



Benemérita Universidad Autónoma  
De Puebla

Instituto de Ciencias

**Biogeografía de aislamientos del género  
bacteriano *Methylobacterium*, asociados a las  
cactáceas *Cylindropuntia* spp.**

Tesis

que para obtener el título de  
Maestría en Ciencias (Microbiología)

Presenta

**Q.F.B. Mary Jose Salas Limón**

Director de tesis:

D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez

Coasesora de tesis:

D.C. María del Rocío Bustillos Cristales

Diciembre 2020

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca nacional de manutención a nivel Maestría.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el Instituto de Ciencias por ser parte de mi formación académica y apoyar mi proyecto.

Al D.C. Luis Ernesto Fuentes Ramírez y la D.C. María del Rocío Bustillos Cristales por todo su apoyo, paciencia, enseñanza, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A mi comité tutorial, D.C. Ricardo Carreño López, D.C. Miguel Castañeda Lucio, D.C. José Antonio Munive Hernández, por ser parte importante de mi formación académica. Gracias por todos sus comentarios y apoyo, un verdadero honor el aprender de ustedes.

A la D.C. Verónica Quintero Hernández y la D.C. Vianey Marín Cevada, por sus revisiones a este trabajo.

A mis compañeros de generación, Alma, Dulce, Enrique, Gaby, Giselle, María, Mónica, Uriel y Vero, por todos los buenos momentos juntos. A mis compañeros de laboratorio, Roberto, Rigel, Sandy, Bere, por su apoyo y enseñanzas.

## **Dedicatoria**

Para mi familia: Sergio, Josefina y Marylu, gracias a ustedes y para ustedes. Y para quien me hace sentir siempre como en casa, Oscar.

# Índice

Resumen .....	6
Introducción .....	8
1. <i>Cactaceae</i> .....	8
2. Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán .....	8
3. <i>Cylindropuntia</i> .....	9
4. Comunidades microbianas asociadas a cactáceas .....	10
5. Metilotropía .....	11
5.1. Metabolismo metilotrófico bacteriano .....	12
5.2. Oxidación del metanol .....	12
6. <i>Methylobacterium</i> .....	14
7. Biogeografía Bacteriana De Plantas .....	15
8. Fingerprinting genómico .....	15
8.1. BOX-PCR .....	16
Antecedentes .....	17
Justificación .....	18
Hipótesis .....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos específicos .....	18
Materiales y métodos .....	19
1. Muestreo .....	19
2. Aislamiento .....	21
3. PCR en colonia .....	21
4. Extracción de ADN .....	22
5. Amplificación de la región de ADN que codifica la subunidad 16S rRNA .....	22
6. Análisis de fragmentos de restricción de la amplificación del gen 16S rRNA (ARDRA) .....	22
7. Secuenciación de ADN .....	23
8. Análisis de secuencia .....	23
9. Variabilidad genética .....	23
Resultados y discusión de resultados .....	24
1. Aislamientos metilotróficos de la filosfera y endosfera de <i>Cylindropuntia</i> sp. ....	24
2. Caracterización genética .....	26
3. Análisis de huellas genómicas BOX-PCR .....	40
4. <i>Methylobacterium</i> sp. asociado a <i>Cylindropuntia</i> sp. ....	42
Conclusiones .....	46
Perspectivas .....	46
Referencias .....	47
Anexos .....	54

## Índice de figuras

Figura 1. Ubicación de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán .....	9
Figura 2. Esquema general del metabolismo metilotrófico bacteriano .....	13
Figura 3. Localización de sitios de muestreo .....	19
Figura 4. Cactáceas muestreadas .....	20
Figura 5. Morfología colonial en medio sólido MMS de cepas aisladas de <i>Cylindropuntia</i> sp. ....	24
Figura 6. Aislamientos epifitos y endófitos por morfotipo de cactácea .....	25
Figura 7. Preferencia de los aislamientos por cofactor empleado .....	25
Figura 8. Conjunto de resultados obtenidos por PCR en colonia del gen 16S rRNA .....	29
Figura 9. Fragmentos de restricción obtenidos a partir del uso de la enzima de restricción <i>CfoI</i> en amplificados 16s rRNA.....	32
Figura 10. Análisis de fragmentos de restricción obtenidos a partir del uso de la enzima de restricción <i>HinfI</i> en amplificados de 16S rRNA. ....	34
Figura 11. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de 28 aislados. ....	39
Figura 12. Análisis BOX-PCR de 30 aislados de <i>Cylindropuntia</i> sp.....	41
Figura 13. Aislamientos epifitos y endófitos de <i>Methylobacterium</i> sp. confirmados y presuntivos aislados de <i>Cylindropuntia</i> sp., organizados por morfotipo. ....	43

## Índice de tablas

Tabla 1. Caracterización genética de 40 aislamientos de filosfera y endosfera de <i>Cylindropuntia</i> sp. 38	
Tabla 2. Aislamientos caracterizados por secuenciación del gen 16S rRNA, agrupados por morfotipo y compartimento aislado. ....	45

## Resumen

El género bacteriano *Methylobacterium* se encuentra distribuido en una amplia variedad de ambientes. Un ambiente notable es su asociación simbiótica con plantas. Recientemente, se ha reportado como un género destacado en su asociación con cactus. Las bacterias del género *Methylobacterium* representan una ventaja en un entorno tan hostil, como al que están sometidos los cactus.

Los objetivos de este estudio fueron aislar cepas de *Methylobacterium* sp. de dos compartimentos (epifito y endófito) de cactus del género *Cylindropuntia* sp. muestreados en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán y evaluar su diversidad génica. Las bacterias fueron aisladas en medio selectivo con metanol adicionado con los cofactores  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ce}^{3+}$ .

Se obtuvieron 93 aislados metilótrofos, a los cuales se les realizó análisis ARDRA con las enzimas de restricción *CfoI* y *HinfI*. Veintiocho cepas fueron confirmadas mediante secuenciación del gen 16S RNA ribosomal y 30 cepas fueron caracterizadas por los patrones obtenidos en el análisis ARDRA a partir de secuencias parciales del gen 16S ADN ribosomal. Treinta cepas seleccionadas fueron sometidas a la técnica de huellas genómicas BOX-PCR, con la cual se obtuvo una visión general de la diversidad genómica de los aislados. Se observó una diversidad genómica en consecuencia de una baja similitud en los patrones de los aislados. Se registró correlación entre los aislados obtenidos y el morfotipo de *Cylindropuntia* sp. muestreado. Nuestra investigación confirma que *Methylobacterium* sp. establece asociaciones con cactus del género *Cylindropuntia* sp.

## Abstract

The bacterial genus *Methylobacterium* is distributed in a wide variety of environments. One notable environment is its symbiotic association with plants. Recently, it has been reported as a prominent genus in its association with cacti. Bacteria of the genus *Methylobacterium* represent an advantage in such a hostile environment, such as that to which cacti are subjected.

The objectives of this study were to isolate strains of *Methylobacterium* sp. from two compartments (epiphyte and endophyte) of cactus of the genus *Cylindropuntia* sp. sampled in the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve and to evaluate its gene diversity. Bacteria were isolated in selective medium with methanol added with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ce}^{3+}$  cofactors.

There were obtained 93 methylotrophic isolations, which were subjected to ARDRA analysis with *CfoI* and *HinI* restriction enzymes. Twenty-eight strains were confirmed by 16S ribosomal RNA gene sequencing and 30 strains were characterized by the patterns obtained in ARDRA analysis from partial sequences of 16S ribosomal DNA gene. Thirty selected strains were subjected to the BOX-PCR genomic fingerprinting technique, which provided an overview of the genomic diversity of the isolates. It was observed a genomic diversity as a consequence of a low similarity in the patterns of the isolates. It was registered correlation between the isolates obtained and the morphotype of *Cylindropuntia* sp. sampled. Our research confirm that *Methylobacterium* sp. establishes associations with cacti of the genus *Cylindropuntia* sp.

## Introducción

### 1. *Cactaceae*

Las regiones áridas, por excelencia, han sido consideradas dentro de los ecosistemas más hostiles, sin embargo, a pesar de las duras condiciones, estas regiones albergan una gran cantidad de vida. La familia *Cactaceae* (los cactus) son un grupo de especies de flora, que forman parte del paisaje de las regiones áridas y semiáridas, siendo capaces, además, de habitar bosques tropicales, caducifolios y templados, entre otros (Alanís y Velazco, 2008; Miguel-Talonia et al., 2014).

Las cactáceas son originarias del Continente Americano, están conformadas por cerca de 2000 especies, distribuidas desde Canadá hasta la Patagonia (Bravo y Sánchez, 1978; Kiesling, 1975; Kiesling, 1988). México, es el país que posee la mayor riqueza de estas plantas, contando con 913 especies, dentro de las cuales el 80 por ciento son endémicas del país (Jiménez, 2011).

Su distribución en la República Mexicana se encuentra a lo largo de las zonas desérticas de Sonora y Chihuahua, las Selvas Bajas Caducifolias y la zona de depresión del Balsas (Jiménez, 2011).

Los cactus disponen de ciertas características anatómicas y fisiológicas, que les permiten colonizar de forma exitosa los ambientes áridos. Por ejemplo, el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM), cambios morfológicos de su sistema de raíces o la utilización de cuerpos suculentos (Jiménez, 2011).

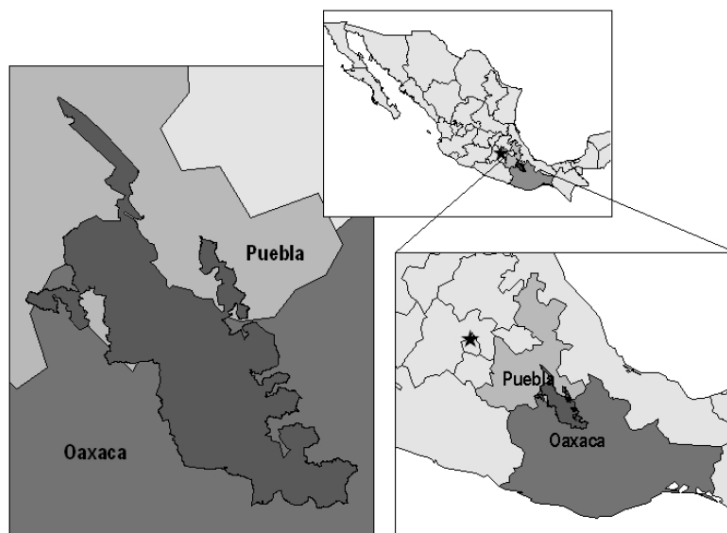
Los cactus no solo son parte importante en la estructura y dinámica de las zonas áridas y semiáridas, también forman parte de la historia del país, de su folklore e incluso de su economía (Bravo y Sánchez, 1978; Jiménez, 2011).

### 2. Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán

La Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán (RBTC) es un Área Natural Protegida (ANP) decretada en 1998, se localiza en el extremo suroeste del estado de Puebla y noroeste de Oaxaca (Figura 1). La reserva comprende 51 municipios, 20 del estado de Puebla y 31 del estado de Oaxaca, abarcando casi medio millón de hectáreas (Reyes, 2016). La aridez que presenta la región, se debe principalmente al efecto de sombra orográfica de la Sierra Madre Oriental, que actúa como una barrera a los vientos húmedos y facilita la formación de microclimas en el Valle (Medina, 2016).

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es uno de los principales reservorios de riqueza biocultural de México, presentando un alto grado de diversidad biológica y endemismos, en esta región se han desarrollado más de 3500 especies de flora y fauna silvestre. Sin embargo, las cactáceas son el grupo de especies más características y reconocidas de la reserva, donde existen al menos 81 especies de cactáceas, de las cuales el 25 por ciento son endémicas de la región (Reyes, 2016; Medina, 2016; Jiménez, 2011; Campos-Salas, 2016; Robles, 2019).





**Figura 1.** Ubicación de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Figura reproducida de “La Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán” por F. Reyes en N. Sanz Editor (Ed.), *The Origins of Food Production*, (p.163), 2016, UNESCO.

### 3. *Cylindropuntia*

El género *Cylindropuntia* perteneciente a la familia *Cactaceae*, cuenta con cerca de 35 especies, originarias de México y Estados Unidos (Guillot et al., 2009). El nombre *Cylindropuntia* significa “opuntia cilíndrica”, lo que hace referencia a su forma y a su cercanía con el género *Opuntia* (Anderson, 2001).

También conocidas como “choyas”, los cactus del género *Cylindropuntia* son plantas arbustivas muy ramificadas, con tallos generalmente cilíndricos, espinas cubiertas por una vaina, pueden presentar flores de colores llamativos como amarillo o rojo y son cactus que fructifican en abundancia (Bravo y Sánchez, 1978; Guillot et al., 2009; Anderson, 2001; Medina, 2016).

El género *Cylindropuntia* crece en condiciones de sequía, formando parte de matorrales. Debido a esta forma arbustiva beneficia a otras especies de cactus por la sombra que proyecta, además de proteger a cierta fauna, al permitir que ciertas aves y mamíferos pequeños formen sus nidos entre sus ramas (Bravo y Sánchez, 1978).

La hibridación natural en este género es bastante común, lo que lleva muchas veces a la dificultad de identificación de muchos especímenes. Rebman y Pinkava (2001) han realizado numerosos estudios citogenéticos en cactáceas del género, determinando incluso que muchas de las especies que lo componen son híbridas (Anderson, 2001; Rebman y Pinkava, 2001).

Finalmente, en el aspecto etnobotánico del género, ciertos grupos indígenas atribuían propiedades mágicas a determinadas especies, empleándolas incluso como amuletos. Por otro lado, sus frutos en épocas de sequía son aprovechados como forraje, incluso sus tallos se han reportado ser usados para manufacturar muebles (Bravo y Sánchez, 1978).

#### **4. Comunidades microbianas asociadas a cactáceas**

Todos los organismos forman asociaciones estrechas con microorganismos, integrando lo que se conoce como “holobionte” (huésped más sus simbiontes microbianos). En la mayoría de plantas y animales el conocimiento de la biología del huésped-microbio es muy incipiente. Ese es el caso de la familia Cactaceae, en la que, a pesar de ser una familia tan documentada e importante en los ecosistemas áridos y semiáridos, las asociaciones que establecen con comunidades microbianas y las reglas que las rigen siguen siendo poco conocidas (Valdespino et al., 2014; Fonseca et al., 2016).

Los cactus emplean un conjunto de estrategias que les permiten habitar exitosamente territorios con condiciones climáticas extremas, con alta radiación solar y una prolongada escasez de agua. No obstante, investigaciones recientes confirman que estas mismas condiciones son las que promueven las asociaciones cactus-microbio, asociaciones que contribuyen a la adaptación y supervivencia de los cactus (Fonseca et al., 2016).

Al igual que ocurre en los microbiomas animales, los cactus pueden albergar diferentes comunidades microbianas tanto funcional como taxonómicamente distintas y que son determinadas en gran medida por el compartimento de la planta (Fonseca et al., 2016; García y Kao, 2018). La composición microbiana en cada compartimento de los cactus es diferente debido a que la planta ofrece microambientes distintos. Por lo tanto, distintas comunidades podrán habitarlos dependiendo de sus capacidades particulares (Flores-Núñez et al., 2020, Fonseca et al., 2016).

Las interacciones mutualistas que ocurren en las asociaciones cactus-microbio son altamente complejas y dinámicas. Los microorganismos se pueden beneficiar al obtener nutrientes y las plantas pueden recibir metabolitos útiles procedentes de los microbios (Chávez et al., 2016; Hardoim et al., 2008; Turner et al., 2013).

Los microorganismos ejercen grandes beneficios en la salud de las plantas de varias maneras: mediante la producción de sustancias antimicrobianas, por la inducción de resistencia contra patógenos, por la solubilización de nutrientes, la promoción del crecimiento de la planta y por fijación biológica de nitrógeno, entre otros (Lima et al., 2014; Aguirre-Garrido et al., 2012).

## 5. Metilotrofia

La metilotrofia es la capacidad metabólica de aprovechar los compuestos de carbono reducidos que pueden contener un átomo de carbono en su estructura, como el metano o el metanol, o más de un átomo de carbono, pero sin contener ningún enlace carbono-carbono entre sí (sustratos C1), como en el caso de la dimetilamina y trimetilamina (Anthony, 1982; Chistoserdova et al., 2009).

Fue durante el siglo XX que las actividades de investigación de la metilotrofia avanzaron dentro de la microbiología, siendo el término metilotrofia, también aplicable a su disciplina académica (Chistoserdova et al., 2009).

Los organismos metilótrofos abarcan una gran variedad de géneros, tanto de organismos procariotas como eucariotas; los metilótrofos procariotas, entre los que se encuentran especies pertenecientes a Alpha-, Beta- y Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Verrucomicrobia y algunas archeas (como las metanotróficas anaeróbicas o ANME), pueden utilizar una variedad de compuestos C1. Por otro lado, los metilótrofos eucariotas, limitados a unos cuantos géneros de levaduras como *Candida* y *Pichia*, sólo utilizan el metanol como fuente de carbono y la metilamina como fuente de nitrógeno (Yurimoto, 2011; Chistoserdova, 2003).

Los metilótrofos tienen una amplia gama de sustratos, muchos de ellos son componentes importantes del medio ambiente, por lo que el metabolismo metilotrófico es parte crucial de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, azufre y compuestos halogenados (Eyice y Schäfer, 2016; Chistoserdova, 2011b).

Uno de los compuestos orgánicos más abundantes en la atmósfera y sustrato de algunos metilótrofos es el metano (CH<sub>4</sub>). El cual, al ser el segundo gas de efecto invernadero más importante ha llevado a que los metanótrofos sean estudiados ampliamente por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas y ambientales, ya que estos organismos actúan como filtros naturales del metano (Cai et al., 2016; Ho et al., 2019; Chistoserdova, 2015).

Los metilótrofos no metanótrofos, de igual forma, sirven como barreras para otros compuestos C1 de importancia ambiental, como el metanol (que se genera de forma natural por las plantas), aminas metiladas, metanos halogenados, entre otros sustratos (Chistoserdova, 2015).

Se ha demostrado que los metilótrofos tienen una gran distribución ambiental, incluyendo ambientes extremos (Chistoserdova, 2015). Se han encontrado metilótrofos en lagos de agua dulce (Chistoserdova, 2011a), en suelos árticos (Martínez-Cruz et al., 2017), en la rizosfera y filosfera de las plantas (Delmotte et al., 2009; Kutschera, 2007), se han encontrado incluso en ambientes marinos, en algunos entornos exóticos como en el cráter de un meteorito y en cuevas subterráneas selladas (Chistoserdova, 2015).

### **5.1. Metabolismo metilotrófico bacteriano**

Las bacterias metilotróficas son organismos capaces de usar sustratos como metano, metanol, aminas metiladas, metanos halogenados y especies de azufre metilado. En cuanto a sus requerimientos de oxígeno, las bacterias metilotróficas se pueden abordar de dos maneras: primero, las anaeróbicas metilotróficas, entre las que se encuentran algunas archeas metanógenas y los clostridios metilotróficos y segundo, las bacterias aeróbicas metilotróficas, donde además se incluyen las bacterias anaerobias facultativas (Lidstrom, 2006).

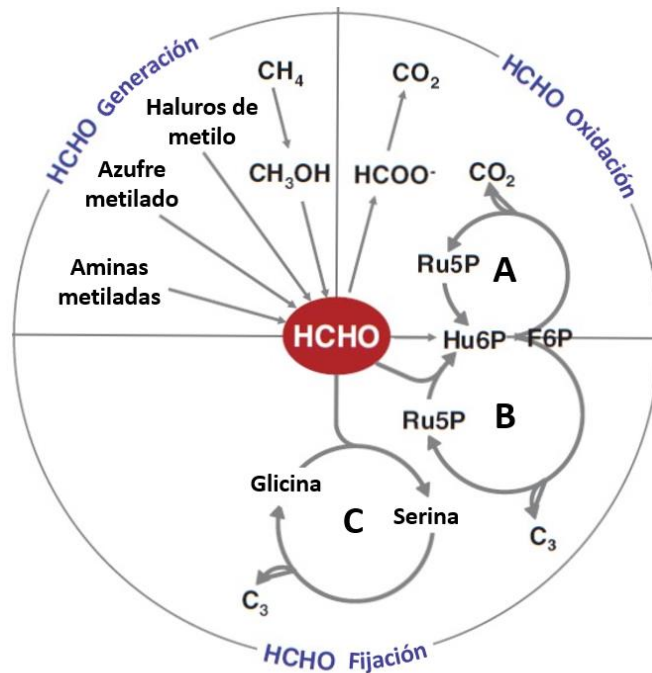
Asimismo, las bacterias aeróbicas metilotróficas se clasifican en función de su capacidad de utilización del sustrato, por un lado, los metilótrofos obligados son incapaces de crecer en sustratos que contengan enlaces carbono-carbono, como *Methylophilus methylotrophus*, mientras que, los metilótrofos facultativos pueden crecer tanto en sustratos de un solo carbono como en sustratos de múltiples carbonos, como el género *Methylobacterium* (Lidstrom, 2006).

En las últimas décadas, se ha avanzado en el conocimiento de la bioquímica y fisiología de los organismos metilótrofos. Hoy en día, el metabolismo metilotrófico se comprende como un conjunto de módulos o unidades funcionales metabólicas, donde cada módulo contiene un conjunto específico de enzimas y vías alternativas capaces de realizar una función metabólica específica. Por tanto, diferentes combinaciones de estos módulos estarán presentes en los diferentes organismos metilótrofos (Chistoserdova et al., 2003; Chistoserdova et al., 2005; Chistoserdova, 2011b).

La metilotrofia aeróbica requiere de un conjunto mínimo de módulos metabólicos críticos. Sin embargo, muchos metilótrofos pueden poseer múltiples módulos para un paso específico; un organismo metilotrófico requerirá de (I) Un módulo de oxidación primaria (desmetilación, deshalogenación), a partir de un sustrato C1 con la producción de formaldehído, metil o metileno, (II) Un módulo para la oxidación/desintoxicación del producto de la oxidación primaria y (III) Un módulo de asimilación, el cual puede ser: a nivel de formaldehído por el ciclo de Monofosfato de Ribulosa (RuMP), a nivel de CO<sub>2</sub> por el Ciclo de Calvin Benson-Bassham (CBB) y a nivel de metileno y CO<sub>2</sub> por el Ciclo de la Serina (Figura 2) (Chistoserdova, 2011b; Chistoserdova et al., 2005).

### **5.2. Oxidación del metanol**

El metanol es uno de los dos compuestos orgánicos más abundantes en la atmósfera. Una de las principales fuentes de metanol proviene de las plantas, que liberan metanol por procesos de desmetilación de la pectina de sus paredes celulares, resultado de procesos normales de desarrollo y crecimiento. Por tanto, las plantas representan un hábitat importante para las bacterias degradadoras de metanol (Lidstrom, 2006; Eyice y Schäfer, 2016; Dorokhov et al., 2018).



**Figura 2.** Esquema general del metabolismo metilótrofico bacteriano. Primera parte, la generación de formaldehído (HCHO) mediante la oxidación de varios compuestos como metano, metanol, haluros de metilo, azufre metilado, aminas metiladas; Segunda parte, la oxidación de formaldehído HCHO a CO<sub>2</sub>, por medio de generación de formiato o Vía cíclica oxidativa del monofosfato de ribulosa (A); Tercera parte, Fijación o vías de asimilación del formaldehído a compuestos C<sub>3</sub> por medio de Ciclo Ribulosa monofosfato (B) y el Ciclo de la Serina (C). Figura adaptada de "Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism" por Yurimoto et al., (2005).

El metabolismo del metanol se inicia con la oxidación del metanol a formaldehído en el periplasma de bacterias Gram-negativas. Esta oxidación se lleva a cabo por tres clases de enzimas metanol deshidrogenasas (MDH), que varían en diferentes organismos en cuanto a su estructura cuaternaria, requisitos de coenzimas/cofactores y de su localización celular. Una quinoproteína metanol deshidrogenasa (MDH) dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ) encontrada en metilótrofos Gram-negativos; una enzima MDH ligada a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) encontrada en cepas de *Bacillus* y una metanol NDMA (N, N'-dimetil-4-nitrosoanilina) oxidorreductasa (MDO), encontrada en bacterias Gram-positivas como *Mycobacterium gastr* MB19 (Kolb y Stacheter, 2013; Lidstrom, 2006).

Durante años, gran parte de los avances en el estudio de la metilotrofia se concentraron en la enzima PQQ MDH, considerada como una enzima clave en el metabolismo del metanol en bacterias Gram-negativas, la MDH tiene una estructura heterotetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ), conformada por dos subunidades grandes ( $\alpha$ ) de 66 kDa (MxaF) que contiene una molécula de PQQ y un ion Ca<sup>2+</sup>, y dos subunidades pequeñas ( $\beta$ ) de 8.5 kDa (MxaI) que se pliegan alrededor de la subunidad  $\alpha$  (Dubey et al, 2018; Chistoserdova, 2011b; Anthony y Williams, 2003). La PQQ MDH no es la única presente en todos los metilótrofos Gram-negativos, en géneros de *Burkholderiales* y *Rhodocyclales* se encontró que codifican para una MDH alternativa, denominada MDH2. También se han caracterizado metilótrofos que no poseen ni la PQQ MDH clásica ni la MDH2 alternativa, la enzima XoxF ha sido encontrada en

distintas bacterias incluyendo *Bradyrhizobiaceae* y otros rizobios como una MDH independiente de calcio que es capaz de utilizar elementos de tierras raras (REE), como el cerio o el lantano, como cofactores (Kolb y Stacheter, 2013; Chistoserdova, 2011b).

Posterior a la oxidación del metanol, la oxidación del formaldehído generado a CO<sub>2</sub> es un paso importante en la metilotrofia aeróbica. El formaldehído sintetizado como intermediario central del metabolismo metilotrófico toma dos caminos, en el primero se oxida a CO<sub>2</sub> para la obtención de energía y destoxificación del formaldehído. Se conocen varias vías, vinculadas a: cofactores que atrapan el formaldehído, como el glutatión (GSH), el micotiol (MySH), tetrahidrofolato (H<sub>4</sub>F) y la tetrahidrometanopterin (H<sub>4</sub>MPT), entre otros; uso de múltiples enzimas deshidrogenasas de formato (FDH); empleo de reacciones de la Vía de oxidación cíclica de Ribulosa Monofosfato; y como segundo camino su asimilación o fijación a través del Ciclo de Serina o el Ciclo de Ribulosa Monofosfato, para la producción de un compuesto C<sub>3</sub> (Chistoserdova, 2011b; Yurimoto, 2005; Lidstrom, 2006).

## **6. *Methylobacterium***

*Methylobacterium* es un género bacteriano perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria*, orden *Rhizobiales* y familia *Methylobacteriaceae*, que cuenta actualmente con 52 especies publicadas válidamente, compuesto por bacterias Gram-negativas, estrictamente aerobias, con forma de bastón, las bacterias del género son conocidas como metilótrofas facultativas pigmentadas de color rosa (PPFM) por ser capaces de crecer en metanol y metilamina, así como en varios sustratos multi-carbono, y por producir un carotenoide característico color rosa (Green y Ardley, 2018; Kutschera, 2007).

Los miembros del género están distribuidos en una amplia variedad de ambientes, tanto naturales, que incluyen aire, suelo, polvo, como artificiales, en sistemas de aire acondicionado y baños. Sin embargo, un ambiente notable de este género es en su asociación con plantas, donde se ha reportado que *Methylobacterium* puede colonizar la superficie de las hojas (epífito), los tejidos internos (endófito), y nódulos de muchas especies de plantas (Dourado et al., 2012).

La asociación que *Methylobacterium* establece con las plantas se basa en una simbiosis, en la que *Methylobacterium* utiliza el metanol que emiten las plantas como su fuente de carbono y energía. En respuesta, *Methylobacterium* le proporciona beneficios a la planta, como la producción de sustancias que ayudan en su crecimiento, al liberar hormonas vegetales, como auxinas y citoquininas, aumentando la disponibilidad de nutrientes, generando una resistencia sistémica contra patógenos e incluso modulando la producción de etileno de la planta (Kutschera, 2007; Raja et al., 2008).

Las bacterias del género *Methylobacterium* han sido reportadas en numerosas especies vegetales, como en trigo (Omer et al., 2004), soja (Anda et al., 2011), caña de azúcar (de Andrade et al., 2018), e incluso recientemente, se reporta como un género destacado en agaves y cactus, lo que destaca su presencia generalizada e importancia en plantas terrestres (Bustillos-Cristales et al., 2017; Flores-Núñez et al., 2020).

### **7. Biogeografía bacteriana de plantas**

En distintos trabajos se ha observado que ciertas bacterias se asocian preferentemente con determinados ambientes. Muchos de esos estudios se han llevado a cabo utilizando genes marcadores “*housekeeping*”, principalmente 16S rRNA, dando lugar a identificación de OTUs (Unidades taxonómicas operacionales). Sin embargo, las OTUs e inclusive la identificación a nivel taxonómico de especie, no son útiles para la detección de microdiversidad de los organismos. Es decir que para la identificación de polimorfismo de genes e inclusive de genomas es necesario utilizar otro tipo de estrategias, entre ellas “*Fingerprinting*” genómico. Por este enfoque es posible detectar la existencia de relación entre ambiente y ecotipos microbianos adaptados al mismo. En el caso de plantas se podría encontrar si determinados genotipos bacterianos se asocian preferentemente a ciertas especies vegetales.

### **8. Fingerprinting genómico**

Las herramientas de *fingerprinting*, son un conjunto de técnicas que permiten diferenciar microorganismos o grupos de microorganismos en función de las características únicas de un componente universal o sección de una biomolécula, como, por ejemplo, fosfolípidos, ADN o ARN. Las técnicas de fingerprinting proporcionan un perfil general de la comunidad microbiana en un estudio, por lo que son una herramienta muy útil en muchos campos de la biología, ecología, evolución, estudios de diversidad, ciencias forenses, entre otras áreas (ITRC, 2011). Ahora bien, los procedimientos de fingerprinting genómico o huellas genéticas, se componen de técnicas que permiten estudiar específicamente el polimorfismo de una secuencia de ADN. Las diferentes técnicas se diferencian por su capacidad de detectar los polimorfismos, es decir, su grado de resolución o especificidad. Así, la elección de la técnica dependerá principalmente de las preguntas que se buscan responder en una investigación y de los conocimientos que se tienen del grupo microbiano en estudio (Rentarías-Alcántara, 2007; ITRC, 2011).

Las técnicas de huellas genéticas de ADN tienen dos aspectos técnicos en común, el primero es el aislamiento de la parte del genoma que se va a estudiar, y segundo la sujeción de la parte que se aisló del genoma en alguna técnica que permita revelar el polimorfismo de la secuencia de ADN, como restricción, amplificación, electroforesis o combinaciones de las técnicas (Vanechoutte, 1996).

## 8.1. BOX-PCR

En los cromosomas bacterianos se encuentran múltiples secuencias repetidas intercaladas, localizadas en regiones intergénicas a lo largo de todo el genoma bacteriano. Dichos bloques de secuencias no codificantes han sido aprovechados como múltiples objetivos genéticos para sondas de oligonucleótidos, los cuales, permiten generar perfiles de ADN únicos o huellas genéticas, que en gran medida han demostrado tener múltiples aplicaciones en el estudio de microorganismos, ya que varios de estos elementos se encuentran conservados y dispersos en los genomas de distintas bacterias (Versalovic et al., 1994; Versalovic et al., 1998; Lupski y Weinstock, 1992).

Para la tipificación de bacterias se han utilizado principalmente tres familias de secuencias repetitivas: las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP) con una secuencia de 35 a 40 pares de bases, el consenso intergénico repetitivo enterobacteriano (ERIC) con una secuencia de 124 a 127 pares de bases y los elementos BOX (Menna et al., 2009).

BOX-PCR es una versión particular de la PCR basada en secuencias repetitivas (rep-PCR), que utiliza la secuencia repetida dispersa BOX, encontrada inicialmente en *Streptococcus pneumoniae*, pero común en diversas especies bacterianas. Los elementos box son secuencias compuestas de tres subunidades: boxA, boxB, boxC con 59, 45 y 50 nucleótidos de longitud, respectivamente. De ellos, la subunidad boxA es la más conservada en varios géneros bacterianos (Brusetti et al, 2008; Koeuth et al., 1995).

La técnica de BOX-PCR es muy utilizada debido a su bajo costo, buena eficiencia y su simplicidad. Como las secuencias BOX se encuentran intercaladas en todo el genoma, BOX-PCR es un método capaz de analizar de forma simultánea muchas regiones de ADN en el genoma bacteriano y producir múltiples fragmentos de ADN de tamaños diferentes, los cuales son fraccionados por electroforesis para obtener los perfiles de huellas genéticas o fingerprinting genómico (Brusetti et al, 2008; Versalovic et al., 1998).



## Antecedentes

Numerosos estudios han reportado la presencia de bacterias del género *Methylobacterium* en diversas especies de plantas, resaltando el papel del género en cuestiones como la mejora de la capacidad de adaptación de la planta, en trigo (*Triticum aestivum*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Omer et al., 2004). También se han analizado los factores que influyen en las comunidades de *Methylobacterium* que colonizan las plantas y se han estudiado la complejidad de las mismas, en *Arabidopsis thaliana* (Knief et al., 2010a; Knief et al., 2010b); destacando el papel del metabolismo metilotrófico de *Methylobacterium* durante la colonización, en *Medicago truncatula* (Sy et al., 2005). Mediante el uso de los genes involucrados en la metilotropía (*mxoF*) y genes 16S rRNA, se ha logrado analizar la distribución filogenética del género en diferentes especies de plantas (*Citrus* spp., *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Saccharum* spp., *Coffea arabica*, *Borreria verticillata* y *Capsicum annuum*) logrando evidenciar una asociación nicho específica (Dourado et al., 2012).

A pesar del creciente interés por conocer las comunidades microbianas asociadas a cactáceas (Lima et al., 2015; Aguirre-Garrido et al., 2012) y el papel que *Methylobacterium* representaría en un entorno al que están sometidos los cactus, los estudios en estas asociaciones son limitados.

Fonseca et al., en 2016, estudiaron la composición, la diversidad y los factores que influyen en las comunidades de bacterias, arqueas y hongos, en las especies de cactus *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta*. Ellos demostraron que el ensamblaje de estas comunidades está influenciado principalmente por el compartimento del cactus.

En un estudio se analizó la diversidad bacteriana metilotrófica asociada a la cactácea en estado de amenaza: *Neobuxbaumia macrocephala*, donde se obtuvieron aislados de los grupos *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Alpha-*, *Beta-* y *Gammaproteobacteria*; y, además, se evidenció la presencia mayoritaria de genes *XoxF* (Bustillos-Cristales et al., 2017)

En 2018, de Andrade y colaboradores presentaron un análisis de la diversidad de *Methylobacterium* en caña de azúcar por medio de BOX-PCR, demostrando una alta diversidad genómica de sus aislados, lo que evidencia el uso funcional de las técnicas de *fingerprinting* genómico.

Finalmente, Flores-Núñez et al., en 2020, realizaron una diferenciación de nicho entre la rizosfera y la filosfera de los cactus *Myrtillocactus geometrizans* y *Opuntia robusta* y de los agaves *Agave salmiana* y *Agave tequilana*. Así mismo destacaron los genes que las comunidades microbianas poseen para poder colonizar y sobrevivir en entornos como los que los cactus están sujetos. Genes como los que codifican la formación de biopelículas y detección de *quórum*, así como genes que producen la enzima metanol deshidrogenasa y genes relacionados con fototrofia, entre otros.

## **Justificación**

Las asociaciones entre comunidades bacterianas y sus respectivos hospedantes vegetales han sido objeto de numerosos estudios. Sin embargo, de estas interacciones complejas se tiene una comprensión ecológica limitada de su microbiota asociada y en particular de la microbiota de cactáceas. Por ello se propone el estudio de la estructura de las comunidades metilotróficas asociadas a cactáceas de género *Cylindropuntia* sp.

## **Hipótesis**

La microbiota metilotrófica de la filosfera y endosfera del tallo asociada a las especies de cactáceas del género *Cylindropuntia* sp. constituyen ecotipos adaptados a cada uno de sus ambientes.

## **Objetivo general**

Determinar la microdiversidad bacteriana metilotrófica cultivable asociada a las especies vegetales del género *Cylindropuntia* sp.

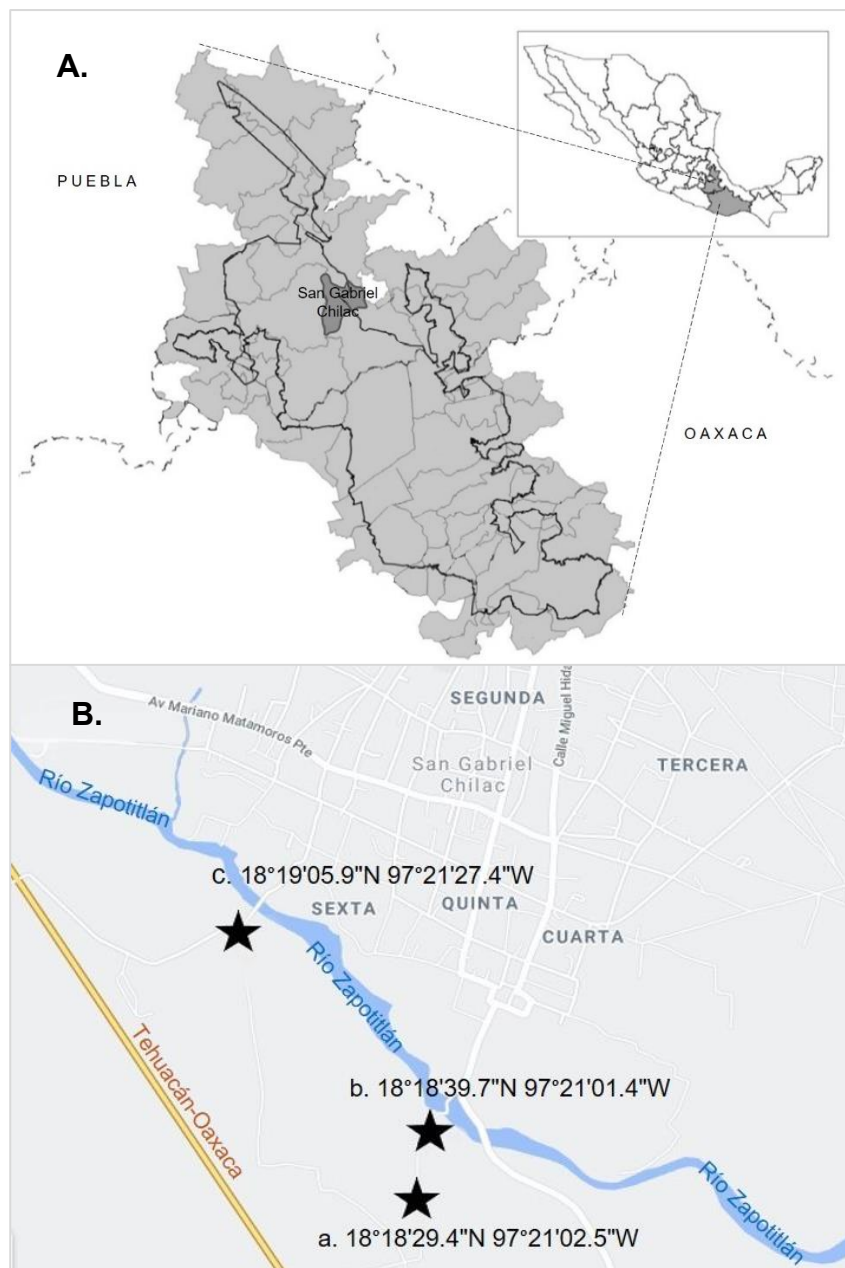
## **Objetivos específicos**

- ✓ Aislar cepas metilotróficas de la filosfera y endosfera del tallo de la cactáceas
- ✓ Caracterizar genotípicamente las cepas obtenidas
- ✓ Analizar diversidad metilotrófica por medio de huellas genéticas (BOX-PCR)
- ✓ Comparar los genotipos metilotróficos en aislados cactáceas del género *Cylindropuntia* sp.

## Materiales y métodos

### 1. Muestreo

El muestreo fue realizado en noviembre del 2018, en la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, en el municipio de San Gabriel Chilac, perteneciente al estado de Puebla. Se recolectaron siete muestras en la región comprendida entre el Río Zapotitlán y la Carretera federal Tehuacán-Oaxaca, en regiones próximas a las coordenadas: a)  $18^{\circ}18'29.4''\text{N}$   $97^{\circ}21'02.5''\text{W}$  b)  $18^{\circ}18'39.7''\text{N}$   $97^{\circ}21'01.4''\text{W}$  y c)  $18^{\circ}19'05.9''\text{N}$   $97^{\circ}21'27.4''\text{W}$  (Figura 3).

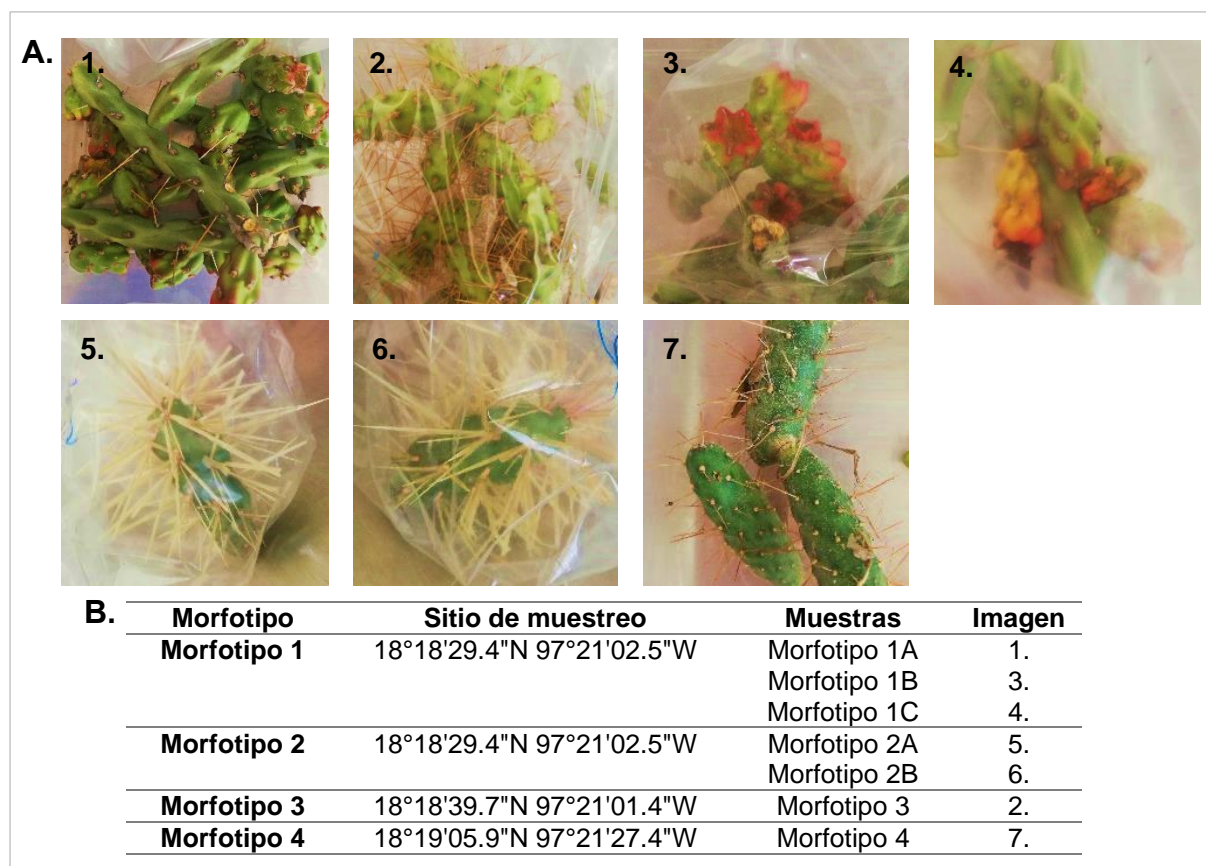


**Figura 3.** Localización de sitios de muestreo. **A.** Polígono de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, se observa la ubicación del municipio San Gabriel Chilac, resaltado en gris, donde fue realizado el muestreo. Adaptado de “Herpetofauna de la reserva de la biósfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán (etapa final)” (p.7), por M.G. Gutiérrez Mayen, 2007, BUAP-CONABIO, Proyecto BK019. **B.** Mapa de San Gabriel Chilac, que muestra los tres sitios donde se recolectaron las plantas y sus coordenadas. Adaptado de Google Maps.

Se obtuvieron muestras de siete individuos de cactus diferentes, con cuatro morfotipos distinguibles entre sí, pertenecientes al género *Cylindropuntia* sp. Los cactus fueron elegidos por su apariencia exterior (Figura 4).

El morfotipo 1 fue recolectado próximo a las coordenadas 18°18'29.4"N 97°21'02.5"W. Se recolectaron tres muestras de tres individuos diferentes pertenecientes morfotipo 1 por lo que se nombraron morfotipo 1A, 1B y 1C. Para el morfotipo 2 se recolectaron dos muestras de dos individuos diferentes próximo a las coordenadas 18°18'29.4"N 97°21'02.5"W, nombrándose morfotipo 2A y 2B. Del morfotipo 3 solo se recolectó una muestra en las coordenadas 18°18'39.7"N 97°21'01.4"W. El morfotipo 4 fue recolectado en las coordenadas 18°19'05.9"N 97°21'27.4"W y solo se recolectó una muestra (Figura 4).

Las muestras consistieron en fragmentos de las plantas elegidas, las cuales se obtuvieron por el corte de una de las ramas del cactus, que fueron depositadas en bolsas de polietileno estériles y se almacenaron en un recipiente aislado con hielo hasta que fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento. En el laboratorio las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C, hasta que fueron procesadas en los siguientes tres días.



**Figura 4. Cactáceas muestreadas. A.** Se observan las fotografías de los siete cactus muestreados, donde se distinguen los cuatro morfotipos de cactus; los cactus 1, 3 y 4, corresponden al morfotipo 1; los cactus 5 y 6 corresponden al morfotipo 2; el cactus 2, corresponde al morfotipo 3 y el cactus 7, corresponde al morfotipo 4. **B.** Se muestran los datos concentrados, el morfotipo, sitio de muestreo, las muestras obtenidas de cada morfotipo y su imagen correspondiente.

## 2. Aislamiento

Se realizaron aislamientos epífitos y endófitos de las siete muestras recolectadas. El aislamiento epífita se obtuvo al realizar una serie de lavados de la región externa de la cactácea recolectada (aprox. 5 cm<sup>2</sup>), con hisopos estériles empapados en una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril, los cuales se resuspendieron nuevamente en una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril y se les realizó una serie de diluciones seriadas decimales por triplicado.

Para el aislamiento endófito, primero se tomó un fragmento de la cactácea recolectada (aprox. 3 cm<sup>2</sup>) y se le realizó una serie de lavados con etanol al 100% e hipoclorito de sodio al 50% (v/v), seguidos de enjuagues con agua, con el fin de desinfectar la superficie externa del cactus. El fragmento ya desinfectado se trituró en un mortero estéril con solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM estéril; al líquido resultante se le realizaron diluciones seriadas decimales por triplicado.

Cada dilución obtenida de los dos aislamientos (epífita y endófito) se inoculó en dos tubos con medio mínimo MMS. Ambos tubos contenían metanol al 0.5% (v/v) como fuente única de carbono. A un tubo se le añadió Ca<sup>2+</sup> 30 μM como cofactor, y al segundo tubo Ce<sup>3+</sup> 30 μM. Esto fue realizado así al existir una variante de la enzima metanol deshidrogenasa que no trabaja con calcio como cofactor, la enzima alternativa XoxF utiliza Ce<sup>3+</sup> como cofactor y se ha reportado como ampliamente distribuida en organismos consumidores de metanol (Taubert et al., 2015).

Los tubos inoculados fueron incubados aproximadamente por treinta días a 30°C, hasta que presentaron crecimiento observable a simple vista. Los tubos que presentaron mayor crecimiento fueron resembrados en dos placas con medio MMS con 0.5% (v/v) de metanol como fuente única de carbono y con sus dos variantes correspondientes de cofactor (Ca<sup>2+</sup> y Ce<sup>3+</sup>). Las placas resembradas fueron incubadas de 7-10 días a 30°C. Se realizaron resiembras hasta obtener cultivos puros de colonias rosadas y colonias blanquecinas, puesto que, a pesar de que el género *Methylobacterium* característicamente presenta colonias color rosado, se ha reportado una minoría perteneciente al género carente de este pigmento (Anda et al., 2011; Green y Ardley, 2018). Finalmente, los cultivos puros fueron resembrados en medio de cultivo GP (Glicerol-peptona), a partir del cual, las colonias aisladas fueron conservadas en Glicerol al 50% (v/v) a -70°C.

## 3. PCR en colonia

Fueron obtenidas en total 93 cepas presuntivas. Con el fin de disminuir el número de cepas a las cuales se les realizaría la extracción de ADN, se llevó a cabo un PCR en colonia del gen 16S rRNA. La amplificación se llevó a cabo por medio de oligonucleótidos universales, que amplificaron un fragmento de 1365 pb (pares de bases), usando el oligonucleótido directo UN27F (5' TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3') y el oligonucleótido reverso UN1392R (5' CAG GGG CGG TGT GTA CA 3'). La mezcla de reacción de PCR consistió en 1 μl de la colonia suspendida en 1000 μl de agua destilada previamente congelada para asegurar la lisis bacteriana, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania), 200 μM de cada dNTP's, 10 μM de cada oligonucleótido y 67 mM de buffer, la mezcla se completó con

agua a un volumen final de 50  $\mu$ l. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 8 minutos, seguido de 26 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento 57 °C por 45 segundos y una extensión a 72 °C por 1 minuto; seguido de un paso de extensión final de 72 °C por 10 minutos. Las amplicones se corrieron en geles de agarosa 1% (p/v) y buffer 0.5X Tris-acetato/EDTA (TAE) a 80 V durante 45 min.

#### **4. Extracción de ADN**

Se extrajo ADN genómico de 80 cepas de las que no fue posible observar amplicones de PCR en colonia. Se utilizaron dos kits diferentes de extracción de DNA genómico, el Bacteria DNA Preparation Kit -spin columns-based de Jena Bioscience y el kit Wizard Genomic DNA Purification Kit, de Promega. Con ambos, se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se verificó la pureza del ADN con agarosa al 1% (p/v) y buffer 0.5X Tris-acetato/EDTA (TAE) a 80 V durante 30 min.

#### **5. Amplificación de la región de ADN que codifica la subunidad 16S rRNA**

A los 80 aislamientos a los cuales se les realizó la extracción de ADN, se les realizó amplificación del gen que codifica la subunidad 16S rRNA. Se utilizaron los mismos oligonucleótidos universales utilizados para la PCR en colonia. La mezcla de reacción de PCR fue la siguiente: 25 ng de ADN, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania), 200  $\mu$ M de cada dNTP's, 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 67 mM de buffer, la mezcla se completó con agua a un volumen final de 50  $\mu$ l. Las condiciones del programa de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 26 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento 57 °C por 45 segundos y una extensión del iniciador a 72 °C por 1 minuto; seguido de un paso de extensión final de 72 °C por 10 minutos. Las amplificaciones de PCR se analizaron en geles de agarosa 1% (p/v) y buffer 0.5X Tris-acetato/EDTA (TAE) a 80 V durante 45 min.

#### **6. Análisis de fragmentos de restricción de la amplificación del gen 16S rRNA (ARDRA)**

Con el fin de agrupar cepas idénticas y disminuir la cantidad de muestras a secuenciar, a los productos de amplificación del gen 16S rRNA obtenidos por PCR del conjunto de aislamientos (93 cepas), se les realizó una restricción enzimática con las endonucleasas *CfoI* (Promega Inc., Madison, EE. UU.) y *HinI* (Promega Inc., Madison, EE. UU.) por separado, a un volumen total de 10  $\mu$ l a 37°C, durante 4 horas. La mezcla contenía 4  $\mu$ l del producto de PCR, 1  $\mu$ l de buffer de restricción 10X, 4.8  $\mu$ l de agua tridestilada estéril y 0.2  $\mu$ l de enzima de restricción. El amplicón digerido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) y buffer 0.5X Tris-acetato/EDTA (TAE) a 100 V durante 45 minutos. Los patrones se compararon por inspección visual de los bandeos entre las cepas aisladas. Los patrones se consideraron idénticos cuando todos los bandeos tenían la misma distancia de migración aparente.

## 7. Secuenciación de ADN

De los 93 aislamientos a los cuales se les realizó ARDRA, 40 fueron seleccionados para secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Los productos amplificados obtenidos se purificaron usando PCR Purification Kit de Jena Bioscience, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se empleó UN27F como oligonucleótido de secuenciación. La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger, en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM ([www.ibt.unam.mx/sintesis/sintesis/secuenciacion.html](http://www.ibt.unam.mx/sintesis/sintesis/secuenciacion.html)). Posteriormente, 28 cepas fueron reenviadas con el oligonucleótido reverso UN1392R para obtener una secuencia casi completa y corregida de las cepas seleccionadas.

## 8. Análisis de secuencia

El alineamiento de las secuencias obtenidas se realizó en el programa BioEdit 7.0.2. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI), utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Los árboles filogenéticos basados en el gen 16S rRNA se reconstruyeron con secuencias de cepas tipo, recuperadas del GeneBank. Las secuencias de referencia se alinearon utilizando MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) Versión X.

## 9. Variabilidad genética

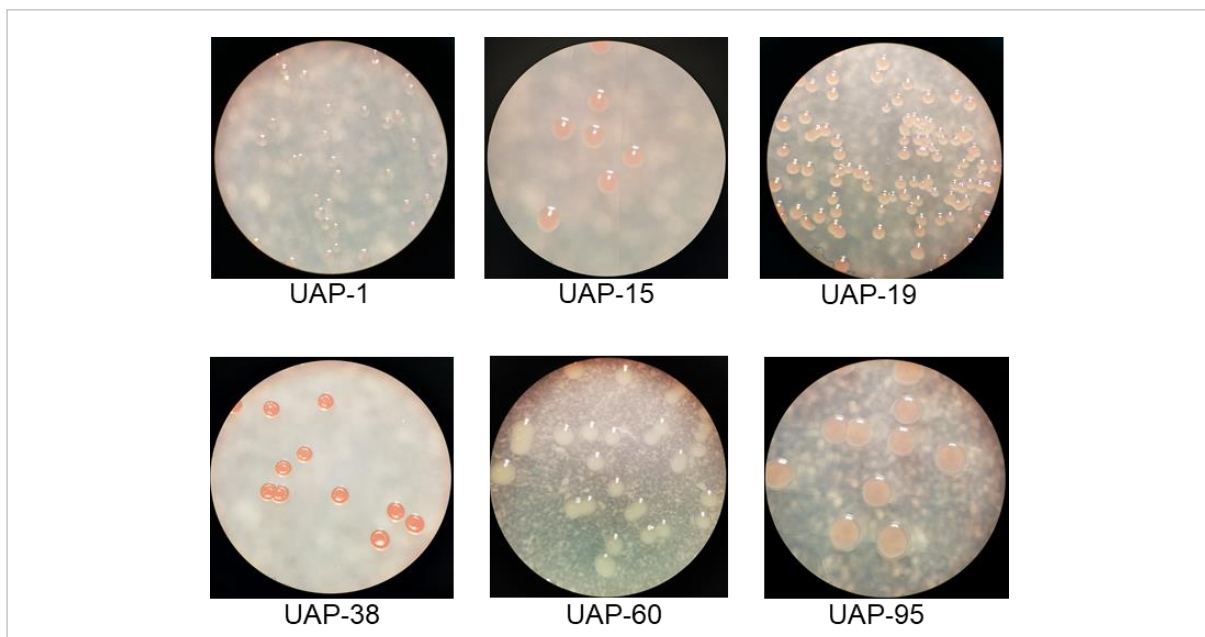
De los aislamientos confirmados por secuenciación, como pertenecientes al género *Methylobacterium* (28 cepas) y los aislamientos que se caracterizaron parcialmente al observar similitud de bandeos con los patrones mostrados por las cepas confirmadas como *Methylobacterium* (30 cepas) en el análisis ARDRA, fueron seleccionados 30 aislados, a los cuales se les realizó la técnica de huellas genéticas BOX-PCR. Se realizó la amplificación a 30 aislados seleccionados (23 cepas confirmadas *Methylobacterium* y siete cepas probables *Methylobacterium*) con el oligonucleótido BOX-A1R (5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3', IBT, UNAM). Las reacciones de amplificación se realizaron a un volumen de 8 µl, que contenían 71 µM del oligonucleótido individual BOX-A1R, 200 µM de cada dNTP's, 67 mM de buffer, 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania) y como plantilla 1 µl de ADN total. La reacción se llevó a cabo con un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 52°C durante 1 minuto y 71°C durante 1 minuto, se añadió una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos se separaron por electroforesis en geles de agarosa 3% (p/v) y buffer 0.5X TBE (Trisborato-EDTA), durante 90 minutos a 80 V. Se realizaron amplificaciones en ensayos separados de cepas elegidas para garantizar la reproducibilidad de los patrones. Las huellas genéticas se analizaron visualmente comparando los bandeos obtenidos. Los patrones se consideraron idénticos cuando todos los bandeos tenían la misma distancia de migración aparente.

## Resultados y discusión de resultados

### 1. Aislamientos metilotróficos de la filosfera y endosfera de *Cylindropuntia* sp.

Inicialmente se aislaron 103 cepas presuntivas de la filosfera y endosfera de las cactáceas muestreadas del género *Cylindropuntia* sp. Se aislaron bacterias en un medio selectivo con metanol, que les permitió utilizarlo como su única fuente de carbono. Al crecer posteriormente en medio rico GP, se demostró que las cepas aisladas podían crecer tanto en metanol como en presencia de otros sustratos, evidenciando su capacidad metilotrofa facultativa. No obstante, 10 de las cepas presuntivas fueron excluidas del análisis, al no continuar creciendo en los medios empleados.

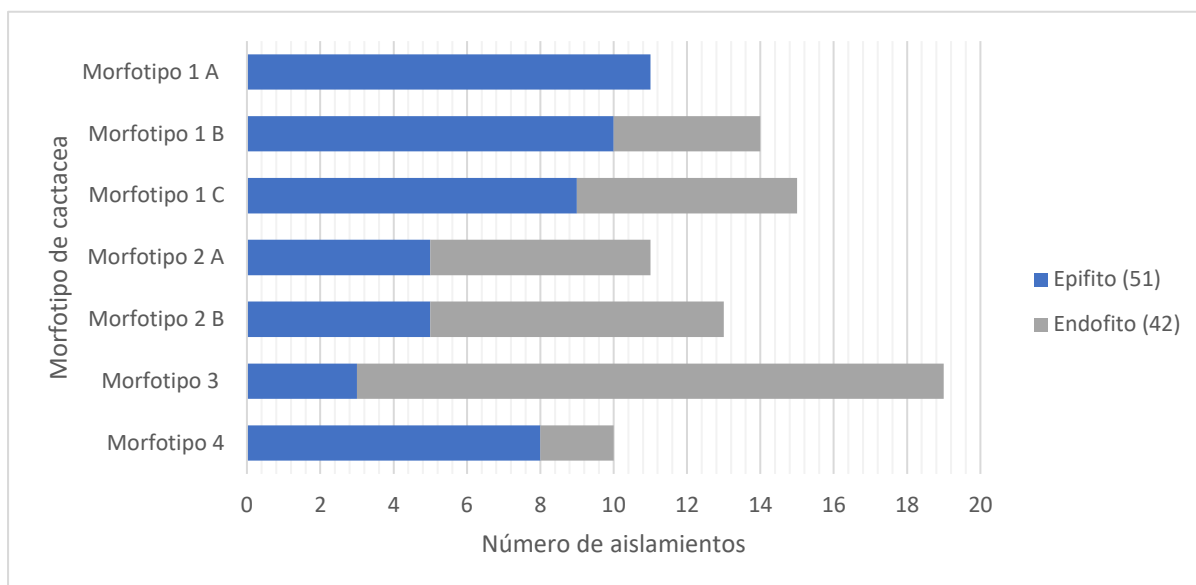
De las 93 cepas aisladas, el 63% de ellas producían un pigmento rosado, mientras que el otro 37% no lo presentaba. Las cepas rosadas (de diversas intensidades de color e incluso tonos anaranjados) en medio MMS eran colonias pequeñas de tamaño variable, generalmente de menos de 3 mm de diámetro, circulares, con bordes, consistencia y superficie variables. Las cepas sin pigmento rosado, presentaban apariencia blanquecina-transparente, con colonias de menos de 3 mm de diámetro, circulares, mucosas, brillantes (Figura 5).



**Figura 5.** Morfología colonial en medio sólido MMS de cepas aisladas de *Cylindropuntia* sp. Se observa la coloración rosa en las cepas UAP-1, UAP-15, UAP-19, UAP-38 y UAP-95; la cepa UAP-60 ejemplifica la coloración blanquecina observada en algunos aislamientos.

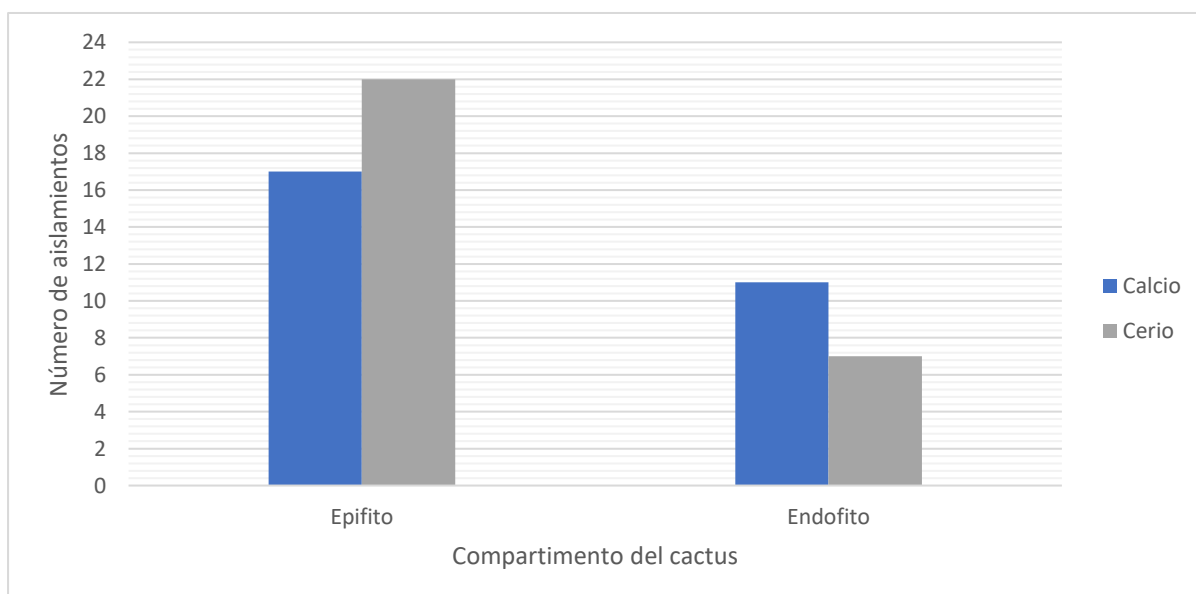
De forma general se obtuvieron 51 aislados epifitos y 42 aislados endófitos. En mayor proporción se obtuvieron aislamientos epifitos, a excepción del morfotipo 2B y del morfotipo 3, en los que se obtuvo un mayor aislamiento endófito, en el morfotipo 2A se obtuvo similar número de aislamientos de la región interna y externa de la planta (Figura 6).





**Figura 6.** Aislamientos epifitos y endófitos por morfotipo de cactácea. En el muestreo inicial se observó un mayor aislamiento de cepas epifitas (morfotipos 1 A, 1B, 1C y 4), en el morfotipo 2B y 3, se observa que el aislamiento endófito es mayor que el epifito, mientras que para el morfotipo 2A tanto el aislamiento epifito como endófito es similar. Para más detalle de morfotipos Ver Figura 4.

Anteriormente se mencionó la utilización de los cofactores  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ce}^{3+}$  en el crecimiento de los aislados. Estos fueron empleados en el aislamiento, ya que, la enzima clásica (MDH-MxaFI) encargada de la degradación del metanol emplea calcio como cofactor, y la enzima alternativa (MDH-XoxF) un lantánido ligero. En la región epifita se obtuvo un mayor número de aislamientos que habían crecido en cerio que en calcio. Lo opuesto ocurrió en la región endófito, en la cual se registró un mayor número de aislamientos con el cofactor calcio (Figura 7).

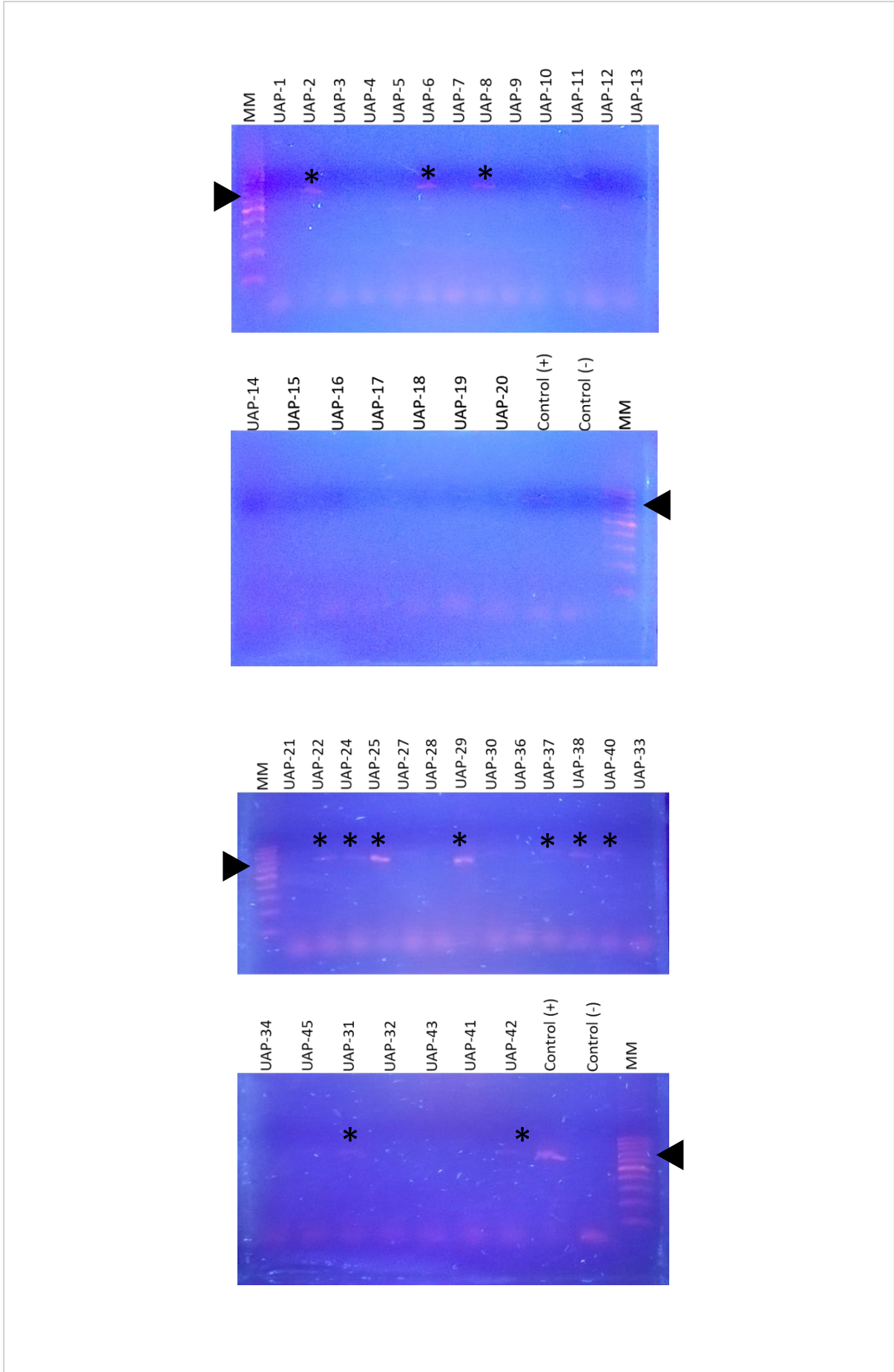


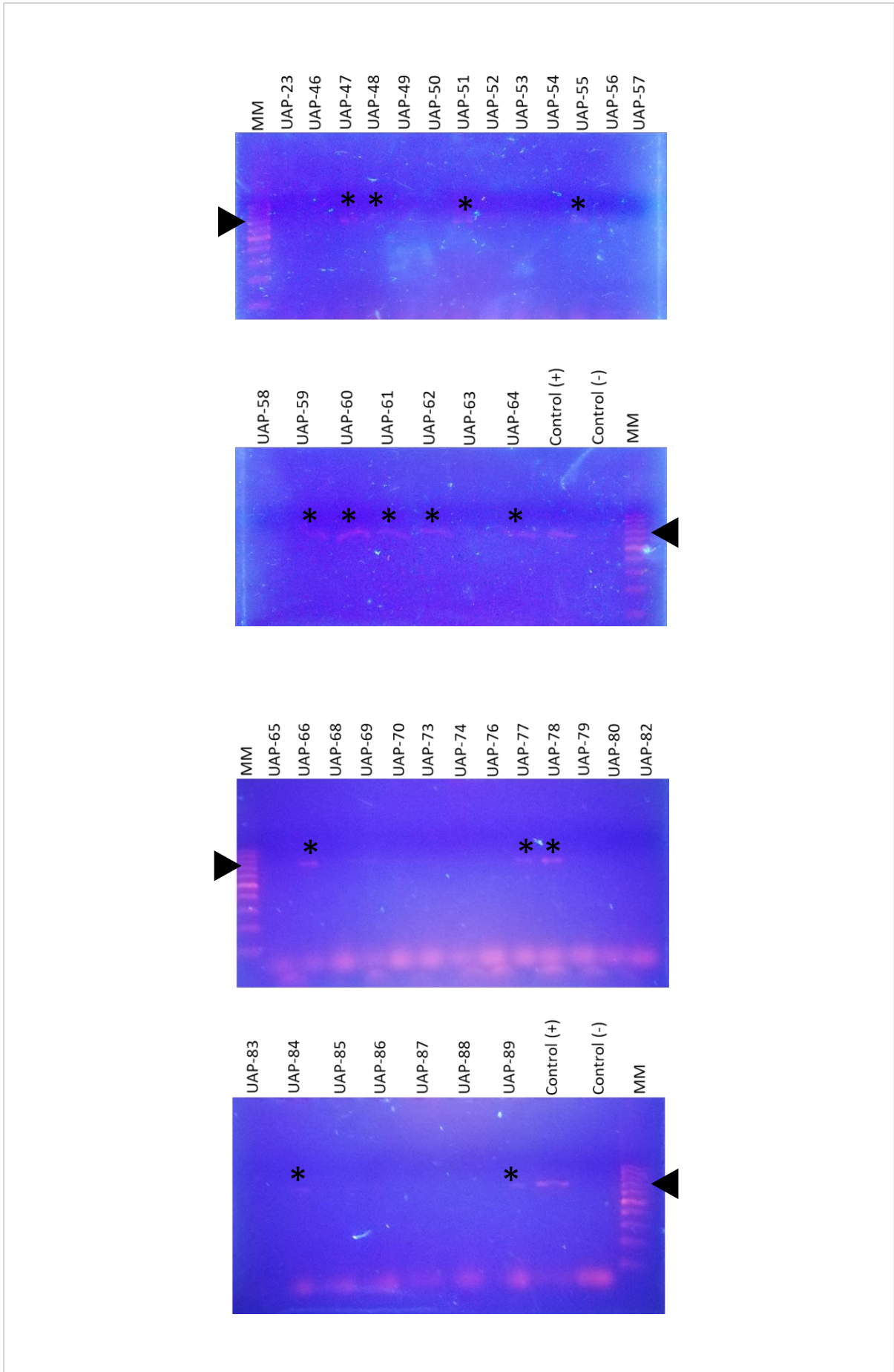
**Figura 7.** Preferencia de los aislamientos por cofactor empleado. Se observa que la región epifita muestra un aislamiento mayor en compañía del cofactor cerio, mientras que en la región endófito se obtuvo un mayor número de aislamientos en compañía del cofactor calcio.

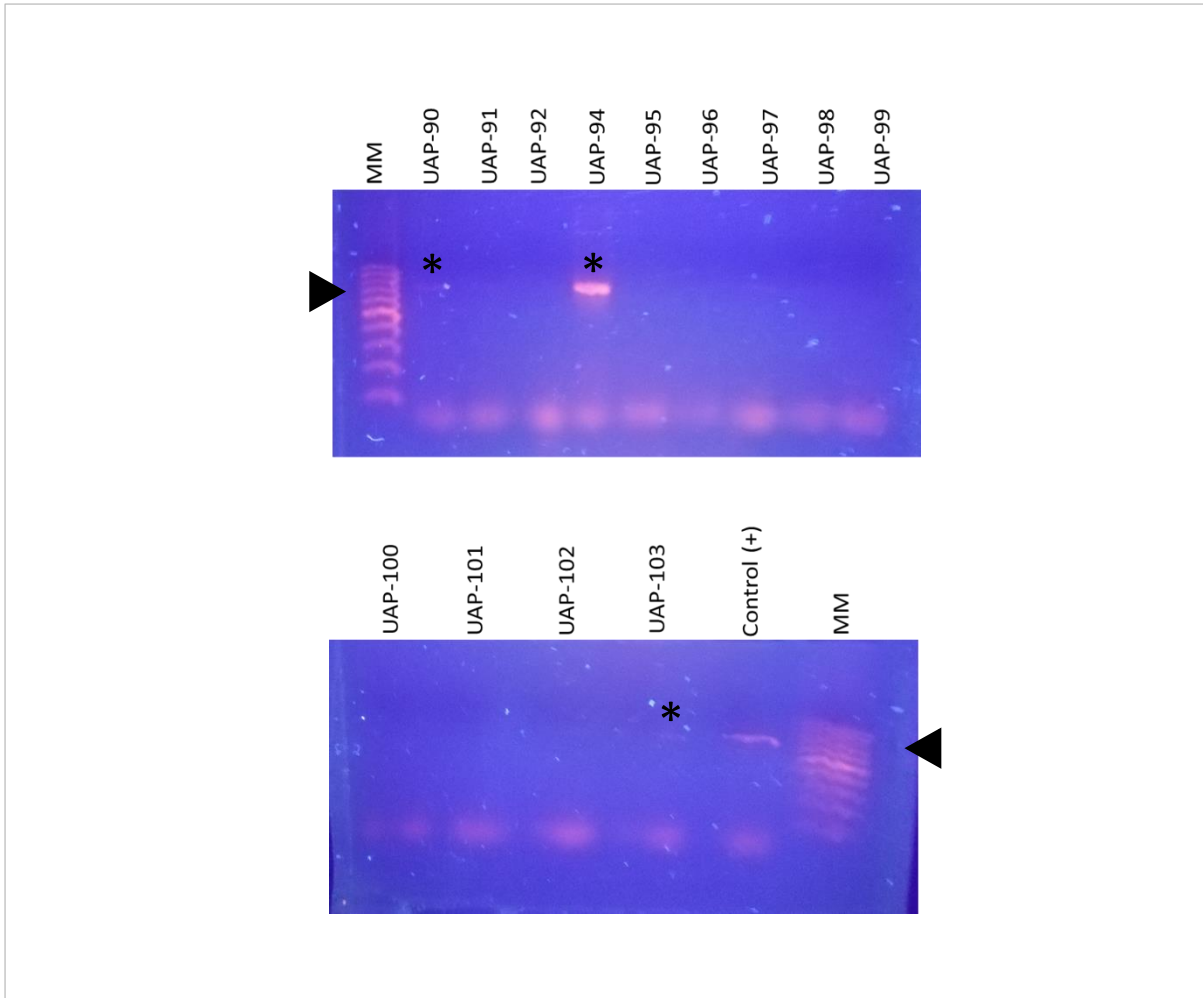
## 2. Caracterización genética

Para disminuir el número de extracciones de ADN se intentó amplificar el gen 16S rRNA de los 103 aislamientos iniciales por PCR en colonia (Figura 8). Se logró amplificar 29 cepas (UAP-2, UAP-6, UAP-8, UAP-22, UAP-24, UAP-25, UAP-29, UAP-31, UAP-37, UAP-38, UAP-40, UAP-42, UAP-47, UAP-48, UAP-51, UAP-55, UAP-59, UAP-60, UAP-61, UAP-62, UAP-64, UAP-66, UAP-77, UAP-78, UAP-84, UAP-89, UAP-90, UAP-94 y UAP-103), de las cuales, el 72% de cepas amplificadas correspondían a cepas sin pigmento rosa, y que presentaban colonias blanquecinas. Sin embargo, solo fueron utilizados los amplificados de 13 cepas (UAP-2, UAP-6, UAP-8, UAP-47, UAP-51, UAP-60, UAP-61, UAP-62, UAP-64, UAP-66, UAP-77, UAP-78 y UAP-94) debido a que algunos amplificados obtenidos por PCR en colonia no permitían la obtención de patrones ARDRA satisfactorios.

Los productos obtenidos por PCR en colonia (13 cepas) y por PCR convencional (80 cepas), se sometieron al análisis de fragmentos de restricción de la amplificación del gen 16S rRNA (ARDRA), utilizando las enzimas de restricción *CfoI* y *HinI*. Los fragmentos obtenidos se analizaron comparando por inspección visual de los patrones. Para la enzima de restricción *CfoI*, los patrones obtenidos no permitieron la diferenciación de aislamientos, por lo que los patrones obtenidos con esta enzima no fueron utilizados para agrupar cepas, se obtuvieron en su mayoría patrones menores de 400 pb, a excepción de los aislamientos UAP-40, UAP-29 y UAP-94 (Figura 9). Por otro lado, la enzima de restricción *HinI*, produjo patrones diferenciables que permitieron agrupar los aislados en al menos 10 grupos (Figura 10), entre los cuales también figuran cepas con patrones únicos, de las agrupaciones formadas se tomó al menos un representante y se envió a secuenciación.

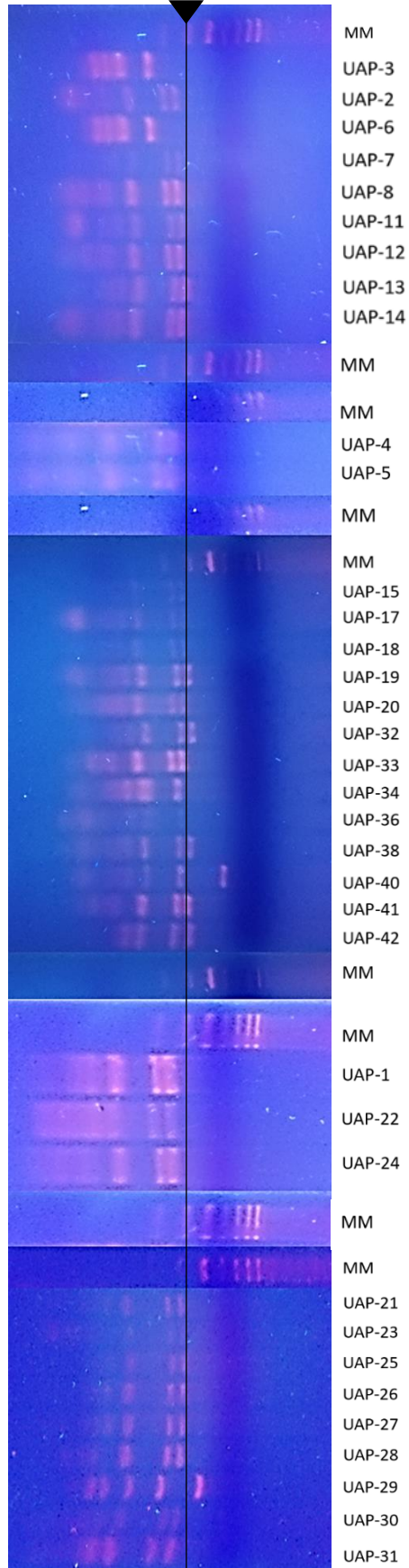


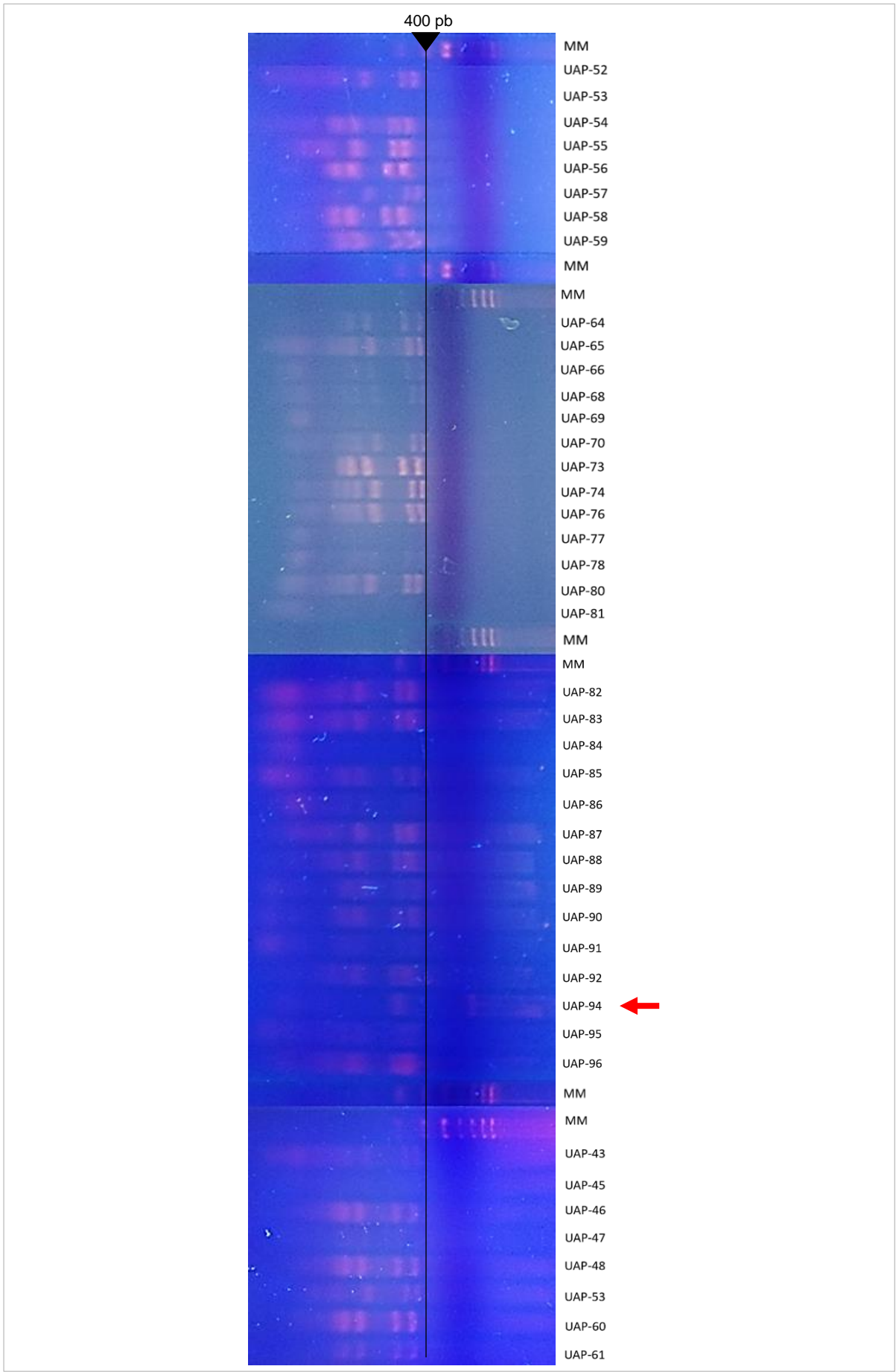


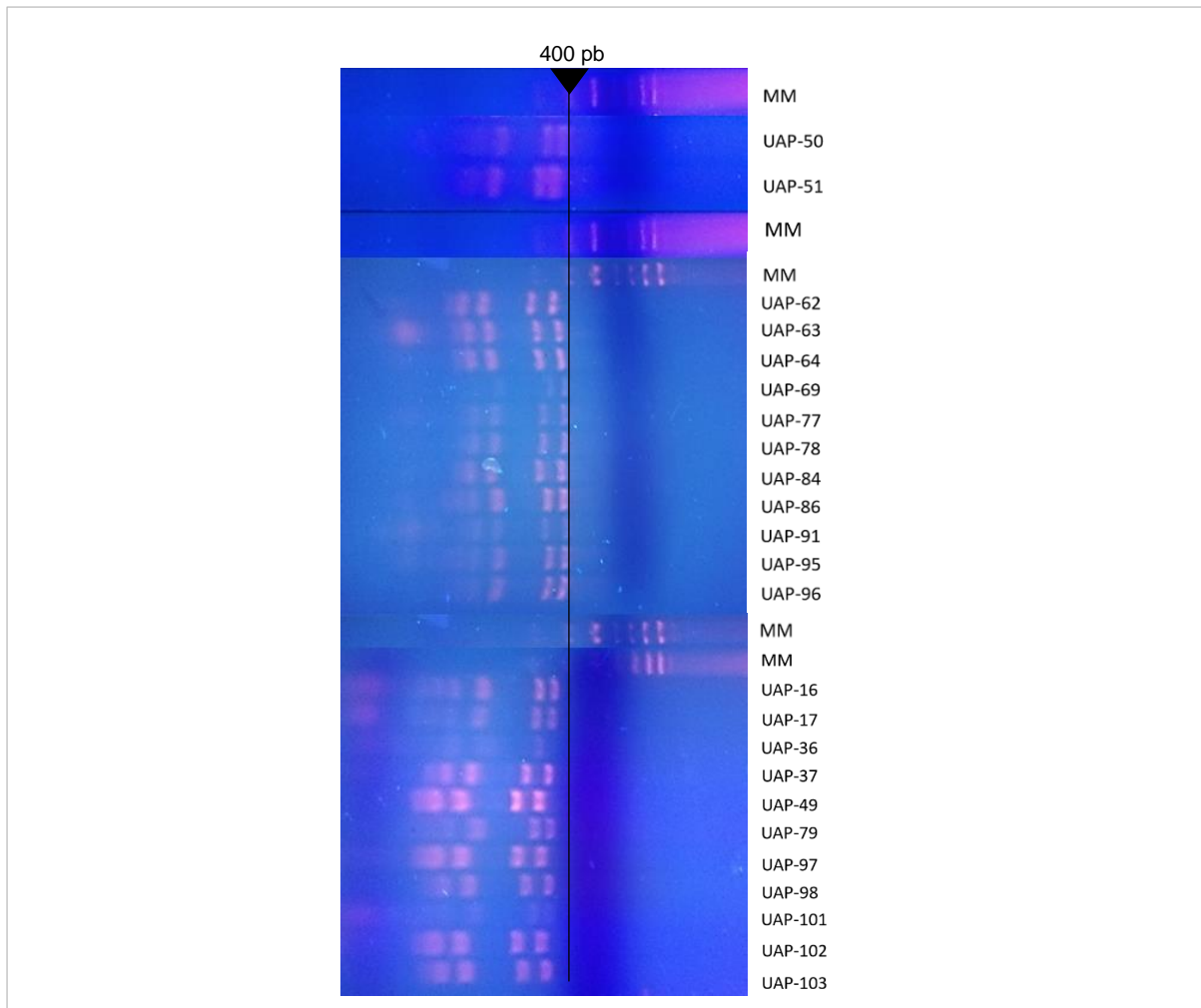


**Figura 8.** Conjunto de resultados obtenidos por PCR en colonia del gen 16S rRNA. ► corresponde a 1400 pb, \* corresponde a la amplificación del gen 16S rRNA, marcador 200 pb, Control positivo: ADN genómico de cepa caracterizada.

400 pb

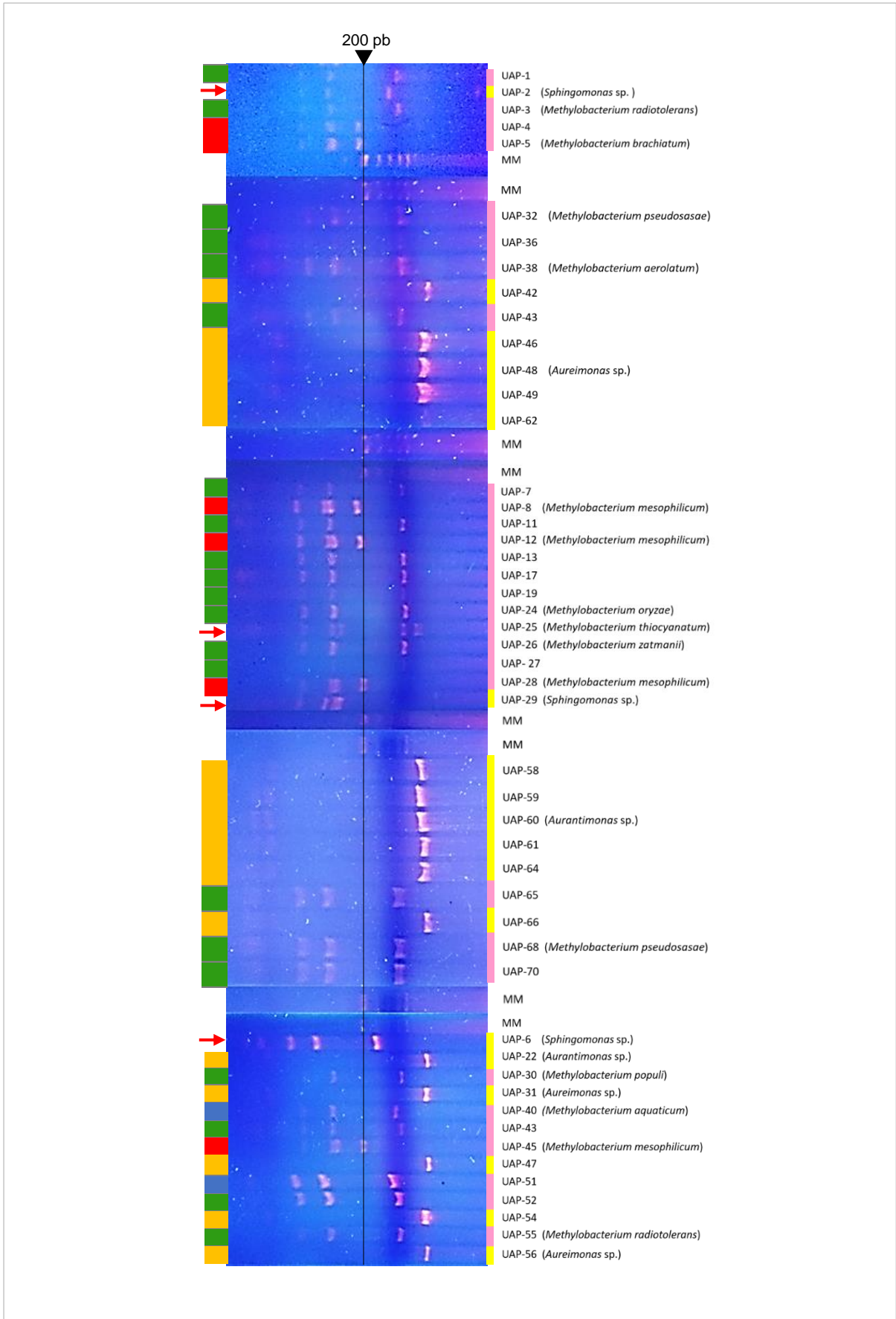


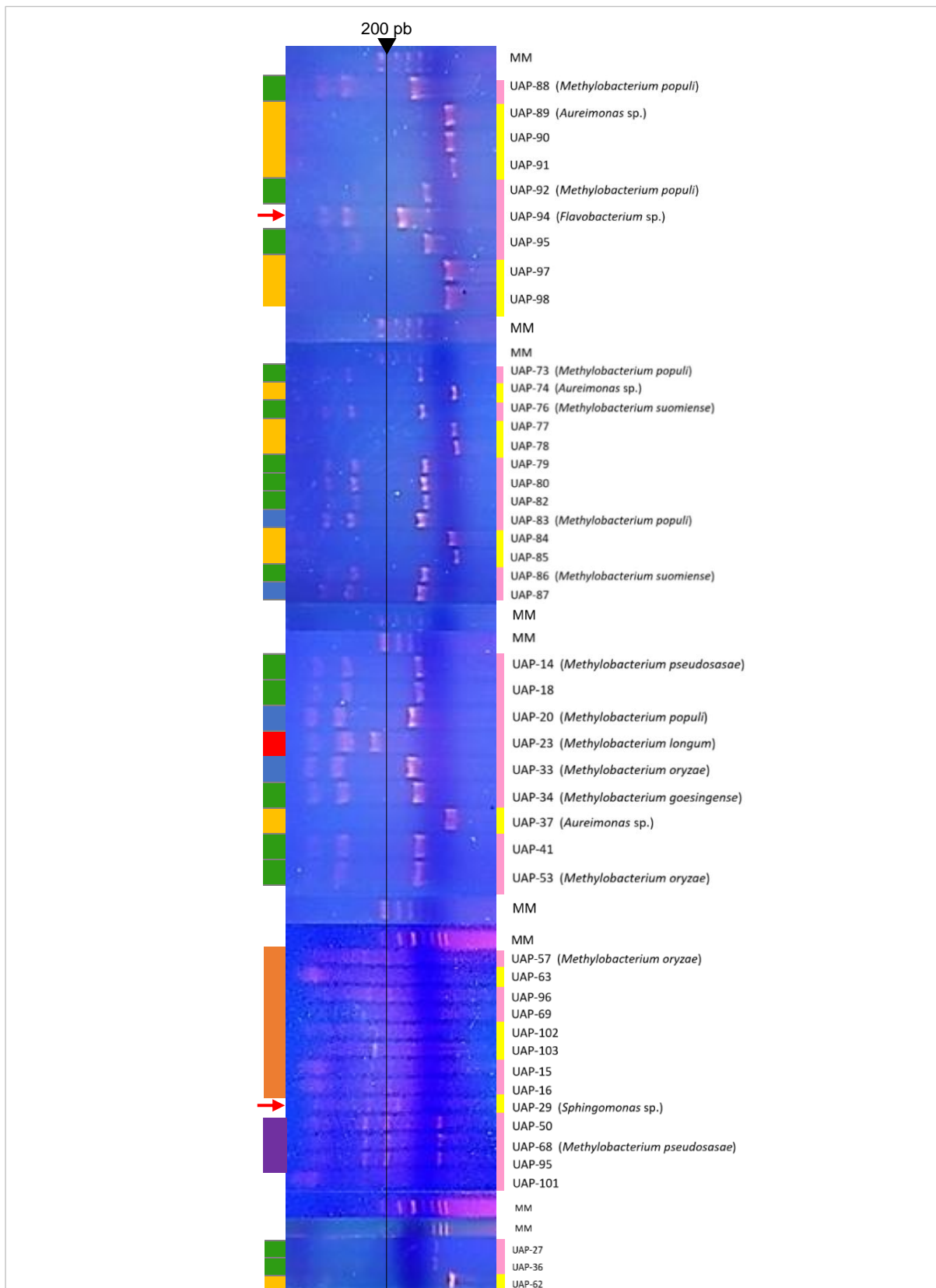




**Figura 9.** Fragmentos de restricción obtenidos a partir del uso de la enzima de restricción *CfoI* en amplificadas 16s *rRNA*. Se obtuvieron en su mayoría bandeos menores a 400 pb, exceptuando las cepas UAP-29, UAP-40 y UAP-94 marcadas con una flecha roja. Los patrones obtenidos son similares entre sí, a excepción de cepas donde su patrón es más diferenciable de las demás, como la cepa UAP-3, UAP-6, UAP-29, UAP-40 y UAP-94. ► corresponde a 400 pb.







**Figura 10.** Análisis de fragmentos de restricción obtenidos a partir del uso de la enzima de restricción *HinfI* en amplificados de 16S rRNA. Se observan los amplificadores obtenidos con el uso de la enzima de restricción *HinfI*, del lado derecho se encuentra el nombre del aislado, seguido entre paréntesis del género y en su caso especie obtenido por secuenciación. Del lado derecho del gel se visualiza la coloración de la cepa, donde rosa corresponde a cepas rosadas y amarillo para cepas blancas. Del lado izquierdo de los gels se muestran por colores las agrupaciones formadas, las flechas rojas indican un patrón único, MM (marcador molecular 200 pb).

Se realizó una primera ronda de secuenciación del gen 16S rRNA con el oligonucleótido directo UN27F en 40 aislamientos seleccionados previamente por su patrón ARDRA (Tabla 1). Al comparar las secuencias obtenidas en la base de datos se obtuvo que 12 de las cepas enviadas no pertenecían al género *Methylobacterium*. Los géneros de las 12 cepas no pertenecientes al género *Methylobacterium* fueron identificadas como *Sphingomonas* sp. (UAP-2, UAP-6 y UAP-29), *Aurantimonas* sp. (UAP-22 y UAP-60), *Aureimonas* sp. (UAP-31, UAP-37, UAP-48, UAP-56, UAP-74 y UAP-89) y *Flavobacterium* sp. (UAP-94). Las bacterias pertenecientes a los géneros *Sphingomonas* sp., *Aurantimonas* sp., *Aureimonas* sp. y *Flavobacterium* sp. se distribuyen ampliamente en la naturaleza. *Sphingomonas* sp. y *Flavobacterium* sp. son reportados como colonizadores abundantes en la filosfera de *Arabidopsis thaliana* (Innerebner et al, 2011; Bodenhausen et al., 2013). *Aurantimonas* sp. se reporta como colonizador de filosfera y raíces en plantas de soja (Anda et al, 2011). Mientras que *Aureimonas* sp. recientemente se ha aislado como endófito de plantas medicinales (Webster et al., 2020).

Al analizar las características fenotípicas de las cepas no pertenecientes al género *Methylobacterium* se reveló que 11 de ellas no presentaban pigmento rosado observándose en medio mínimo como colonias blanquecinas (UAP-2, UAP-6, UAP-29, UAP-22, UAP-60, UAP-31, UAP-37, UAP-48, UAP-56, UAP-74 y UAP-89). Además, al comparar sus patrones obtenidos en ARDRA con la enzima de restricción *Hinfl* se observó que los patrones de 11 de las cepas confirmadas como no pertenecientes al género *Methylobacterium* compartían similitud de patrones ARDRA con otros 23 aislados que igualmente presentaban ausencia de pigmentación rosa. Por lo que, con los datos obtenidos con la secuenciación y por comparación de los patrones obtenidos en el análisis de ARDRA, se eliminaron del análisis 34 aislamientos (UAP-2, UAP-6, UAP-22, UAP-29, UAP-31, UAP-37, UAP-42, UAP-46, UAP-47, UAP-48, UAP-49, UAP-54, UAP-56, UAP-58, UAP-59, UAP-60, UAP-61, UAP-62, UAP-63, UAP-64, UAP-66, UAP-74, UAP-77, UAP-78, UAP-81, UAP-84, UAP-85, UAP-89, UAP-90, UAP-91, UAP-97, UAP-98, UAP-102 y UAP-103).

Por otro lado, la cepa UAP-94, confirmada como no perteneciente al género *Methylobacterium*, al analizar sus características fenotípicas se observó que presentaba pigmento rosa en medio mínimo MMS. Además, su crecimiento en medio rico GP se visualizó como colonias cafés, diferentes del resto de los aislamientos. Al analizar sus patrones ARDRA para las dos enzimas empleadas (*Hinfl* y *Cfol*), se observó que no compartía similitud de patrón ARDRA con ningún otro aislamiento. Lo que se confirma y se relaciona con que fue el único aislamiento del género *Flavobacterium* sp. obtenido. El aislamiento UAP-94 fue el único aislamiento no perteneciente al género *Methylobacterium* que presentaba pigmentación rosada. Se reporta para este género la producción de un carotenoide naranja-amarillo (Kolton et al., 2016). Sin embargo, también se reporta que varias especies del género *Flavobacterium* sp. pueden producir pigmentos de rosa a marrón dependiendo del contenido del medio en el que se cultiven, lo que explicaría lo observado en su aislamiento (Bernardet y Bowman, 2015).

Las restantes 28 cepas de las 40 enviadas a secuenciar se confirmaron como *Methylobacterium* sp., y fueron reenviadas para una segunda ronda de secuenciación con el oligonucleótido reverso UN1392R. Con las secuencias obtenidas se obtuvo una secuencia consenso, que se revisó y corrigió con su correspondiente electroferograma con el fin de corregir errores en la secuencia previamente obtenida. Las secuencias 16S rRNA de los 28 aislados pertenecientes a *Methylobacterium* sp. se depositaron en GeneBank con los siguientes números de acceso: MW301159, MW301160, MW301161, MW301162, MW301163, MW301164, MW301165, MW301166, MW301167, MW301168, MW301169, MW301170, MW301171, MW301172, MW301173, MW301174, MW301175, MW301176, MW301177, MW301178, MW301179, MW301180, MW301182, MW301183, MW301181, MW301184, MW301185 y MW301186 (Tabla 1).

Con los datos obtenidos de las dos secuenciaciones, se obtuvo una secuencia más completa, con la cual se obtuvo que las 28 cepas enviadas pertenecen a las especies *M. radiotolerans* (UAP-3 y UAP-55), *M. brachiatum* (UAP-5), *M. mesophilicum* (UAP-8, UAP-12, UAP-28, y UAP-45), *M. pseudosasaе* (UAP-14, UAP-32 y UAP-68), *M. suomiense* (UAP-20, UAP-76 y UAP-86), *M. longum* (UAP-2), *M. oryzae* (UAP-24, UAP-33, UAP-53, y UAP-57), *M. populi* (UAP-30, UAP-73, UAP-83, UAP-88 y UAP-92), *M. thiocyanatum* (UAP-25), *M. zatmanii* (UAP-26), *M. goesingense* (UAP-34), *M. aerolatum* (UAP-38) y *M. aquaticum* (UAP-40), y se construyó un árbol filogenético usando *Sphingomonas aeria* como género externo (Figura 11). Los patrones ARDRA de las 28 cepas confirmadas como *Methylobacterium* se compararon con los patrones ARDRA obtenidos con la enzima de restricción *Hinf*I de cepas no secuenciadas. Se observó una similitud de patrones ARDRA entre los aislamientos confirmados *Methylobacterium* y los no confirmados que presentaban el fenotipo de pigmento rosado. Por lo que, 30 aislados se consideraron como probables *Methylobacterium* (UAP-1, UAP-4, UAP-7, UAP-11, UAP-13, UAP-15, UAP-16, UAP-17, UAP-18, UAP-19, UAP-21, UAP-27, UAP-36, UAP-41, UAP-43, UAP-50, UAP-51, UAP-52, UAP-65, UAP-69, UAP-70, UAP-79, UAP-80, UAP-82, UAP-87, UAP-95, UAP-96, UAP-99, UAP-100, UAP-101).

El género *Methylobacterium* característicamente, es reconocido por producir un carotenoide rosa, el cual, se sugiere sirve de protección frente a los rayos UV (Jacobs et al., 2004; Yoshida et al., 2017). Sin embargo, dentro del género dos especies son atípicamente no pigmentadas *M. jeotgali* y *M. nodulans* (Green y Ardley, 2018). Por lo que en este estudio se decidió aislar cepas con pigmento rosa y sin él. Aunque nuestros aislamientos revelan que no se obtuvieron cepas del género *Methylobacterium* sin pigmento rosa característico, el indicativo de pigmentación rosa no es siempre apropiado para representar a todo el género en la naturaleza, como menciona Anda et al. en 2011. Sus aislamientos provenientes de tallo de soja revelaron especies del género *Methylobacterium* no pigmentadas.

Los aislamientos pigmentados de este trabajo pueden estar relacionados con el compartimento muestreado del cactus (filosfera y endosfera) y la necesidad del género de protegerse de las duras condiciones solares a las que están expuestos en la superficie del cactus (Lindow y Brandl, 2003).

Las 13 especies de *Methylobacterium* confirmadas obtenidas en este trabajo han sido ampliamente reportadas como habitantes de la filosfera y endosfera de plantas en numerosos trabajos. *M. radiotolerans* (de Andrade et al., 2018; Knief et al., 2010a; Knief et al., 2008), *M. brachiatum* (Knief et al., 2010a), *M. mesophilicum* (Knief et al., 2010a; Knief et al., 2008), *M. pseudosasaiae* (Madhaiyan y Poonguzhali, 2013), *M. suomiense* (Raja et al., 2008), *M. longum* (Knief et al., 2012), *M. oryzae* (Knief et al., 2008), *M. populi* (Raja et al., 2008), *M. thiocyanatum* (Raja et al., 2008; Knief et al., 2008), *M. zatmanii* (Pattnaik et al., 2017), *M. goesingense* (Knief et al., 2008; Knief et al., 2012), *M. aerolatum* (Tani et al., 2015) y *M. aquaticum* (Knief et al., 2012).

Entre las 13 especies confirmadas como *Methylobacterium* la especie con mayor número de aislamientos caracterizados como tal, fue la especie *M. populi*. Similar a lo que reporta Raja et al. en el 2008 en la filosfera de algodón, maíz, girasol, soja y planta de menta. En sus aislamientos *M. populi* resultó ser la especie dominante.

<b>Tabla 1.</b> Caracterización genética de 40 aislamientos de filosfera y endosfera de <i>Cylindropuntia</i> sp.			
Aislado	Género y/o especie (basados en gen 16S rRNA)	Número de acceso NCBI	Porcentaje de identidad
UAP-2	<i>Sphingomonas</i> sp.	Sin número de acceso	98%
UAP-3	<i>M. radiotolerans</i>	MW301159	99%
UAP-5	<i>M. brachiatum</i>	MW301160	84%
UAP-6	<i>Sphingomonas</i> sp.	Sin número de acceso	96%
UAP-8	<i>M. mesophilicum</i>	MW301161	98%
UAP-12	<i>M. mesophilicum</i>	MW301162	95%
UAP-14	<i>M. pseudosasae</i>	MW301163	87%
UAP-20	<i>M. suomiense</i>	MW301164	98%
UAP-22	<i>Aurantimonas</i> sp.	Sin número de acceso	98%
UAP-23	<i>M. longum</i>	MW301165	98%
UAP-24	<i>M. oryzae</i>	MW301166	98%
UAP-25	<i>M. thiocyanatum</i>	MW301167	98%
UAP-26	<i>M. zatmanii</i>	MW301168	97%
UAP-28	<i>M. mesophilicum</i>	MW301169	97%
UAP-30	<i>M. populi</i>	MW301170	95%
UAP-31	<i>Aureimonas</i> sp.	Sin número de acceso	90%
UAP-32	<i>M. pseudosasae</i>	MW301171	98%
UAP-33	<i>M. oryzae</i>	MW301172	97%
UAP-34	<i>M. goesingense</i>	MW301173	98%
UAP-37	<i>Aureimonas</i> sp.	Sin número de acceso	96%
UAP-38	<i>M. aerolatum</i>	MW301174	92%
UAP-40	<i>M. aquaticum</i>	MW301175	95%
UAP-45	<i>M. mesophilicum</i>	MW301176	98%
UAP-48	<i>Aureimonas</i> sp.	Sin número de acceso	92%
UAP-53	<i>M. oryzae</i>	MW301177	84%
UAP-55	<i>M. radiotolerans</i>	MW301178	89%
UAP-56	<i>Aureimonas</i> sp.	Sin número de acceso	92%
UAP-57	<i>M. oryzae</i>	MW301179	97%
UAP-60	<i>Aurantimonas</i> sp.	Sin número de acceso	99%
UAP-68	<i>M. pseudosasae</i>	MW301180	97%
UAP-73	<i>M. populi</i>	MW301182	99%
UAP-74	<i>Aureimonas</i> sp.	Sin número de acceso	95%
UAP-76	<i>M. suomiense</i>	MW301183	94%
UAP-83	<i>M. populi</i>	MW301181	98%
UAP-86	<i>M. suomiense</i>	MW301184	95%
UAP-88	<i>M. populi</i>	MW301185	95%
UAP-89	<i>Aurantimonas</i> sp.	Sin número de acceso	96%
UAP-92	<i>M. populi</i>	MW301186	96%
UAP-94	<i>Flavobacterium</i> sp.	Sin número de acceso	90%

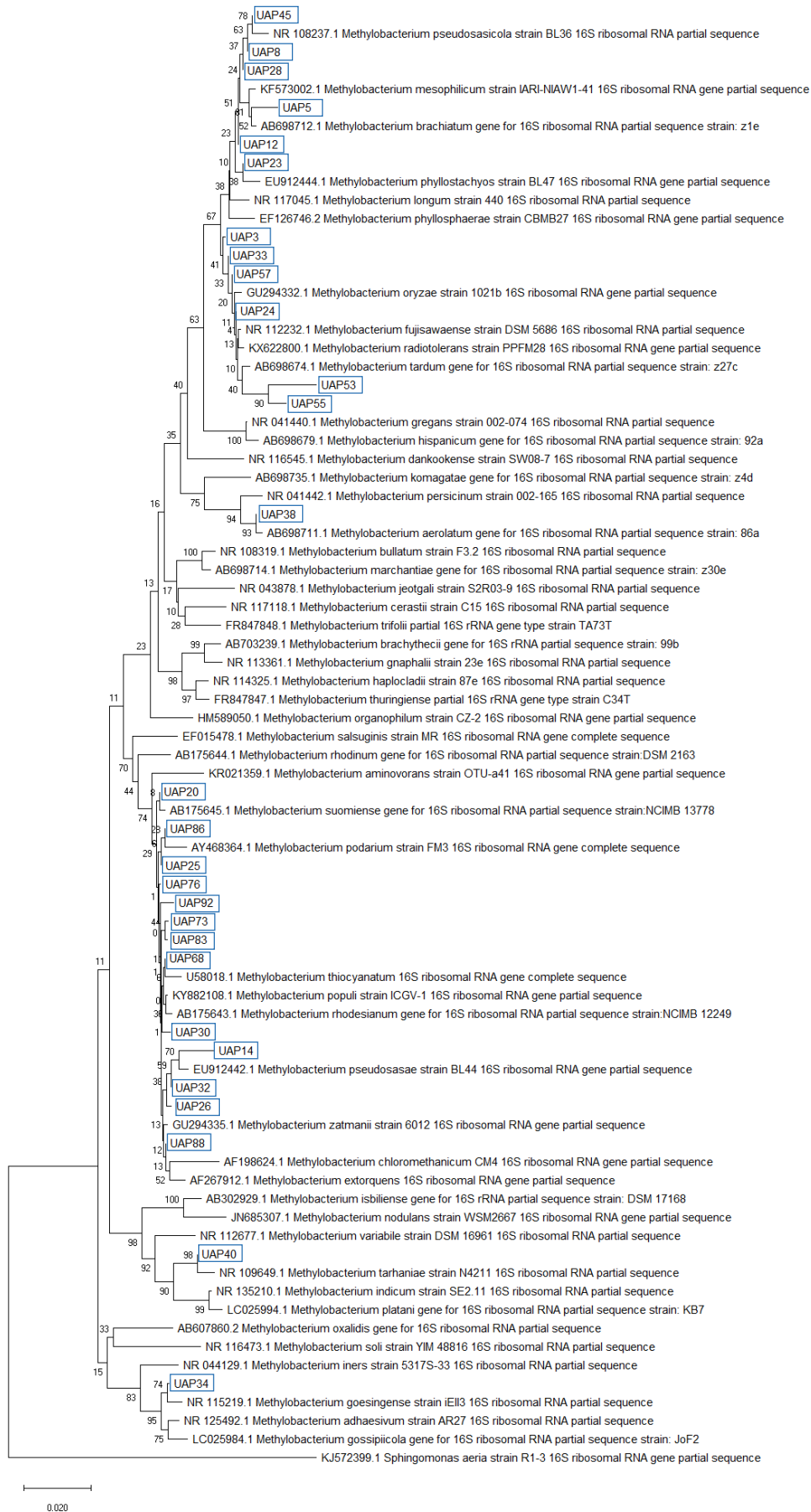
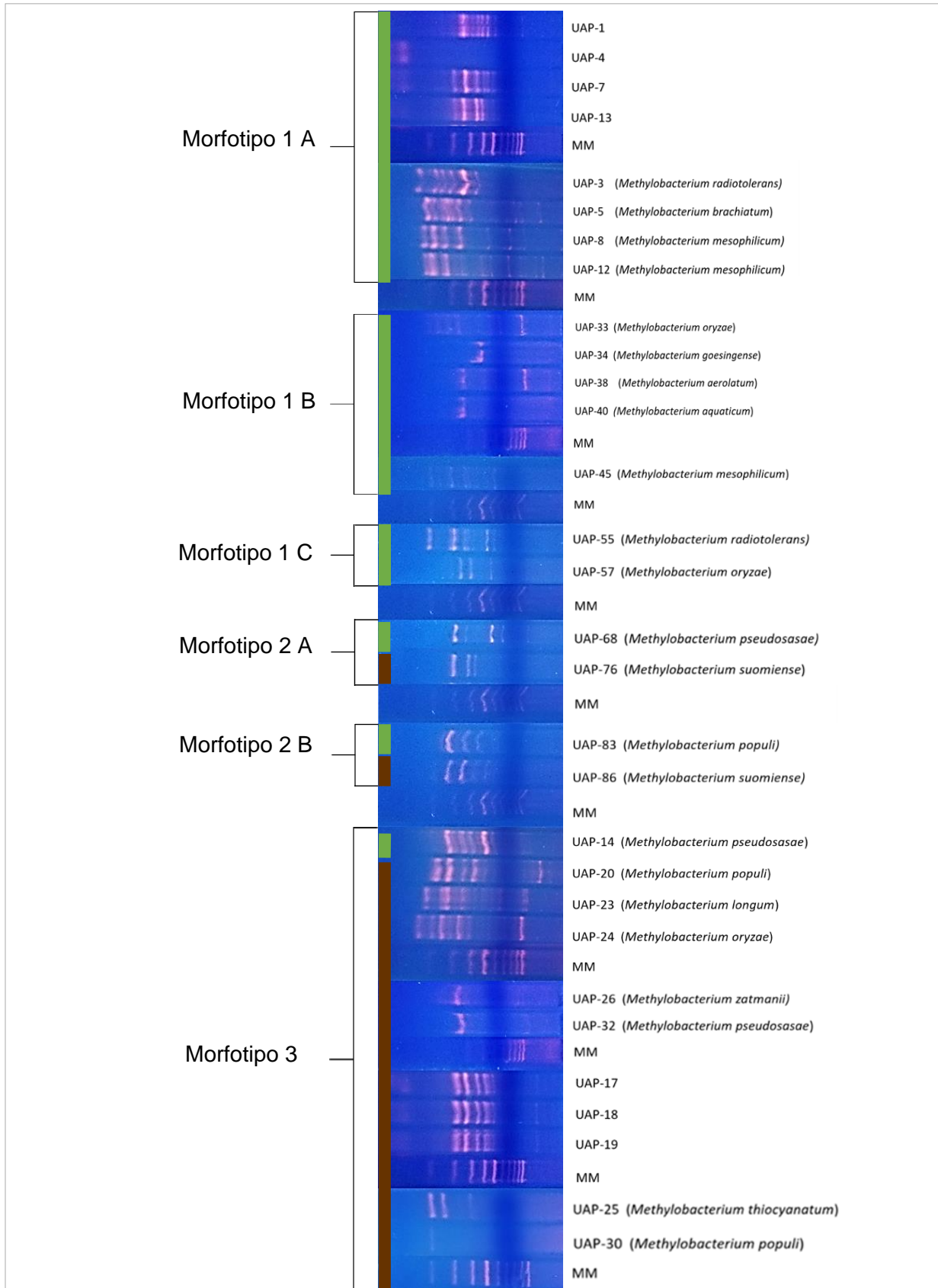


Figura 11. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA de 28 aislados.

### 3. Análisis de huellas genómicas BOX-PCR

Para obtener una visión general de la diversidad genómica de los aislados se utilizaron los perfiles BOX-PCR. Treinta aislados seleccionados (23 cepas confirmadas *Methylobacterium* y 7 cepas probables *Methylobacterium*) fueron sometidos a la técnica de huellas genómicas donde se obtuvieron perfiles complejos o de múltiples bandas de diversas intensidades que permitieron comparar perfiles (Figura 12). Se comprobó que los patrones obtenidos fueran reproducibles repitiendo la técnica en aislamientos seleccionados. Se observó diversidad genómica en consecuencia de una baja similitud en la mayoría de los aislamientos. Del morfotipo 1 (A, B y C) no se obtuvieron aislamientos endófitos de *Methylobacterium*, no se observó similitud en los patrones obtenidos, incluso en cepas caracterizadas de la misma especie por el gen 16S rRNA, como UAP-33 y UAP-57 (*M. oryzae*). En el morfotipo 2 (A y B) se obtuvieron aislamientos epifitos y endófitos y se obtuvo similitud en el patrón obtenido de las cepas endófitas UAP-76 y UAP-86, caracterizadas por secuencia como *M. suomiense*. El morfotipo 3 presentó un mayor número de aislamientos endófitos y se obtuvieron diferentes patrones asociados con diferentes especies de *Methylobacterium*, incluyendo cepas pertenecientes a la misma especie, UAP-20 y UAP-30 (*M. populi*). Las cepas UAP-17, UAP-18 y UAP-19 fueron las únicas que mostraron patrones iguales en este morfotipo (Figura 12).





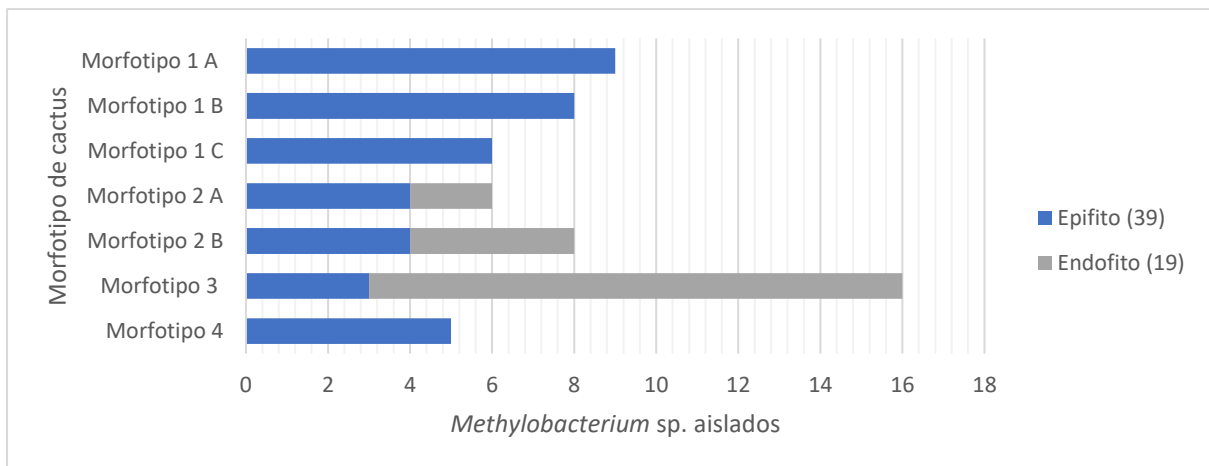
**Figura 12.** Análisis BOX-PCR de 30 aislados de *Cylindropuntia* sp. Se observan los patrones obtenidos de tres morfotipos. Del lado derecho se encuentra el nombre de la cepa, seguido del género y especie obtenidos por secuenciación del gen 16S rRNA. Del lado izquierdo se encuentra el morfotipo del cual fueron aislados y a su vez se encuentra una cinta de color que indica la procedencia del aislado en la planta, el color verde indica aislamiento epifito, mientras que el color café indica aislamiento endófito. (MM, Marcador molecular 200 pb)

#### **4. *Methylobacterium* sp. asociado a *Cylindropuntia* sp.**

Nuestro trabajo es el primero en estudiar las comunidades bacterianas del género *Methylobacterium* asociadas a cactus del género *Cylindropuntia*. Estudios previos han analizado el impacto de las especies de plantas en la formación de las comunidades de *Methylobacterium*. Se han observado diferencias significativas en tamaño y variabilidad de la población de *Methylobacterium* en especies de plantas diferentes como trigo de invierno (*Triticum aestivum*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) (Omer et al, 2004). En 2008, se demostró que la filosfera de algodón, maíz, girasol, soja y menta albergan comunidades diferentes de bacterias del género *Methylobacterium* (Raja et al., 2008). Así mismo, los trabajos de Knief et al., en 2010b muestran que las especies de plantas son determinantes importantes en la conformación de comunidades de *Methylobacterium* en *Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*. Su análisis comparativo demostró que en cierta medida la conformación de las comunidades de *Methylobacterium* son específicas en ciertas especies vegetales. Además, se menciona que muy probablemente estas diferencias en cuanto a la estructura de la comunidad bacteriana se encuentren asociadas a diferencias en la fisiología y arquitectura de la planta, que modificarían la liberación de nutrientes o disponibilidad de nichos (Knief et al, 2010b). De acuerdo con lo anterior, se esperaría que plantas con rasgos fisiológicos y morfológicos semejantes contengan comunidades bacterianas similares entre sí (Knief et al, 2010b).

Otros autores además mencionan que la diversidad de las comunidades de *Methylobacterium* asociadas a plantas no solo se encuentra impulsada por la planta huésped, sino también por el comportamiento generalista de algunas cepas del género *Methylobacterium* que pueden colonizar varios huéspedes, lo que posteriormente conduciría a una asociación específica de nicho (Dourado et al., 2012).

Las plantas utilizadas en este estudio comparten el pertenecer al género *Cylindropuntia* sp. Por lo que se esperarían comunidades bacterianas similares. Sin embargo, en nuestro estudio se obtuvieron claras diferencias de las comunidades de *Methylobacterium* asociadas a *Cylindropuntia* sp. Los aislamientos obtenidos muestran que las plantas poseen diferencias que se reflejan en las comunidades obtenidas de sus compartimentos. En el morfotipo 1 (A, B y C) solo se aislaron cepas epifitas. Del morfotipo 2 (A y B) se aislaron cepas tanto epifitas como endófitas, predominando el número de los aislamientos epifitas. El morfotipo 3 mostró un elevado número de aislamientos endófitos y del morfotipo 4 solo se obtuvieron cepas epifitas (Figura 13).



**Figura 13.** Aislamientos epifitos y endófitos de *Methylobacterium* sp. confirmados y presuntivos aislados de *Cylindropuntia* sp., organizados por morfotipo.

Sy et al., en 2005 menciona que *Methylobacterium* puede presentar diversos grados de asociación con plantas. La asociación planta-*Methylobacterium* puede variar de muy fuerte en casos simbióticos, semi-fuerte en casos de asociación endofítica a flojos en asociaciones epifitas. Lo anterior es descrito en otros trabajos como la vía piramidal de colonización de plantas y además sugiere una disminución de diversidad microbiana a través de tejidos vegetales dependiendo del nivel de interacción entre la bacteria y la planta. Por lo que la superficie de la planta contiene la mayor abundancia de bacterias del género *Methylobacterium* (de Andrade et al., 2018).

Al analizar de manera global los aislamientos obtenidos se puede notar que se obtuvo un mayor número de aislamientos epifitos (39) en contraste con los aislamientos endófitos globales (19) (Figura 13). Lo cual, resulta similar a lo obtenido en otros trabajos donde observaron igualmente mayor abundancia de cepas en la superficie de las plantas en comparación con las cepas que colonizaron los tejidos internos (de Andrade et al., 2018). Se sugiere entonces, que existen presiones selectivas por parte de la planta, seleccionando bacterias con características y rasgos clave que les permitan sobrevivir en los tejidos internos (Walitang et al., 2017). Con respecto a lo anterior, el morfotipo 3 se sale del criterio mencionado anteriormente, ya que se encontró un mayor número de bacterias internas. Sin embargo, también es importante mencionar que las asociaciones no son estáticas y que especies pueden fluctuar entre la filósfera y la endosfera de las plantas (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

La secuenciación del gen 16S rRNA nos permitió la identificación a nivel de especie de 28 cepas de *Methylobacterium*. Las cuales se encontraron englobadas en 13 especies (*M. radiotolerans*, *M. brachiatum*, *M. mesophilicum*, *M. pseudosasaе*, *M. suomiense*, *M. longum*, *M. oryzae*, *M. populi*, *M. thiocyanatum*, *M. zatmanii*, *M. goesingense*, *M. aerolatum* y *M. aquaticum*). Las especies obtenidas se organizaron para obtener una visión general de su distribución en los morfotipos y compartimentos muestreados (Tabla 2). El análisis representa el 48% de los aislamientos obtenidos de *Methylobacterium*. El restante 52% de aislamientos que corresponde a los 30 aislamientos caracterizados como probables *Methylobacterium* no cuenta con una caracterización a nivel de especie. Los patrones ARDRA obtenidos del gen 16S rRNA de no permiten la diferenciación a nivel de especie por comparación de patrones

ARDRA para los 30 aislamientos caracterizados como probables *Methylobacterium*. En la Tabla 2 se muestra la distribución de los 28 aislamientos secuenciados con el gen 16S rRNA. Entre paréntesis se encuentra el número de veces que se encontró repetida la especie obtenida. Se muestra su distribución en los morfotipos y compartimentos muestreados de la planta (filosfera y endosfera). Se agregó además en letras rojas las restantes cepas no caracterizadas con secuenciación del gen 16S pero que, si son probables *Methylobacterium*, de la cuales no se cuenta con su especie caracterizada. Al realizar el análisis de la Tabla 2 se puede observar que el morfotipo 3 presenta mayor número de especies de *Methylobacterium* diferentes. Si observamos las cepas obtenidas para el morfotipo 1A, 1B y 1C, notamos que comparten ciertas cepas en común, como *M. radiotolerans*, *M. mesophilicum* y *M. oryzae*, mientras que otras cepas no se repiten, como *M. aquaticum* y *M. aerolatum* (en el morfotipo 1B). Lo anterior igualmente ocurre para el morfotipo 2, donde ambas plantas pertenecientes a este morfotipo (2A y 2B) comparten las especies *M. populi* y *M. suomiense*, mientras que *M. pseudosasae* solo aparece en una planta del morfotipo 2.

Nuestros resultados se relacionan con lo obtenido en trabajos previos, mencionados anteriormente, donde se observó que la diversidad de *Methylobacterium* depende de la especie de planta colonizada (Knief et al., 2008; Raja et al., 2008). Ciertas bacterias son compartidas en plantas con características similares, las comunidades bacterianas obtenidas se vieron asociadas a determinado morfotipo o especie de *Cylindropuntia* sp. Los resultados además muestran la capacidad de otras especies de *Methylobacterium* para colonizar varios huéspedes. A pesar de que no se obtuvo una cepa capaz de colonizar todos los morfotipos analizados *M. populi* fue aislada de dos morfotipos diferentes, similar a lo obtenido por Dourado et al., en 2012, donde sus resultados muestran la capacidad de ciertas especies para colonizar varias plantas. Dourado et al., además de mencionar que las asociaciones entre bacterias y plantas pueden ser específicas no descarta la presencia de eventos aleatorios que lleven a la conformación observada de las comunidades bacterianas analizadas.

**Tabla 2.** Aislamientos caracterizados por secuenciación del gen 16S rRNA, agrupados por morfotipo y compartimento aislado.

	Morfotipo 1			Morfotipo 2		Morfotipo 3
	A	B	C	A	B	
Aislamientos epifitos	<i>M. radiotolerans</i> (1)		<i>M. radiotolerans</i> (1)			
	<i>M. brachiatum</i> (1)					
	<i>M. mesophilicum</i> (2)	<i>M. mesophilicum</i> (1)				
		<i>M. oryzae</i> (1)	<i>M. oryzae</i> (2)			
		<i>M. goesingense</i> (1)				
		<i>M. aerolatum</i> (1)				
		<i>M. aquaticum</i> (1)				
					<i>M. populi</i> (1)	<i>M. pseudosasaе</i> (1)
	(UAP-1, UAP-4, UAP-7, UAP-11, UAP-13)	(UAP-36, UAP-41, UAP-43)	(UAP-50, UAP-51, UAP-52)	(UAP-65, UAP-69, UAP-70)	(UAP-79, UAP-80, UAP-82)	
Aislamientos endófitos					(UAP-87)	(UAP-15, UAP-16, UAP-17, UAP-18, UAP-19, UAP-21, UAP-27)
				<i>M. pseudosasaе</i> (1)		<i>M. pseudosasaе</i> (2)
				<i>M. populi</i> (1)	<i>M. populi</i> (2)	<i>M. populi</i> (1)
				<i>M. suomiense</i> (1)	<i>M. suomiense</i> (1)	
						<i>M. mesophilicum</i> (1)
						<i>M. longum</i> (1)
						<i>M. oryzae</i> (1)
						<i>M. thiocyanatum</i> (1)
					<i>M. zatmanii</i> (1)	

## Conclusiones

- Las comunidades bacterianas del género *Methylobacterium* establecen asociaciones epifitas y endófitas, con las cactáceas del género *Cylindropuntia*.
- Los aislamientos de *Methylobacterium* muestran posible asociación específica con especies del género *Cylindropuntia*.
- Los aislamientos del género *Methylobacterium* asociados a *Cylindropuntia* son genéticamente diversos.

## Perspectivas

- Ampliar el número de muestreos de cactus del género *Cylindropuntia*.
- Comparar las comunidades de *Methylobacterium* de diferentes regiones geográficas donde se localicen cactus del género *Cylindropuntia*.
- Analizar el efecto de las estaciones secas y lluviosas en el ensamblaje de las comunidades bacterianas del género *Methylobacterium* asociadas a cactus del género *Cylindropuntia*.
- Complementar el análisis de diversidad génica usando otros perfiles de huellas génicas, como REP-PCR o ERIC-PCR.
- Implementar análisis de resultados de huellas génicas con software especializado.

## Referencias

- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Martínez-Abarca, F., and Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(4), 891–904. doi:10.1007/s10482-012-9705-3
- Alanís Flores, G. J., y Velazco Macías, C. G. (2008). Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Redalyc*, No.1. pp. 5-9.
- Anda, M., Ikeda, S., Eda, S., Okubo, T., Sato, S., Tabata, S., Mitsui H., and Minamisawa, K. (2011). Isolation and Genetic Characterization of *Aurantimonas* and *Methylobacterium* Strains from Stems of Hypernodulated Soybeans. *Microbes and Environments*, 26(2), 172–180. doi:10.1264/jsme2.me10203
- Anderson E.F. (2001). The cactus family. Oregon, USA. Timber Press. p. 204.
- Anthony, C. (1982). The Biochemistry of Methylotrophs. London: Academic Press. St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk. ISBN 0-12-058820-X
- Anthony, C., and Williams, P. (2003). The structure and mechanism of methanol dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1647(1-2), 18–23. doi:10.1016/s1570-9639(03)00042-6
- Bernardet, J.-F., & Bowman, J. P. (2015). *Flavobacterium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–75. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00312>
- Bodenhausen, N., Horton, M. W., & Bergelson, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, 8(2), e56329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>
- Bravo-Hollis, H., y Sánchez-Mejorada H. (1978). Las cactáceas de México. Vol. I. Universidad Autónoma de México. México, D.F.
- Bruseti, L., Malkhazova, I., Gtari, M., Tamagnini, I., Borin, S., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Mora, D., Cappitelli, F., and Daffonchio, D. (2008). Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC microbiology*, 8, 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-220>
- Bustillos-Cristales, M. Del Rocío, Corona-Gutiérrez, I., Castañeda-Lucio, M., Águila-Zempoaltécatl, C., Seynos-García, E., Hernández-Lucas, I., Muñoz-Rojas J., Medina-Aparicio L. and Fuentes-Ramírez, L. E. (2017). Culturable Facultative Methylotrophic Bacteria from the Cactus *Neobuxbaumia macrocephala* Possess the Locus *xoxF* and Consume Methanol in the Presence of  $Ce^{3+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Microbes and Environments*, 32(3), 244–251. doi:10.1264/jsme2.me17070
- Cai, Y., Zheng, Y., Bodelier, P. L. E., Conrad, R., and Jia, Z. (2016). Conventional methanotrophs are responsible for atmospheric methane oxidation in paddy soils. *Nature Communications*, 7, 11728. doi:10.1038/ncomms11728

- Campos-Salas, N., Casas, A., Moreno-Calles, A. I., and Vallejo, M. (2016). Plant Management in Agroforestry Systems of Rosetophyllous Forests in the Tehuacán Valley, Mexico. *Economic Botany*, 70(3), 254–269. doi:10.1007/s12231-016-9352-
- Castro-Alarcón N., Alonso-Morales A., Silva-Sánchez J., y Armenta-Solís A. (2009). Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de  $\beta$  lactamasas de espectro extendido. *Bioquímica*, 34(4), pp.165-174.
- Chávez, A., Hernández, M., Cabrera, L., Luna, M. and Pacheco, A. (2016). *Bacillus* isolates from rhizosphere of cacti improve germination and bloom in *Mammillaria spp.* (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*. doi: 0.1016/j.ram.2016.09.001.
- Chistoserdova, L. (2011a). Methylophony in a Lake: from Metagenomics to Single-Organism Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4705–4711. doi:10.1128/aem.00314-11
- Chistoserdova, L. (2011b). Modularity of methylophony, revisited. *Environmental Microbiology*, 13(10), 2603–2622. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02464.x
- Chistoserdova, L. (2015). Methylophony in natural habitats: current insights through metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), 5763–5779. doi:10.1007/s00253-015-6713-z
- Chistoserdova, L., Chen, S. W., Lapidus, A., and Lidstrom, M. E. (2003). Methylophony in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *Journal of bacteriology*, 185(10), 2980–2987. <https://doi.org/10.1128/jb.185.10.2980-2987.2003>
- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M.G., and Lidstrom, M.E. (2005) C1 transfer modules: from genomics to ecology. *ASM News* 71: 521–528.
- Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M. G., and Lidstrom, M. E. (2009). The Expanding World of Methylophony Metabolism. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 477–499. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073600
- de Andrade, P. A. M., Dias, A. C. F., Cotta, S. R., da Costa, D. P., Oliveira, J. T. C., de Oliveira, L. F. P., Freire, F. J., Andreote, F. D., and Kuklinsky-Sobral, J. (2018). Differential niche occupation and the biotechnological potential of *Methylobacterium* species associated with sugarcane plants. *African Journal of Microbiology Research*, 12(25), 595-605.
- Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., and Vorholt, J. A. (2009). Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16428–16433. doi:10.1073/pnas.0905240106
- Dorokhov, Y. L., Sheshukova, E. V., and Komarova, T. V. (2018). Methanol in Plant Life. *Frontiers in plant science*, 9, 1623. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01623>



- Dourado, M. N., Andreote, F. D., Dini-Andreote, F., Conti, R., Araújo, J. M., and Araújo, W. L. (2012). Analysis of 16S rRNA and *mxoF* genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. *Genetics and Molecular Biology*, 35(1), 142–148. doi:10.1590/s1415-47572012005000017
- Dubey, A. A., Wani, S. R., and Jain, V. (2018). Methylo-trophy in Mycobacteria: Dissection of the Methanol Metabolism Pathway in Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology*, 200(17). doi:10.1128/jb.00288-18
- Eyice, Ö., and Schäfer, H. (2016). Culture-dependent and culture-independent methods reveal diverse methylo-trophic communities in terrestrial environments. *Archives of microbiology*, 198(1), 17–26. https://doi.org/10.1007/s00203-015-1160-x
- Fonseca, G. C., Coleman, D. D, Garrido, E., Visel, A., Tringe, S. G. and Partida, M. L. (2016). The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2016.00150.
- Flores-Núñez, V. M., Fonseca-García, C., Desgarenes, D., Eloie-Fadrosch, E., Woyke, T., and Partida-Martínez, L. P. (2020). Functional Signatures of the Epiphytic Prokaryotic Microbiome of Agaves and Cacti. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.03044
- Garcia, J. and Kao, K. J. (2018). Microbial Group Dynamics in Plant Rhizospheres and Their Implications on Nutrient Cycling. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.01516.
- Green, P. N., and Ardley, J. K. (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(9), 2727–2748. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002856
- Guillot, D., Laguna E. and Rosselló J. A. (2008). Flora alóctona valenciana: familia Cactaceae. *Monografías de la revista Bouteloua*, 5. Jolube Consultor Botánico y Editor. Jaca. pp. 21-23
- Gutiérrez Mayén, M. G. 2007. Herpetofauna de la reserva de la biósfera Valle de Tehuacán-Cuicatlán (etapa final). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. BK019 México D. F.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., and Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. doi: 10.1016/j.tim.2008.07.008
- Ho A., Kwon M., Horn M.A., y Yoon S. (2019) Aplicaciones ambientales de metanótrofos. En: Lee E. (eds) *Methanotrophs*. *Monografías de microbiología*, vol. 32. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23261-0\_8
- Innerebner, G., Knief, C., & Vorholt, J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3202–3210. https://doi.org/10.1128/AEM.00133-11

- ITRC (Interstate Technology & Regulatory Council). (2011). Environmental Molecular Diagnostics Fact Sheets. EMD-1. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Environmental Molecular Diagnostics Team. <https://www.itrcweb.org/GuidanceDocuments/EMD1.pdf>. pp. 35-44
- Jacobs, J. L., Carroll, T. L., & Sundin, G. W. (2004). The Role of Pigmentation, Ultraviolet Radiation Tolerance, and Leaf Colonization Strategies in the Epiphytic Survival of Phyllosphere Bacteria. *Microbial Ecology*, 49(1), 104–113.
- Jiménez Sierra L.C. (2011). Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12:1-23.
- Kiesling, R. (1975). Los géneros de Cactaceae de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 16:197–227.
- Kiesling, R. (1988). Cactaceae. In *Flora Patagónica* 5, Dicotiledoneas dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae), M. N. Correa (ed.). Colección Científica Del INTA 8, Buenos Aires, Argentina. p. 218–243.
- Knief, C., Dengler, V., Bodelier, P. L., & Vorholt, J. A. (2012). Characterization of *Methylobacterium* strains isolated from the phyllosphere and description of *Methylobacterium longum* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(1), 169–183. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9650-6>
- Knief, C., Frances, L., Cantet, F., & Vorholt, J. A. (2008). Cultivation-Independent Characterization of *Methylobacterium* Populations in the Plant Phyllosphere by Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2218–2228.
- Knief, C., Frances, L., and Vorholt, J. A. (2010a). Competitiveness of Diverse *Methylobacterium* Strains in the Phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and Identification of Representative Models, Including *M. extorquens* PA1. *Microbial Ecology*, 60(2), 440–452. doi:10.1007/s00248-010-9725-3
- Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C., and Vorholt, J. A. (2010b). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *The ISME Journal*, 4(6), 719–728. doi:10.1038/ismej.2010.9
- Koeuth, T., Versalovic, J., and Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome research*, 5(4), 408–418. <https://doi.org/10.1101/gr.5.4.408>
- Kolb, S., and Stacheter, A. (2013). Prerequisites for amplicon pyrosequencing of microbial methanol utilizers in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00268
- Kolton, M., Erlacher, A., Berg, G., & Cytryn, E. (2016). The *Flavobacterium* Genus in the Plant Holobiont: Ecological, Physiological, and Applicative Insights. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*, 189–207. doi:10.1007/978-10-2555-6\_9

- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* 273, 91–99 <https://doi.org/10.1007/s11104-004-6894-1>
- Kutschera U. (2007). Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts: a hypothesis. *Plant signaling & behavior*, 2(2), 74–78. <https://doi.org/10.4161/psb.2.2.4073>
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875–1883. <https://doi.org/10.1128/aem.69.4.1875-1883.2003>
- Lidstrom, M. E. (2006). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. *The Prokaryotes*, 618–634. doi:10.1007/0-387-30742-7\_20
- Lima, J. V. L., Weber, O. B., Correia, D., Soares, M. A., and Senabio, J. A. (2015). Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. *Plant and Soil*, 389(1-2), 25–33. doi:10.1007/s11104-014-2344-x
- Lupski, J. R., and Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology*, 174(14), 4525–4529. <https://doi.org/10.1128/jb.174.14.4525-4529.1992>
- Madhaiyan, M., and Poonguzhali, S. (2013). *Methylobacterium pseudosasa* sp. nov., a pink-pigmented, facultatively methylophilic bacterium isolated from the bamboo phyllosphere. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(2), 367–376. Doi:10.1007/s10482-013-0085-0
- Martinez-Cruz, K., Leewis, M. C., Herriott, I. C., Sepulveda-Jauregui, A., Anthony, K. W., Thalasso, F., and Leigh, M. B. (2017). Anaerobic oxidation of methane by aerobic methanotrophs in sub-Arctic lake sediments. *Science of The Total Environment*, 607-608, 23–31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.187
- Medina Lemos R. (2016). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. En N. Sanz (Ed.), Ciudad de México: The origins of food production / Los orígenes de la producción de alimentos (pp. 180-198). UNESCO, Oficina en México.
- Menna, P., Pereira, A. A., Bangel, E. V., and Hungria, M. (2009). Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, 48(1-3), 120–130. doi:10.1007/bf03179991
- Miguel-Talonia, C., Téllez-Valdés, O., y Murguía-Romero, M. (2014). Las cactáceas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(2), 436–444.
- Omer, Z. S., Tombolini, R., and Gerhardson, B. (2004). Plant colonization by pink-pigmented facultative methylophilic bacteria (PPFMs). *FEMS microbiology ecology*, 47(3), 319–326. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(04\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(04)00003-0)

- Pattnaik, S., Rajkumari, J., Paramanandham, P., & Busi, S. (2017). Indole Acetic Acid Production and Growth-Promoting Activity of *Methylobacterium extorquens* MP1 and *Methylobacterium zatmanii* MS4 in Tomato. *International Journal of Vegetable Science*, 23(4), 321–330. doi: 10.1080/19315260.2017.1283381
- Raja, P., Balachandar, D., and Sundaram, S. (2008). PCR fingerprinting for identification and discrimination of plant-associated facultative methylobacteria. *Indian journal of Biotechnology*, 7, 508-514.
- Rebman, J. P., and Pinkava, D. J. (2001). *Opuntia Cacti of North America: An Overview*. *The Florida Entomologist*, 84(4), 474. doi:10.2307/3496374
- Rentaría-Alcántara M. (2007) Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (eds.) *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. SEMARNAT. México, pp. 541-566
- Reyes Flores F. (2016). La Reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán. En N. Sanz (Ed.), *Ciudad de México: The origins of food production / Los orígenes de la producción de alimentos* (pp. 170-179). UNESCO, Oficina en México.
- Robles García N.M., (2019). Tehuacán-Cuicatlán. *Arqueología mexicana*.155 (26), 36-39. Recuperado desde: <https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/tehuacan-cuicatlan>
- Sy, A., Timmers, A. C., Knief, C., and Vorholt, J. A. (2005). Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7245–7252. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7245-7252.2005>
- Tani, A., Sahin, N., Fujitani, Y., Kato, A., Sato, K., & Kimbara, K. (2015). *Methylobacterium* Species Promoting Rice and Barley Growth and Interaction Specificity Revealed with Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) Analysis. *PloS one*, 10(6), e0129509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129509>
- Taubert, M., Grob, C., Howat, A. M., Burns, O. J., Dixon, J. L., Chen, Y., and Murrell, J. C. (2015). XoxF encoding an alternative methanol dehydrogenase is widespread in coastal marine environments. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3937–3948. doi:10.1111/1462-2920.12896
- Turner, T. R., James, E. K., and Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome Biology*, 14(6). doi:10.1186/gb-2013-14-6-
- Valdespino, P.M., Ibarra, M. M., Valdespino, V. M. y Falcón, L.I. (2014). ¿Es una planta, un animal o un...holobionte? *Ciencia y Desarrollo*. Disponible en: <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/272/articulos/planta-animal-u-holobionte.html>.
- Vanechoutte M. (1996). DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular biotechnology*, 6(2), 115–142. <https://doi.org/10.1007/BF02740768>

Versalovic, J.V., De Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. (1998) Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis*. F.J. De Bruijn, J.R. Lupski, and G.M. Weinstock (eds). New York, NY, USA: Chapman & Hall, pp. 437– 454.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *Methods Cell Mol Biol* 5: 25– 40.

Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y., & Sa, T. (2017). Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC microbiology*, 17(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>

Webster G., Mullins A.J., Cunningham-Oakes E., Renganathan A., Aswathanarayan J.B., Mahenthalingam E., Vittal and Ravishankar R. (2020). Culturable diversity of bacterial endophytes associated with medicinal plants of the Western Ghats, India. *FEMS Microbiology Ecology*, fiae147–. doi:10.1093/femsec/fiae147

Yoshida, S., Hiradate, S., Koitabashi, M., Kamo, T., & Tsushima, S. (2017). Phyllosphere *Methylobacterium* bacteria contain UVA-absorbing compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167, 168–175

Yurimoto, H., Kato, N., and Sakai, Y. (2005). Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *The Chemical Record*, 5(6), 367–375. doi:10.1002/tcr.20056

Yurimoto, H., Oku, M., and Sakai, Y. (2011). Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International Journal of Microbiology*, 2011, 101298. <https://doi.org/10.1155/2011/101298>

## Anexos

### Anexo 1

Revisión taxonómica

*Cylindropuntia* (Engelm.) F.M.Knuth

**Arbustivas** o **arborescentes**. **Raíces** fibrosas. **Tallos** ascendentes o erectos, monomorfos, articulados, cilíndricos o a veces clavados, con crecimiento indefinido, glabros, podarios presentes. **Hojas** pequeñas, cónicas, vestigiales en tallos jóvenes, pronto deciduas, **aréolas** con **glóquidas**, a veces deciduas, **espinas** presentes o ausentes, generalmente rígidas, con una vaina o cubierta epidérmica papirácea y exfoliante. **Flores** 1.0-6.0 cm largo, solitarias, ocasionalmente agrupadas, subterminales o terminales; **pericarpelo** generalmente con podarios, aréolas con glóquidas abundantes, **tubo receptacular** corto, **perianto** rotado, tépalos verde-amarillentos a rojos o púrpura; **estambres** menores o iguales que los tépalos, a veces sensitivos; **estilo** más largo que los estambres, cilíndrico. **Frutos** globosos a claviformes, umbilicados, verdes, amarillos a rojos, aréolas con glóquidas, pulpa jugosa o seca, blanca a púrpura, a veces estériles y prolíficos; **semillas** discoides a esferoidales, arilo anular, testa dura, blanquecinas. (Medina, 2016, pp 187)

<b>Anexo 2. Medio mínimo Metanol-Sales Minerales (MMS)</b>	
Medio MMS (Methanol Mineral Salts)	
Reactivos	Gramos/litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.62 g
CaCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.05 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.20 g
NaCl	0.10 g
FeCl <sub>3</sub>	1.0 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.16 g
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	5 µg
MnSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	10 µg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	10 µg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µg
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	70 µg
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	5 µg
Cofactor	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	30 µM
CeCl <sub>3</sub> •7H <sub>2</sub> O	30 µM
Agar bacteriológico	13 g
Metanol	5 ml
pH	7

<b>Anexo 3. Medio de cultivo Glicerol-Peptona (GP)</b>	
Medio GP (Glicerol-peptona)	
Reactivos	Gramos/litro
Glicerol	10 g
Peptona de caseína	10 g
Agar bacteriológico	13 g
pH	7

## **Anexo 4. Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las cepas aisladas se realizó con dos kits diferentes:

### **A. Extraction DNA Kit, Jena Bioscience (Gramnegative bacteria).**

Para la lisis bacteriana, los aislados se centrifugaron por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y al botón se le agregaron 300 µl de Lysis Buffer y 2 µl de RNasa A, se agitó vigorosamente y se añadieron 8 µl de Proteinase K. La mezcla se incubó a 60°C por 10 minutos, se le añadieron 300 µl de Binding Buffer y se colocó en hielo 5 minutos, después de los cuales se volvió a centrifugar por 5 minutos.

Para la activación de la columna, se colocaron 100 µl de Activation Buffer y se centrifugo a 10 000 g por 30 segundos, tirando el sobrenadante para continuar con la carga de la columna, a la cual se le colocaron 700 µl del lisado obtenido anteriormente y se centrifugo nuevamente por 1 minuto, desechando el sobrenadante.

Para el primer lavado se añadieron 500 µl de Washing buffer en la columna se centrifugo por 30 segundos y se desechó el sobrenadante. Para el lavado secundario se repitió lo mismo que se realizó en el primer lavado añadiendo una ronda extra de centrifugado por 1 minuto.

El paso final, la elución del ADN, se realizó colocando un tubo limpio debajo de la columna, se añadieron 30 µl de Elution Buffer, se incubó a temperatura ambiente 2 minutos y finalmente se centrifugó por 2 minutos.

### **B. Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Gramnegative bacteria)**

Partiendo de la pastilla obtenida por centrifugación, la lisis de las células se llevó a cabo añadiendo 600 µl de Nuclei Lysis Solution, se incubó 5 minutos a 80°C, se añadió 3 µl de RNasa y finalmente se incubó nuevamente 30 minutos a 37°C.

Para la precipitación de proteínas se añadieron 200 µl de Protein precipitation solution, se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 13 000 g por 3 minutos. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio y se le añadieron 600 µl de isopropanol, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Se añadieron 600 µl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente y se aspiró el etanol con cuidado para dejar secar la pastilla a 37°C. La pastilla final se rehidrató en 50 µl de Rehydration solution por 1 hora a 65°C.



## **Anexo 5. Purificación de PCR**

Para la purificación de las amplificaciones obtenidas por PCR del gen 16S rRNA, se utilizó el Purification PCR kit de Jena Bioscience. El fragmento obtenido al ser menor a 5 kpb se le agregaron 5 volúmenes de Binding Buffer y se mezcló. Se realizó una activación de columnas agregando 100 µl de Activation Buffer, centrifugándolo 30 segundos y desechando el sobrenadante. Se añadió la muestra en la columna (300 µl aproximadamente) y se centrifugó. Se agregaron 700 µl de Washing Buffer a la columna, centrifugándola por 30 segundos. El lavado secundario consistió en agregar 500 µl de Washing Buffer centrifugándolo 2 minutos, al finalizar se colocó un tubo nuevo debajo de la columna y se agregaron 30 µl de Elution Buffer, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó 1 minuto.