rare , file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL
ARCHIVO DE SALIDA.txt", col.names = T, row.names = T, quote=F,sep = "\t")
```

```
#####Rarificar base measurable ITS
```

```
baseITS <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE
ENTRADA.txt", header=TRUE)
View(baseITS)
T_baseITS <- t(baseITS)
T_baseITS <-as.data.frame(T_baseITS)
sort(rowSums(T_baseITS))
T_baseITS<- T_baseITS[rowSums(T_baseITS)>348,]
T_baseITS_rare <- rrarefy(T_baseITS,349)
```

```
write.table (T_baseITS_rare , file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA.txt", col.names = T, row.names = T, quote=F,sep = "\t")
```

Script para calcular y graficar diagramas de Venn

```
#Cargar el paquete necesario:  
library(VennDiagram)
```

```
#Diagrama de Venn de dos conjuntos:
```

```
venn.plot <- draw.pairwise.venn(  
  area1 = VALOR,  
  area2 = VALOR,  
  cross.area = VALOR COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2,  
  category = c("NOMBRE ÁREA1", "NOMBRE ÁREA2"),  
  fill = c("COLOR ÁREA1", "COLOR ÁREA2"),  
  lty = "solid",  
  cex = 2,  
  cat.cex = 1.3,  
  cat.col = c("COLOR DEL NOMBRE ÁREA1", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA2"),  
  scaled = FALSE  
);  
grid.draw(venn.plot);
```

```
## diagrama de Venn de tres conjuntos:
```

```
venn.plot <- draw.triple.venn(  
  area1 = VALOR,
```

```

area2 = VALOR,
area3 = VALOR,
n12 = VALOR COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2,
n23 = VALOR COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA3,
n13 = VALOR COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA3,
n123 = VALOR COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA3,
category = c("NOMBRE ÁREA1", "NOMBRE ÁREA2", "NOMBRE ÁREA3"),
fill = c("COLOR ÁREA1", "COLOR ÁREA2", "COLOR ÁREA3"),
lty = "blank",
cex = 2,
cat.cex = 2,
cat.col = c("COLOR DEL NOMBRE ÁREA1", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA2", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA3")
)

```

#Diagrama de Venn de cinco conjuntos:

```

venn.plot <- draw.quintuple.venn(
  area1 = VALOR,
  area2 = VALOR,
  area3 = VALOR,
  area4 = VALOR,
  area5 = VALOR,
  n12 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2,
  n13 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA3,
  n14 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA4,
  n15 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA5,
  n23 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA3,
  n24 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA4,

```

n25 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA5,
n34 = COMBINACIÓN ÁREA3-ÁREA4,
n35 = COMBINACIÓN ÁREA3-ÁREA5,
n45 = COMBINACIÓN ÁREA4-ÁREA5,
n123 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA3,
n124 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA4,
n125 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA5,
n134 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA3-ÁREA4,
n135 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA3-ÁREA5,
n145 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA4-ÁREA5,
n234 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA3-ÁREA4,
n235 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA3-ÁREA5,
n245 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA4-ÁREA5,
n345 = COMBINACIÓN ÁREA3-ÁREA4-ÁREA5,
n1234 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA3-ÁREA4,
n1235 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA3-ÁREA5,
n1245 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA4-ÁREA5,
n1345 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA3-ÁREA4-ÁREA5,
n2345 = COMBINACIÓN ÁREA2-ÁREA3-ÁREA4-ÁREA5,
n12345 = COMBINACIÓN ÁREA1-ÁREA2-ÁREA3-ÁREA4-ÁREA5,
category = c("NOMBRE ÁREA1", "NOMBRE ÁREA2", "NOMBRE ÁREA3", "NOMBRE ÁREA4", "NOMBRE ÁREA5"),
fill = c("COLOR ÁREA1", "COLOR ÁREA2", "COLOR ÁREA3", "COLOR ÁREA4", "COLOR ÁREA5"),
cat.col = c("COLOR DEL NOMBRE ÁREA1", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA2", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA3",
"COLOR DEL NOMBRE ÁREA4", "COLOR DEL NOMBRE ÁREA5"),
cat.cex = 2,
margin = 0.05,
cex = c(1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 1.8, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1,

```
1.3, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1, 1.1, 1.1, 1.1, 1.1, 1.1, 1.8),  
ind = TRUE  
);
```

Script para sumar columnas dependiendo de la condición deseada y filas por linaje

#cargar las bases de datos a analizar:

```
base <- read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE  
ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

#adicionar una columna para depositar cada suma a realizar, por ejemplo sumar las columnas por factor de especie de Cactus:

```
base <- cbind(base, M.geometrizans=0)
```

```
base <- cbind(base, O.robusta=0)
```

#con expresiones regulares, sumar las columnas correspondientes dependiendo de la condición deseada, siguiendo el ejemplo anterior sumar todas las columnas de cada especie (Mg y Or):

```
base[base[, "Mg"]==0, "M.geometrizans"]= rowSums(base[, substr(colnames(base), 1, 3)=="Mg."])
```

```
base[base[, "Or"]==0, "O.robusta"]= rowSums(base[, substr(colnames(base), 1, 3)=="Or."])
```

#generar un archivo de salida:

```
write.table(Class, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE  
SALIDA.csv", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)
```

#sumar ahora las filas con mismo linaje especificando hasta que nivel taxonómico, por ejemplo sumar a nivel de clase:

#asignar el nivel de linaje a cada fila:

```
base$Consensus.lineage <- as.character(base$Consensus.lineage)
```

```

hasclase <- (sapply(strsplit(base$Consensus.lineage, split = ";"), length)==6)
base$clase <- "Dominio"
clase <- sapply(strsplit(x=base[hasclase,]$Consensus.lineage, split = ";"), "[",3)
base[hasclase,]$clase <- clase
base$clase <- sub(pattern = "c__", replacement = "", base$clase)

#generar una base nueva con los linajes únicos encontrados en la base de datos y adicionar columnas por factor de
especie de Cactus:
Class <- unique(base$clase)
Class <- as.data.frame(Class)
Class <- cbind(Class, Mg=0)
Class <- cbind(Class, Or=0)

#sumar para cada especie de Cactus las diferentes clases taxonómicas encontradas en la base de datos:
for(var in Class$Class) {

Class[Class$Class==var,"Mg"]=sum(base16S[base16S[, "clase"]==var,"M.geometrizzans"])
Class[Class$Class==var,"Or"]=sum(base16S[base16S[, "clase"]==var,"O.robusta"])

}

#generar un archivo de salida:
write.table(Class, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE
SALIDA.csv", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)

```

#NOTA: este script suma las filas con linajes iguales dependiendo del nivel taxonómico deseado, con la limitante de que aquellas filas con menos resolución taxonómica a la elegida, las asignará a una nueva categoría llamada Dominio. Las filas asignadas a Dominio fueron procesadas y asignadas manualmente con el máximo linaje presentado por cada una.

Script para estimar perfiles de entropía de Rényi

#Cargar el paquete necesario:

```
library (BiodiversityR)
```

#cargar las bases de datos a analizar:

```
base <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

#para no considerar la primera columna hasta la última columna, por ejemplo de la 2 a la 30:

```
datos <- base [c(2:30)]
```

#calcular la suma de cada fila:

```
range <- apply(datos, 1, sum)
```

#calcular la abundancia relativa de cada fila:

```
datosrelativos <- sweep (datos, 1, range, FUN ="/")
```

#aplicar la función para estimar los valores del perfil de entropía de Rényi:

```
diversidadrenyi <- renyiresult (datosrelativos1, method = "method", scales = c (0,0.25,0.5,1,2,4,8,Inf))
```

#generar un archivo de salida y graficar en Excel:

```
write.table(diversidadrenyi, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA.csv", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)
```

Script para calcular el Análisis de Similitud (AnoSim), PERMANOVA, NMDS y dendogramas

```
#Cargar los paquetes necesarios:
```

```
library (vegan)
```

```
library (gplots)
```

```
library (MASS)
```

```
#cargar las bases de datos a analizar sin linaje:
```

```
base <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

```
#transponer la base:
```

```
datos<-t(base)
```

```
#transformar los datos con distancia "log":
```

```
datostransformados <- decostand (datos, "log")
```

```
#calcular las distancias entre los datos con la distancia Bray-Curtis:
```

```
matrizdistancia <- vegdist (datostransformados, method = "bray")
```

```
#ajustar a un formato de matriz:
```

```
matriz <- as.matrix (matrizdistancia)
```

```
#####Para calcular el AnoSim seguimos los siguientes pasos:
```

```
#cargar un metadata con la información de cada muestra:  
metadata <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE  
ENTRADA.txt", header=TRUE)
```

```
#aplicar la función "anosim" para calcular AnoSim global:  
fit1 <- anosim(matrizdistancia, permutations = 999, grouping = metadata$FACTOR A EVALUAR, strata = NULL)  
#generar un archivo de salida:  
write.table(fit1, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE  
SALIDA.csv", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)
```

```
#aplicar la función "anosim" para calcular el AnoSim por interacción:  
fit2 <- anosim(matrizdistancia, permutations = 999, grouping = metadata$FACTOR A EVALUAR, strata =  
metadata$FACTOR A INTERACCIONAR)  
#generar un archivo de salida:  
write.table(fit2, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/Secuenciación/NOMBRE DEL ARCHIVO DE  
SALIDA.csv", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)
```

```
#####Para calcular el PERMANOVA seguir los siguientes pasos:  
#cargar un metadata con la información de cada muestra:  
metadata <-read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/DGGE/NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt",  
header=TRUE)  
#aplicar la función "adonis" para calcular el PERMANOVA global e interacciones:  
fit <- adonis (matrizdistancia ~ FACTOR A EVALUAR 1*FACTOR A EVALUAR 2*FACTOR A EVALUAR 3, data =  
metadata, permutations = 999)  
#generar un archivo de salida:  
write.table(fit, file = "C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/DGGE/NOMBRE DEL ARCHIVO DE SALIDA.csv",  
append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",", row.names = TRUE, col.names = TRUE)
```

```

#### Para graficar un NMDS:
#calcular los puntos en el gráfico de NMDS:
fit <- isoMDS (matriz, k=2)

#ajustar a un formato de dataframe:
fit1 <- as.data.frame(fit)

#adicionar una columna para especificar la clave de símbolo para cada punto en el gráfico:
fit1 <- cbind(fit1, pch=0)

#con expresiones regulares, dependiendo de la etiqueta de cada punto, asignar la clase de símbolo elegido según la
condición a representar en el gráfico, por ejemplo asignar el símbolo de triangulo relleno (17) a la endósfera del tallo de
M. geometrizans de El Magueyal en la estacionalidad de Secas:
fit1[fit1[,"pch"]==0,"pch"]=substr(rownames(fit1)[fit1[,'pch']==0],1,10)=="Mg.Ma.D.se"
fit1[fit1[,"pch"]==1,"pch"]= 17
#graficar los puntos agrupados en N (por ejemplo en 4) clústeres con algoritmo k-medoides con distancia Bray-Curtis:
agrupamiento <- pam(fit1[,1:2], 4, medoids=4:1, metric="bray", diss=F)
plot(fit1[,1:2],col=agrupamiento$cluster, type="p", main="NOMBRE DEL NMDS", xlab="coordenada 1", ylab="coordenada
2", pch=fit1$'pch', lty=2, cex=1.2)

##calcular la prueba de bondad Silhouette de los puntos agrupados en los clústeres anteriores:
sil <- silhouette (agrupamiento)
plot(sil, col=1:4)

####Para graficar un dendograma de similitud:
#dendograma con método "ward":

```

```
dendoward <- hclust(matrizdistancia, method="ward", members=NULL)
plot(dendoward, hang=0.1, frame.plot=FALSE, ann=T)
#para agrupar las ramas en un número de clúster determinado, por ejemplo en 5 clústeres y señalarlos en color rojo:
groups <- cutree(dendoward, k=5)
rect.hclust(dendoward, k=5, border="red")
```

Script para extraer los OTUs correspondientes de alguna intersección de un diagrama de Venn

#cargar las bases de datos a analizar:

```
base <- read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt",
header=TRUE)
```

#utilizar el script de sumar las filas dependiendo del factor deseado, por ejemplo sumar por especie de Cactus

#especificar la intersección a extraer con las columnas de la suma anterior considerando de la fila uno a la n deseada incluyendo el linaje, por ejemplo los OTUs globales compartidos entre *M. geometrizans* (Mg) y *O. robusta* (Or) de la fila uno a la 43:

```
Mg_Or <- base[base$Mg >= 1 & base$Or >= 1, 1:43]
```

#utilizar el script de sumar columnas a nivel de linaje para plasmar los linajes presentes en los OTUs

Graficar un mapa de calor (heatmap)

#Cargar los paquetes necesarios:

```
library (gplots)
library (RColorBrewer)
```

#Cargar la base a graficar:

```
base <- read.table("C:/Users/CITLALI/Documents/Rdocumentos/NOMBRE DEL ARCHIVO DE ENTRADA.txt",  
header=TRUE)
```

```
# asignar un color a cada columna de la base para plasmarlo en el gráfico:
```

```
Var1 <- c("red","red","red","purple","purple","purple","purple","blue","blue","blue")  
data.matrix(cbind(colnames(base),Var1))
```

```
#asignar una escala de color al mapa de color, ejemplo escala de azul a amarillo (de menor a mayor):
```

```
scaleblueyellow <- colorRampPalette(c("blue", "yellow"),space = "rgb")(100)
```

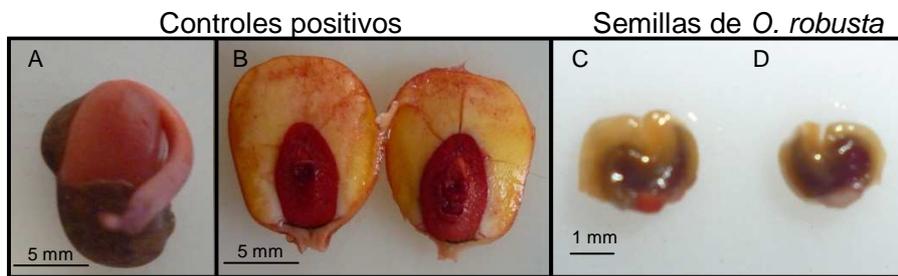
```
#graficar el mapa de calor:
```

```
heatmap.2(as.matrix(base), dendrogram="row", col=scaleblueyellow, ColSideColors=Var1, margins=c(6,4), trace="none",  
density.info="none", xlab="", ylab="", main="", lhei=c(2,8))
```

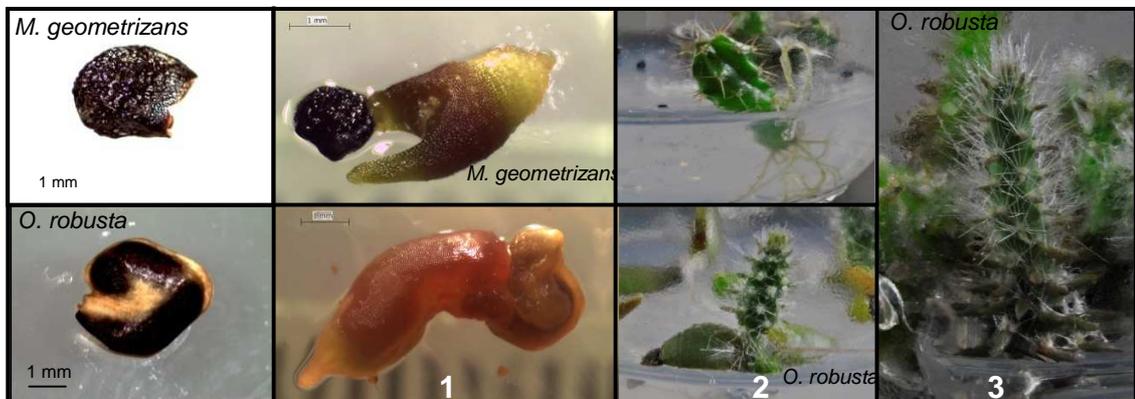
Apéndice V. Proceso de germinación y propagación *in vitro* de *M. geometrizans* y *O. robusta* a partir de semillas colectadas en campo.

Ensayo de viabilidad de las semillas de *O. robusta* (a) A: Frijol Lima; B: Grano de maíz; C: Semilla viable; D: Semilla no viable. Proceso de propagación *in vitro* de *O. robusta* y de *M. geometrizans* a partir de semilla (b): 1) germinación de las semillas en medio LS (2.25 g Benciladenina y 1 mg Indolbutírico), 2) desarrollo del tallo que se extiende desde la inserción de los cotiledones, 3) diferenciación del tallo.

(a)



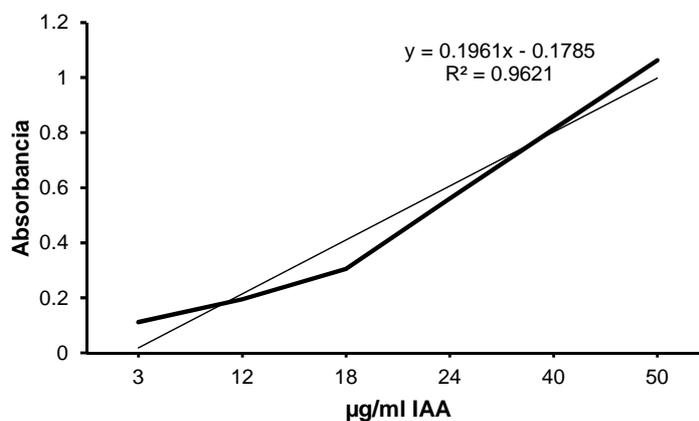
(b)



Apéndice VI. Curvas de calibración estándar de AIA y fosfato monobásico.

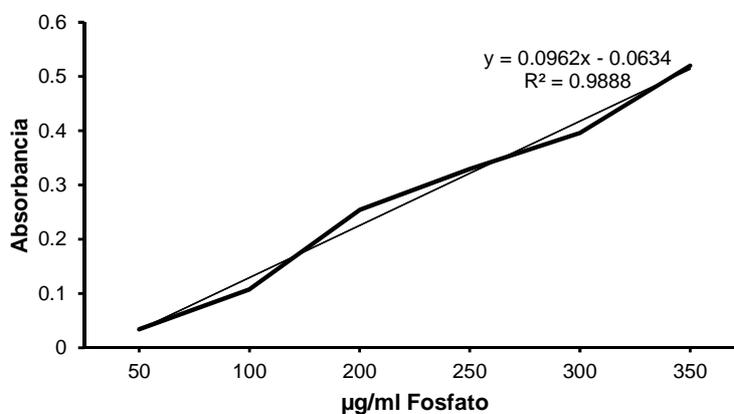
Curva de calibración estándar de AIA comercial (indole-3-acetic acid. No.1-1250. SIGMA-Aldrich, USA):

Concentración de AIA ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
3	0.1117
12	0.1946
18	0.3053
24	0.5605
40	0.8126
50	1.0627



Curva de calibración estándar de fosfatos (KH_2PO_4 , KEM, México):

Concentración de KH_2PO_4 ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
50	0.0340
100	0.1079
200	0.2537
250	0.3292
300	0.3958
350	0.5199



Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice VII. Medio cromo azurol S (CAS) agar.

A continuación se describe el procedimiento utilizado para la elaboración de un litro de medio CAS agar (protocolo proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental a cargo del Dr. Juan José Peña Cabriaes):

Solución 1

Mezclar 10 ml de FeCl_3 1 mM (Disuelto en HCl 10 mM) con 50 ml de una solución que contenga 1.21 mg/ml de Cromo Azurol S (CAS).

Agitando constantemente, añadir a la mezcla anterior (a) 40 ml de una solución que contenga 1.82 mg/ml de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA por sus siglas en inglés).

1. Solución 2

2. Disolver 30.24g de PIPES (piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]) en 70 ml de una solución de sales que contenga: 0.3g de KH_2PO_4 , 0.5g de NaCl y 1.0 g de NH_4Cl .

3. Ajustar a pH de 6.8 utilizando KOH al 50% (w/v).

4. Agregar suficiente agua destilada (50 ml) para llevar la solución a 800ml.

5. Adicionar 15g de agar.

6. Solución 3.

7. En 70 ml de agua destilada, disolver los siguientes reactivos:

8. 2g Glucosa

9. 2g Manitol

10. 493mg MgSO_4

11. 11 mg CaCl_2

12. 1.17 mg MnSO_4

13. 1.4 mg H_3BO_3

14. 0.04 mg CuSO_4

15. 1.2 mg ZnSO_4

16. 1.0 mg Na_2MoO_4

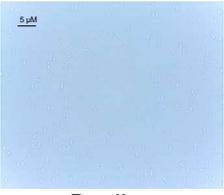
17. Solución 4:

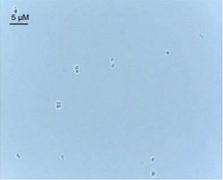
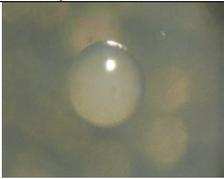
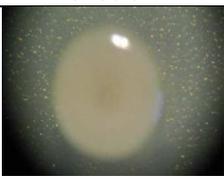
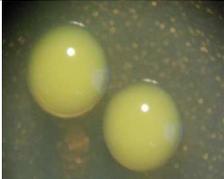
18. Preparar 30 ml de una solución de casaminoácidos al 10% (w/v).

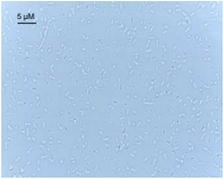
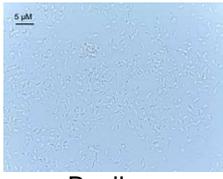
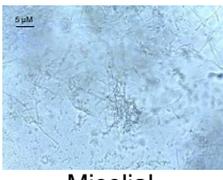
19. Esterilizar por separado las soluciones 1, 2 y 3, a una temperatura de 121°C y presión de 15 psi durante 15 minutos. La solución 4 debe ser esterilizada por filtración (0.22 µm).

Una vez esterilizada todas las soluciones, deben mezclarse las soluciones 2, 3 y 4 mientras se agita constantemente el matraz que las contiene, finalmente se agrega la solución 1 mezclando cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Finalmente el medio CAS agar, debe ser depositado en cajas Petri para su posterior uso.

Apéndice VIII. Caracterización morfológica y de crecimiento de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*.

Muestra	pH	Movilidad	Temperatura de crecimiento	Morfología celular	Morfología macroscópica
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L11	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Rosada, brillante y viscosa y circular.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L6	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Beige, brillante, traslúcida y circular.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L8	Acidifica		28 °C	 Bacilos	 Beige, lisa, opaca, viscosa y circular.
<i>Bacillus pumilus</i> L14	Acidifica		28 °C	 Bacilos	 Beige, rugosa, brillante y circular.
<i>Bacillus pumilus</i> L1	Acidifica		28 °C	 Bacilos	 Beige, lisa, viscosa, opaca y circular
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L13	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Tamaño mediano, beige, brillante, lisa

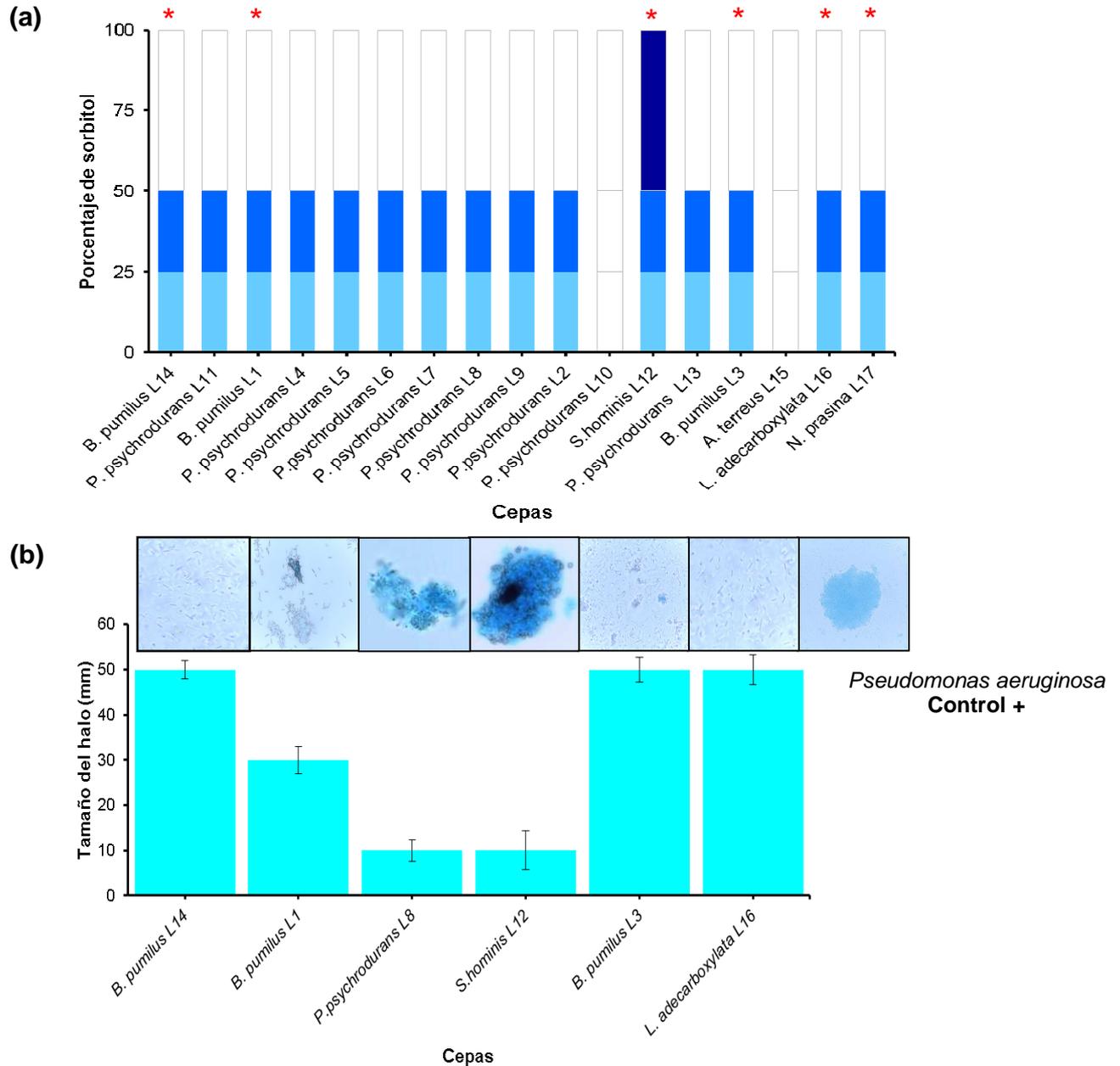
					y circular.
<i>Staphylococcus hominis</i> L12	Acidifico		28 °C	 Cocos	 Tamaño mediano, blanca, brillante, lisa, viscosa y circular.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L7	Mantiene neutro	*	28 °C	 Bacilos	 Beige, lisa, brillante, irregular y ondulada.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L5	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Beige, lisa, brillante, circular y convexa.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L9	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Tamaño grande, beige, lisa, brillante, viscosa y circular.
<i>Agrococcus terreus</i> L15	Mantiene neutro		28 °C	 Cocos	 Tamaño pequeño, amarilla, brillante, lisa y circular.
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L4	Mantiene neutro		28 °C	 Bacilos	 Beige, lisa, viscosa, opaca y convexa.

<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L2	Mantiene neutro		28 °C	 <p>Bacilos</p>	 <p>Beige, brillante, lisa, viscosa y circular.</p>
<i>Bacillus pumilus</i> L3	Acidifica		28 °C	 <p>Bacilos</p>	 <p>Tamaño grande, blanca, aplanado, opaca e irregular.</p>
<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> L10	Mantiene neutro		28 °C	 <p>Bacilos</p>	 <p>Blanca, lisa, viscosa, opaca y circular.</p>
<i>Leclercia adecarboxylata</i> L16	Mantiene neutro		28 °C	 <p>Bacilos</p>	 <p>Tamaño mediano, beige, granular, opaca y circular.</p>
<i>Nocardiopsis prasina</i> L17	Mantiene neutro		28 °C	 <p>Micelial</p>	 <p>Tamaño mediano, blanca, micelial y circular.</p>

Trabajo apoyado por IQA María Guadalupe Fonseca Hernández como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice IX. Evaluación de la capacidad de tolerar el estrés hídrico *in vitro* de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*.

Crecimiento en medio con una A_w reducida con 405 (100%), 202.5 (50%) y 101.25 (25%) g/L de sorbitol, las cepas marcadas con asterisco pueden crecer a 40 °C (a). Cepas productoras de exopolisacáridos en medio selectivo a pH 6.5-7.5 con su respectiva tinción con azul alcian.



Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice X. Evaluación cualitativa de la capacidad de fijación de nitrógeno de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*.

La fijación de nitrógeno atmosférico se manifiesta con un cambio de coloración del medio de cultivo de verde a amarillo, como reflejo de la acidificación del medio por la actividad de la enzima nitrogenasa. Nivel I: baja producción, Nivel II: mediana producción, Nivel III: máxima producción observada.

Evaluación en medio sólido después de un periodo de monitorio de 120 hrs.

Nivel de viraje de color	Coloración en sistema de color Munsell	Cepas
Control positivo	10GY6/12 	<i>Burkholderia caribensis</i>
Control negativo	10GY4/8 	<i>Bacillus</i> sp.
I	10GY4/8 	<i>B. pumilus</i> L14, <i>B. pumilus</i> L1, <i>P. psychrodurans</i> L4, <i>P. psychrodurans</i> L5, <i>P. psychrodurans</i> L6, <i>P. psychrodurans</i> L7, <i>P. psychrodurans</i> L9, <i>P. psychrodurans</i> L2, <i>P. psychrodurans</i> L10, <i>B. pumilus</i> L3, <i>A. terreus</i> L15, <i>P. psychrodurans</i> L11, <i>S. hominis</i> L12
II	10GY6/12 	<i>P. psychrodurans</i> L8, <i>P. psychrodurans</i> L13
III	5GY7/10 	<i>L. adecarboxylata</i> L16

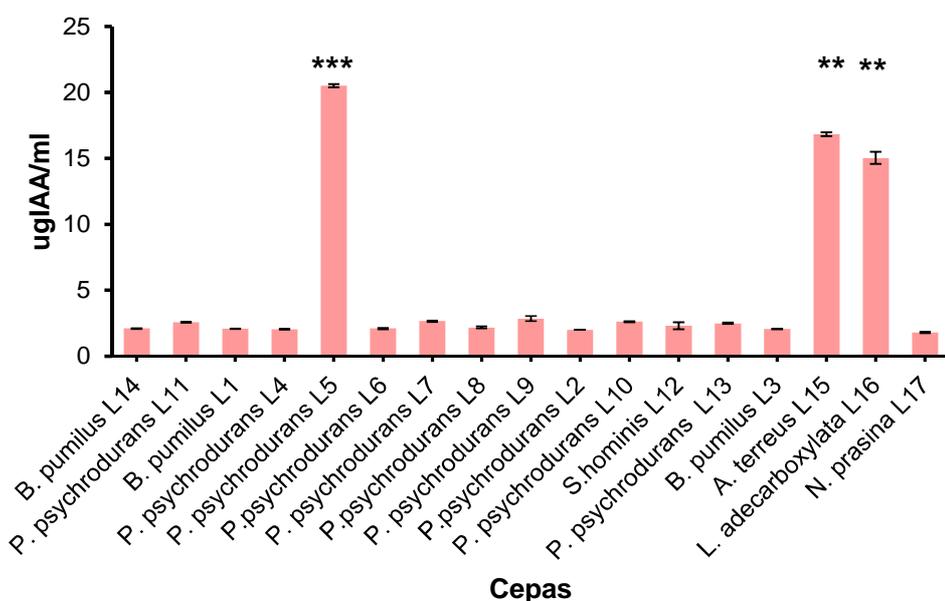
Evaluación en medio semisólido después de un periodo de monitorio de 72 hrs.

Nivel de viraje de color	Coloración en sistema de color Munsell	Cepas
Control positivo	5Y6/8 	<i>Burkholderia caribensis</i>
Control negativo	10GY5/12 	<i>Bacillus</i> sp.
I	5GY8/12 	<i>P. psychrodurans</i> L11, <i>S. hominis</i> L12
II	2.5Y8/12 	<i>B. pumilus</i> L14, <i>B. pumilus</i> L1, <i>P. psychrodurans</i> L4, <i>P. psychrodurans</i> L5, <i>P. psychrodurans</i> L6, <i>P. psychrodurans</i> L7, <i>P. psychrodurans</i> L8, <i>P. psychrodurans</i> L9, <i>P. psychrodurans</i> L2, <i>P. psychrodurans</i> L10, <i>P. psychrodurans</i> L13, <i>B. pumilus</i> L3, <i>A. terreus</i> L15, <i>L. adecarboxylata</i> L16
III	10Y9/12 	<i>N. prasina</i> L17

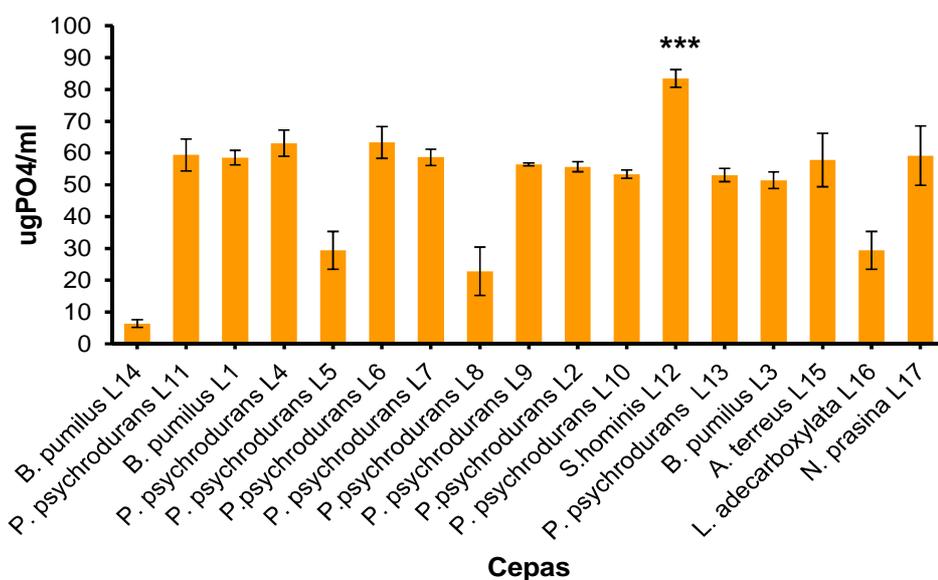
Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice XI. Evaluación cuantitativa de la capacidad de producción de AIA y solubilización de fosfatos de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*.

Producción de AIA de las cepas aisladas. Las cepas marcadas con asterisco presentaron la mayor producción de AIA.



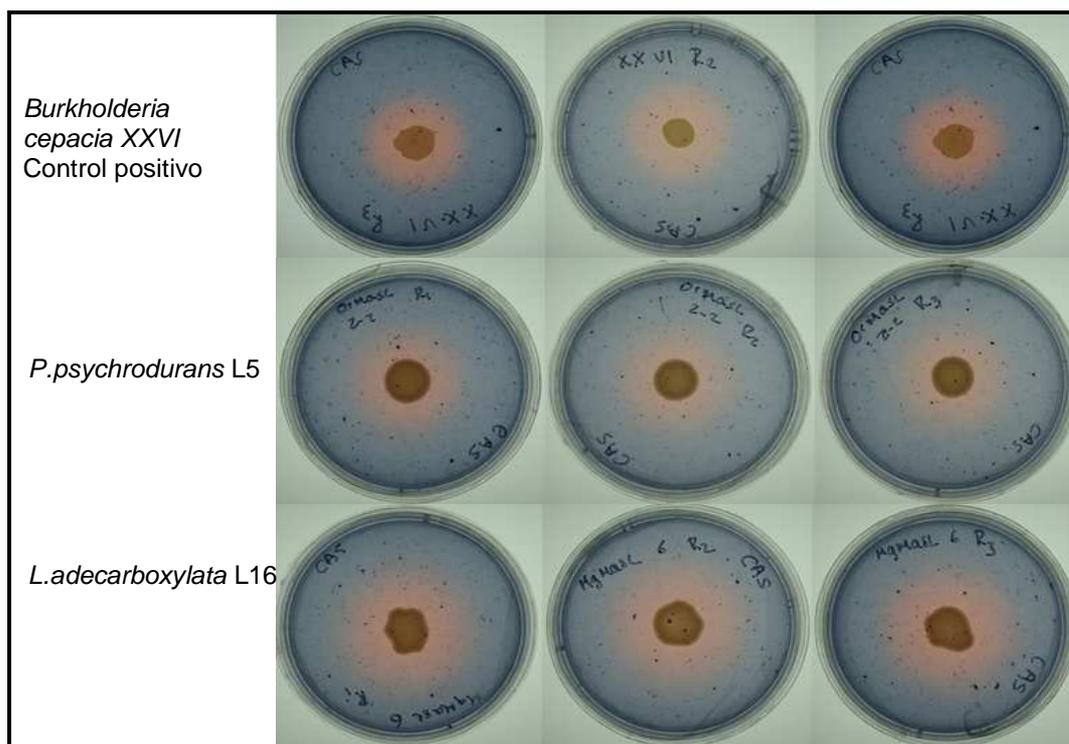
Solubilización de fosfatos de las cepas aisladas. La cepa marcada con asterisco presentó la mayor capacidad de solubilizar fosfatos.



Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice XII. Evaluación cualitativa de la producción de sideróforos de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizans* y *O. robusta*.

La evaluación de la producción de sideróforos consiste en la utilización de un compuesto quelante de hierro, el cromo azulol S (CAS), que cambia de color cuando libera el hierro. Por tanto, la producción de sideróforos se estima por el halo que se produce alrededor de las colonias con presencia de Fe-CAS.



Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice XIII. Evaluación cualitativa de la capacidad de producción de compuestos volátiles de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizzans* y *O. robusta*.

La producción de amoniaco se manifiesta con un cambio de coloración del medio de cultivo de amarillo a café y la formación de un precipitado, resultado de la reacción del amoniaco con el yoduro de mercurio.

Nivel de viraje de color	Coloración en sistema de color Munsell	Cepas
Sin producción	2.5GY7/10 	<i>P.psychrodurans</i> L6, <i>P. psychrodurans</i> L7, <i>P.psychrodurans</i> L8, <i>P. psychrodurans</i> L9, <i>P.psychrodurans</i> L2, <i>P. psychrodurans</i> L10, <i>P. psychrodurans</i> L13, <i>S.hominis</i> L12, <i>P. psychrodurans</i> L11, <i>N. prasina</i> L17
Con producción	2.5YR5/12 	<i>P. psychrodurans</i> L4, <i>P. psychrodurans</i> L, <i>B. pumilus</i> L14, <i>B. pumilus</i> L1, <i>B. pumilus</i> L3, <i>A. terreus</i> L15, <i>L. adecarboxylata</i> L16

La producción de cianuro de hidrógeno se manifiesta con un cambio de coloración en presencia de ácido pícrico naranja a rojo-café. Nivel I: baja producción, Nivel II: mediana producción, Nivel III: máxima producción observada.

Nivel de viraje de color	Coloración en sistema de color Munsell	Cepas
Sin producción	7.5Y9/4 	<i>B. pumilus</i> L14, <i>B. pumilus</i> L1, <i>B. pumilus</i> L3, <i>A. terreus</i> L15, <i>L. adecarboxylata</i> L16, <i>S. hominis</i> L12
I	5Y7/8 	<i>P.psychrodurans</i> L6, <i>P. psychrodurans</i> L7, <i>P.psychrodurans</i> L8, <i>P. psychrodurans</i> L9, <i>P.psychrodurans</i> L2, <i>P. psychrodurans</i> L10, <i>P. psychrodurans</i> L13
II	5YR6/12 	<i>P. psychrodurans</i> L4, <i>P. psychrodurans</i> L5, <i>P. psychrodurans</i> L11
III	10Y9/12 	<i>N. prasina</i> L17

Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Apéndice XIV. Evaluación cualitativa de la capacidad de hidrolizar celulosa de las cepas aisladas de semillas de *M. geometrizzans* y *O. robusta*.

La hidrólisis de celulosa en el medio de cultivo se ve reflejada con el propio crecimiento microbiano y por la producción de halos de hidrólisis, cuando esta se ha realizado con mayor actividad. La evaluación de alta actividad de hidrólisis se realizó con la tinción con rojo Congo, un colorante que interactúa con los enlaces β -1,4 glucosídicos de la carboximetilcelulosa.



Trabajo apoyado por IBT Consuelo Rochín Siqueiros como parte de su tesis de licenciatura.

Lista de Publicaciones y participaciones en Congresos con el trabajo de tesis

Publicaciones:

Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. (2016). The Cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. *Frontiers in Microbiology* 7, Article 150 doi:10.3389/fmicb.2016.00150.

Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., **Fonseca-García, C.**, Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., North, G., Visel, A., Partida-Martinez, L. P. and Tringe, S. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytologist*, 209, 798. doi:doi:10.1111/nph.13697.

Congresos:

Fonseca-García, C., Coleman-Derr, D., Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. and Partida-Martínez, L. P. (2015). CAM desert plants select their aboveground fungal endophytes (Poster). Simposio Internacional sobre Biología Molecular y Biotecnología de Hongos. Irapuato, Guanajuato: CINVESTAV-Irapuato.

Fonseca García, C., Garrido, E. and Partida-Martínez L.P. (2015). Analysis of the endophytic bacterial communities associated with two wild sympatric species of Cacti (Poster). 115th General Meeting of American Society for Microbiology. New Orleans, Louisiana: American Society for Microbiology.

Fonseca García, C., Garrido, E. and Partida-Martínez L.P. (2014). Analysis of the endophytic bacterial communities associated with two wild sympatric species of Cacti (Poster). XXX Congreso Nacional de Bioquímica. Guadalajara, Jalisco: Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C.

Declaración de Independencia

Por este medio declaro que yo he preparado este trabajo de tesis de forma independiente y sin ayuda externa. Especialmente declaro que he citado de forma correcta y explícita a los autores y trabajos en los que esta tesis se apoya, así como las contribuciones de las personas que coadyuvaron en su desarrollo.

Lugar: Irapuato, Guanajuato

Fecha: 8 de Abril de 2016

Citlali Fonseca García
Firma