

Caracterización molecular de la microbiota rizosférica nativa de *Opuntia ficus-indica* y evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus

Molecular characterization of *Opuntia ficus-indica* native microbiota rhizosphere and evaluation of isolated microbial strain effects on the cactus development

Jalmer Campaña-Olaya^{1*}; Bernabé Luis-Alaya^{2,3}; Sandra Mendez-Farroñan³; Marilyn Quezada-Salirrosas⁴; Estefanía Nouchi-Moromizato³; Nayda Munaya-Sáenz⁴; Héctor Sánchez-Suárez¹; Eveling Prada-Gutiérrez¹; Eric Mialhel⁴

Resumen

Cerca de la mitad de las tierras continentales del planeta son consideradas áridas o sufren amenaza de sequía. Dentro de las plantas adaptadas a estos ecosistemas destacan los cactus que cuentan con varios mecanismos de adaptación, en particular relacionados a su asociación con comunidades microbianas benéficas a nivel de su rizósfera. Entre ellos destacan las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) conocidos para contribuir al desarrollo exitoso de la planta en condiciones de aridez. La identificación molecular de bacterias y hongos HMA, aislados de la rizósfera de *O. ficus-indica* de cinco zonas áridas del departamento de Tumbes, ha sido realizada por secuenciación parcial de rDNA. Plantas de cactus cultivadas *in vitro* han sido establecidas e inoculadas con las cepas microbianas previamente caracterizadas. Ningún efecto morfológico significativo ha sido observado para las plantas inoculadas con las cepas bacterianas mientras que la inoculación de HMA ha conducido en algunos casos a diferencias significativas en el contenido relativo de agua, altura de planta y peso seco de raíz. La presente investigación proporciona información relacionada con la microbiota nativa rizosférica con la demostración de los efectos benéficos de hongos micorrízicos para su planta huésped *O. ficus-indica*.

Palabras clave: Suelos áridos; *Opuntia ficus-indica*; Rizósfera; Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal; Hongos micorrízicos arbusculares.

Abstract

About half of the planet mainland is considered arid or suffer drought threat. Cactus are plants well-adapted to these ecosystems with various adaptive mechanisms, in particular through their association with beneficial rhizosphere microbial communities. These include plant growth promoting rhizobacteria (RPCV) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that contribute to plant successful development in drought conditions. Bacteria and AMF, isolated from rhizosphere microbiota of *O. ficus-indica* cactus collected in five arid locations of Tumbes Department, have been molecularly characterized by partial sequencing of rDNA gene. Cactus *in vitro*-plants were prepared and inoculated with bacterial and AMF isolated strains. No significant morphological effects were observed for *in vitro*-plants inoculated with bacterial strains whereas AMF led to in some cases to significant differences in relative water content, plant height and root dry weight in some treatments. The present research gives information related to native rhizosphere microbiota with the demonstration of benefic effects of mycorrhizal fungi for its host plant *O. ficus-indica*.

Keywords: Arid soils; *Opuntia ficus-indica*; Rhizosphere; Plant growth promoting rhizobacteria; Arbuscular mycorrhizal fungi.

¹ Facultades de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, Perú.

² Cooperativa de Investigación Biotecoop. Jr. Filipinas 241, Tumbes, Perú.

³ Maestría en Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes.

⁴ Empresa de Investigación y Capacitación en Biotecnología. INCA'Biotec, Tumbes, Perú.

* Autor correspondiente: jcampanao@untumbes.edu.pe (J. Campaña-Olaya).

Introducción

Cerca de la mitad de los suelos cultivables son áridos, semiáridos o viven bajo amenaza de sequía (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). Las zonas áridas incluyen una amplia gama de situaciones ambientales comprendiendo desde los desiertos extremos hasta los ecosistemas subhúmedos secos (MINAM, 2011). En este tipo de ecosistemas las plantas han sufrido un proceso evolutivo profundo que resulta en una amplia variedad de formas de vida especializadas adaptadas para sobrevivir en estos medios (UNEP, 2006; Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). Las cactáceas corresponden a una de las familias de plantas adaptadas en ecosistemas más áridos (Alary *et al.*, 2007). *Opuntia ficus-indica* es la especie de cactus más conocida y estudiada por ser un recurso de productos y usos múltiples, como planta silvestre y como cultivo de subsistencia comercial, contribuyendo a la seguridad alimenticia de poblaciones en áreas agrícolas marginadas (Nobel, 2002; Reynolds, 2003)

Para lograr comprender el desarrollo exitoso de los cactus en suelos áridos, se requiere de una visión global de todo el ecosistema y las interacciones planta-microorganismo (Marasco *et al.*, 2012). La vida microbiana es esencial para la evolución de la vida y tiene un papel importante en la agricultura de desierto. Dentro de los microorganismos involucrados en el desarrollo exitoso de las plantas en condiciones de aridez se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y los hongos micorrízicos arbusculares – HMA – (Loredo *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2012).

Los mecanismos de las BPCV para promover el crecimiento de las plantas son diversos, entre ellos: la fijación de nitrógeno, producción de compuestos sideróforos, producción de fitohormonas, inducción de resistencia sistémica a patógenos así como su inhibición e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo, otros autores señalan que estos microorganismos provocan aumento en la absorción de agua y nutrientes por diferentes vías o mecanismos (Pulido *et al.*, 2003; Loredo *et al.*, 2004). Por otro lado, los HMA son microorganismos rizosféricos simbióticos, la planta recibe de los hongos nutrientes, minerales y agua, y éstos obtienen hidratos de carbono y vitaminas. Los resultados son modificaciones en la organización de células vegetales y fúngicas causadas por cambios específicos en la expresión génica (Redecker, 2000). El uso de HMA en la agricultura tiene un gran potencial biotecnológico debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, estimulan el crecimiento, inducen resistencia a fitopatógenos o ayudan en la adaptación y tolerancia de las plantas ante condiciones de estrés, de esta forma los HMA, pueden constituir sustitutos biológicos de los fertilizantes minerales al ser componentes inseparables de los agroecosistemas (Thompson, 1991).

Bajo las perspectivas de la investigación se planteó como objetivos: la caracterización molecular de la microbiota rizosférica nativa (RPCV y HMA) de *O. ficus-indica*, así como la evaluación de los efectos de cepas microbianas aisladas sobre el desarrollo del cactus.

Materiales y métodos

Área de estudio, plantas y muestreo

La selección de cada *O. ficus-indica* fue en función a su desarrollo normal como planta cultivada y/o silvestre en zonas áridas del

departamento de Tumbes: Corrales, Cabuyal, Casitas, Uña de Gato y Puerto Pizarro.

El muestreo se realizó tomando aproximadamente 1 kg de muestra de rizósfera

de *O. ficus-indica*, seleccionadas por juicio no probabilístico, considerando la vigorosidad y tamaño.

Aislamiento e identificación molecular de bacterias cultivables

Para el aislamiento se utilizó la técnica de diluciones, y se sembró en medios de cultivo Trypticase Soy Agar (TSA) y Cetrimide. Posteriormente se purificaron haciendo repiques y se seleccionaron las colonias basándose en su diferencia morfológica. Para la extracción de ADN se utilizó el método de extracción rápida por Buffer Fosfato Alcalino (PBS), el ADN obtenido fue amplificado mediante la técnica de PCR y confirmado por electroforesis para lo cual se preparó el gel de agarosa al 1.5%. Las muestras positivas fueron enviadas a los laboratorios de la empresa Macrogen (USA). Los resultados de las secuencias de nucleótidos del gen 16S rRNA se alinearon mediante el programa Mega 6 y se analizaron utilizando BLAST de la National Center for Biotechnology Information –NCBI-.

Aislamiento e Identificación molecular de hongos micorrízicos arbusculares

Para aislamiento de esporas de HMA se utilizó el método de tamizado (Gerderman y Nicholson 1963), las esporas aisladas se inocularon en plantas de alfalfa como cultivo trampa, luego para la detección de micorrizas se realizó la tinción de raíces con el

colorante azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970). Para la extracción de ADN de HMA se utilizó los métodos de Shafiqua and Stephan (2013); Salim Khan *et al.* (2007) y Michiels *et al.* (2003). Para la amplificación del ADN obtenido se utilizó la técnica de Seminested PCR, usándose los primers externos (NS5+ITS4) y específicos (NS5+GLOM5.8R; ITS4+GLOM1310; NS5+GIGA5.8R). Mediante electroforesis se confirmó la presencia o ausencia de ADN de HMA.

Micropropagación *in vitro* de *O. ficus-indica* var. *inermis*.

Para la extracción y siembra de explantes, los cladodios fueron cortados a una longitud de 3 cm², éstos fueron desinfectados con alcohol al 70% y enjuagados con agua destilada, seguido de una desinfección con hipoclorito de sodio al 5% y enjuagados; finalmente se sembraron en medio MS. Para el establecimiento, las secciones que no presentaban contaminación permanecieron en el medio de establecimiento por 15 días más, los brotes de 1cm fueron sembrados nuevamente en el medio de cultivo hasta alcanzar una altura de 2 cm y ser llevados a multiplicación. Para aclimatación, las plántulas se trasplantaron en macetas conteniendo sustrato PREMIX #8, cubiertas con plástico para mantener la humedad elevada hasta lograr la aclimatación *ex vitro* deseada (Figura 1).

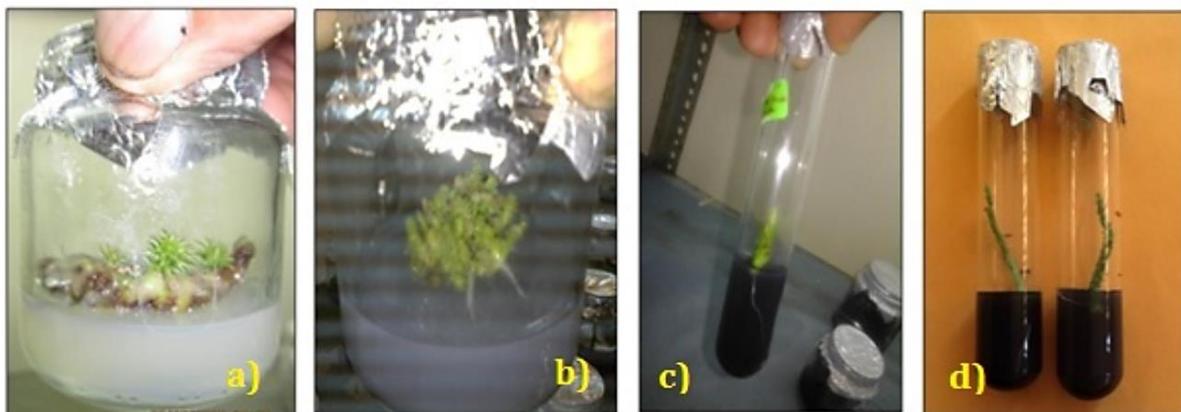


Figura 1. Micropropagación *in vitro* de *O. ficus-indica* var. *inermis* en. a) Fase de establecimiento. b) Fase de multiplicación. c) Fase de enraizamiento. d) Plantas aptas para aclimatación.

Elaboración de tratamientos microbianos e inoculación a plantas

Los tratamientos bacterianos fueron:

Tratamiento 0: Sin inóculo bacteriano.

Tratamiento 1: *Consortio Enterobacter*.

Tratamiento 2: *Consortio Pseudomonas*.

Tratamiento 3: *Consortio Acinetobacter*.

Tratamiento 4: *Serratia marcescens*.

Tratamiento 5: *Leclersia adecarboxylata*.

Tratamiento 6: *Bacillus sp.*

Tratamiento 7: *Bacillus cereus*.

Tratamiento 8: *Pseudomonas sp.*

Tratamiento 9: *Klebsiella pneumoniae*.

Para la inoculación de las plantas se agregó 5 ml del inóculo al sustrato de la planta. Los tratamientos de HMA fueron: PP: Micorrizas de Puerto Pizarro, CO: Micorrizas de Corrales, CB: Micorrizas de Cabuyal, CA: Micorrizas de Casitas, UG: Micorrizas de

Uña de gato y CT: Tratamiento sin inóculo. Para elaboración de inóculos de HMA se utilizó sustrato de los cultivos trampa y se mezcló con el sustrato de la planta.

Evaluación del crecimiento morfológico de *O. ficus-indica* var. *Inermis*

Después de 8 semanas de sometidos a los diferentes tratamientos se consideró como parámetros no destructivos: longitud, ancho y espesor del cladodio; y como parámetros destructivos: peso fresco de cladodio, peso seco, longitud de raíz, peso fresco de raíz, peso seco de raíz, contenido relativo de agua (CRA) y área del cladodio. Los resultados obtenidos fueron procesados usando el software estadístico R, mediante análisis de varianza y prueba comparación de medias de Tukey.

Resultados

Aislamiento e identificación molecular de bacterias cultivables

Se identificó 198 cepas bacterianas cultivables en base a las secuencias de amplicones con análisis subsecuente por Blast frente a los datos del NCBI (Figura 2). Éstas han sido clasificadas en 48 especies y 16 géneros que son en su mayoría *Enterobacter* (87 cepas), *Pseudomonas* (46 cepas), *Klebsiella* (23 cepas) y *Acinetobacter* (13 cepas).



Figura 2. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares, a) Aisladas por tamizado en rizósfera *O. ficus-indica* b) Teñidas con azul de tripano, en raíces de cultivo trampa de *M. sativa*.

Aislamiento e identificación molecular de HMA

El aislamiento de esporas de HMA por el método del tamizado (Gerderman y Nicholson, 1963), dichas esporas se muestran a 100 X aumentos en microscopio óptico. Asimismo, también se presentan las

esporas de HMA teñidas con azul de tripano (Phillips y Hayman 1970). Para análisis molecular se logró optimizar el protocolo de extracción de ADN, con las siguientes fases: lisis celular, purificación, precipitación, lavado, secado y resuspensión del ADN (Shafiqua y Stephan 2013). Asimismo, obtuvimos los diferentes programas optimizados para cada seminested PCR. La optimización del programa de PCR, condujo a probar diferentes temperaturas de desnaturalización, hibridación y polimerización además de los tiempos y ciclos. Cada combinatoria de Primers fue de 35 ciclos, siendo la desnaturalización inicial y polimerización final de 1 ciclo. Para identificar el género *Glomus* los Primers internos fue ron NS5+GLOM5.8R e ITS4+GLOM1310 y para *Gigaspora* fue NS5+GIGA5.8R.

Evaluación del crecimiento morfológico de *O. ficus-indica* var. *inermis*

Los resultados de crecimiento morfológico se muestran en la Tabla 1 para tratamientos bacterianos y en la Tabla 2 para tratamientos con micorrizas. Asimismo, dada la elevada cantidad de información generada, solo fue posible mostrar resultados que presentan diferencias significativas en materia de crecimiento de la planta (Figuras 3 y 4).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento morfológico promedio en el tratamiento bacterianos

T	Raíz			Cladodio						
	Longitud (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Área (cm ²)	CRA
T0	12,9	1,1	0,13	98,92	64,25	8,25	60,38	4,06	31,26	70,89
T1	14	1,06	0,13	97,17	64,85	7,48	55,42	3,29	21,95	69,64
T2	15,32	1	0,13	111,31	67,35	7,77	59,27	2,38	22,71	71,46
T3	14,55	0,98	0,12	104,59	65,31	7,51	59,89	2,2	22,24	73,22
T4	13,96	1,11	0,12	111,68	67,27	7,6	52,02	2,65	17,77	67,78
T5	13,08	1,09	0,15	110,54	68,07	8,19	62,59	3,6	30,32	71,66
T6	14	1,5	0,18	106,23	72,87	8,7	67,41	2,5	23,24	74,47
T7	14,21	1,08	0,13	92,71	67,02	8,41	56,96	3,54	23,34	72,79
T8	14,54	1,24	0,15	99,46	60,78	9,14	69,8	4,43	24,48	75,44
T9	13,46	1,08	0,11	98,86	67,44	8,01	55,06	3,16	20,42	72,69

Tabla 2. Parámetros de crecimiento morfológico promedio en el tratamiento con hongos micorrízicos

T	Raíz			Cladodio						
	Longitud (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Área (cm ²)	CRA
CT	16,29	1,81	0,18	92,14	63,94	10,94	49,85	5,24	17,57	70,03
PP	14,88	2,23	0,21	87,25	60,14	8,74	40,27	4	14,64	68,59
CB	15,81	1,25	0,14	99,24	60,04	7,69	35,15	3,25	0	71,24
CO	17,56	2,83	0,29	97,24	56,49	10,31	46,74	4,48	0	62,2
UG	11,75	1,4	0,13	110,68	61,9	7,62	42,04	4,03	13,1	73,22
CA	13	2,44	0,23	119,87	70,28	9,12	62,38	5,33	8,65	72,01

Discusión

Según lo expuesto por Prashar *et al.* (2014), las bacterias cultivables que han sido identificadas molecularmente corresponden al 1% de bacterias presentes en la rizósfera y que pueden obtenerse por medios de cultivo. Asimismo, según Schoebitz (2006) y Prashar *et al.* (2014) aproximadamente 2 a 5% de las bacterias presentes en la rizósfera son Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (RPCP), en nuestros resultados presentados destacan los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, y *Acinetobacter*, conocidos por ser RPCP (Döbereiner *et al.*, 1995), entre sus principales funciones se encuentran el mejoramiento del contenido de nitrógeno en el suelo y por ende mejoras en el crecimiento de la planta, entre otros (Loredo *et al.*, 2004; Schoebitz, 2006; Prashar *et al.*, 2014).

Por otro lado, las técnicas para aislar Gerderman y Nicholson (1963) y teñir (Phillips y Hayman, 1970) esporas de HMA, fueron optimas en este trabajo. Además, para el análisis molecular se realizó la extracción de ADN de HMA con nitrógeno líquido para la lisis celular, el empleo de este permitió aumentar el rendimiento y la calidad del material genético obtenido (Kang y Yang, 2004). Así mismo se usó la técnica de Semi-nested PCR debido a que presenta una mayor especificidad en comparación con una PCR simple (Redecker, 2000). Además, la optimización de temperaturas de hibridación nos permite la estabilidad y especificidad del producto o amplicon (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

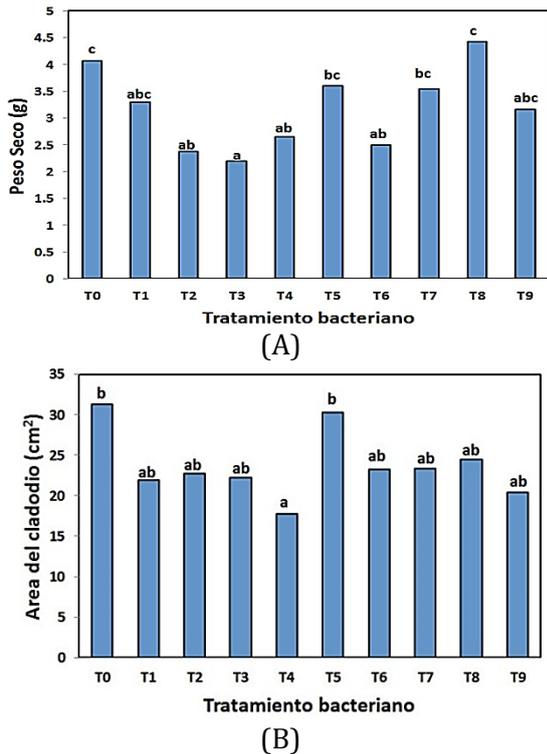


Figura 3. (A) Peso Seco y (B) Área del cladodio promedio (n = 15) de plantas de *O. ficus-indica* inoculadas con tratamientos bacterianos. (T0) tratamiento sin inóculo, (T1) Consorcio *Enterobacter*, (T2) Consorcio *Pseudomonas*, (T3) Consorcio *Acinetobacter*, (T4) *Serratia marcescens*, (T5) *Leclersia adecarboxylata*, (T6) *Bacillus sp*, (T7) *Bacillus cereus*, (T8) *Pseudomonas sp*, (T9) *Klebsiella pneumoniae*. Las letras diferentes (a, b y c) indican diferencias significativas (p < 0,05) según prueba comparación de medias de Tukey.

Con respecto al desarrollo morfológico del cactus inoculado con los tratamientos descritos (tablas 1 y 2), podemos indicar que nuestros resultados sugieren que existe un potencial sobre el rol que cumplen las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos micorrízicos en el desarrollo morfológico de los cactus (Nadeem, *et al.*, 2014). Las cepas caracterizadas deberán de seguir siendo evaluadas para lograr aclarar algunos efectos específicos que tienen estas sobre el desarrollo de plantas y a futuro sobre su productividad, así mismo se conoce que existe una interacción entre bacterias² y hongos micorrízicos en el potenciamiento del crecimiento de la planta (Artursson *et al.*, 2006, Zarik *et al.*,

2016), que deberá ser evaluada posteriormente.

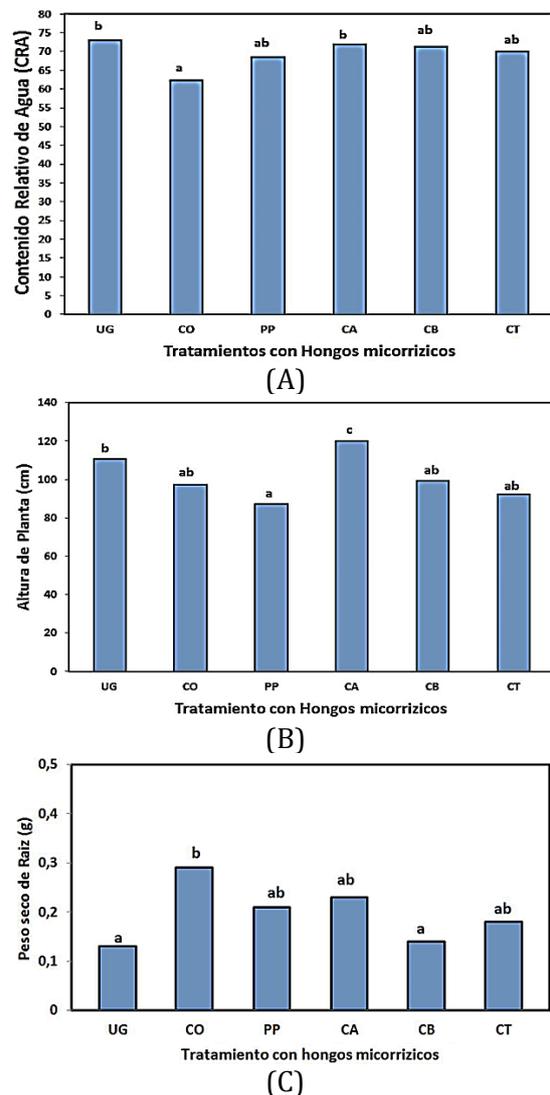


Figura 4. (A) Contenido Relativo de Agua (CRA), (B) altura de planta promedio y (C) peso seco de raíz promedio (n = 10) de plantas de *O. ficus-indica* inoculada con tratamientos con hongos micorrízicos. Tratamiento PP: Micorrizas de Puerto Pizarro. CO: Micorrizas de Corrales, CB: Micorrizas de Cabuyal, CA: Micorrizas de Casitas, UG: Micorrizas de Uña de gato, CT: Tratamiento sin inóculo. Las letras diferentes (a, b y c) indican diferencias significativas (p < 0,05), según prueba comparación de medias de Tukey.

Para el caso de tratamientos bacterianos los parámetros resaltantes mostrados en los resultados fueron: peso seco del cladodio y área de cladodio (Figura 3A y 3B), en estas se observa que estos

parámetros son más susceptibles a la variación con respecto a su desarrollo morfológico debido al efecto ejercido por de las bacterias inoculadas (Vejan *et al.*, 2016). La respuesta ante la inoculación no tuvo diferencia significativa ante el efecto de los tratamientos bacterianos en el crecimiento del cactus, esto pudo deberse a que las cepas no encontraron el medio adecuado en la rizósfera, ya que, en general, para que los microorganismos puedan asociarse íntimamente con las raíces, tienen que escapar de los mecanismos de defensa de la planta y encontrar condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para su crecimiento (Díaz Almaraz y Alcántara, 2001)

Así mismo, para los tratamientos con micorrizas se destacan peso seco de raíz, altura de planta y el CRA (Figura 4A, 4B y 4C). Si bien el tratamiento no mostró incremento significativo respecto al control en CRA, el tamaño de la raíz fue más

robusta y ramificada, reflejándose en un mayor peso seco (Corrales, Puerto Pizarro y Casitas). Se ha reportado que en condiciones de estrés las raíces se vuelven más ramificadas y de mayor biomasa, permitiéndoles tener mayor capacidad de absorción y tolerancia al estrés (Carreón *et al.*, 2013). El mejor crecimiento de la parte aérea se encontró en cladodios provenientes de Uña de Gato, Corrales, Casitas y Cabuyal, los cuales pueden compararse con resultados obtenidos por Carreón *et al.* (2013), donde se demostró que la planta *Viola calaminaria* desarrolló mejor tamaño cuando creció asociada con *Glomus*. La muestra proveniente de Puerto Pizarro, quien presentó menor crecimiento, se puede decir que fue debido al pH, humedad del suelo y la disponibilidad de nutrientes, los mismos que influyen tanto en la colonización micorrízica como en el número de esporas (Khana *et al.*, 2006).

Conclusiones

Se caracterizó molecularmente 198 cepas bacterianas cultivables de *O. ficus-indica* var. *Inermis*; estas fueron clasificadas en 48 especies y 16 géneros.

Se identificó el género *Glomus*, correspondiente a hongos Micorizicos arbusculares de *O. ficus-indica* var. *Inermis*.

En la evaluación del crecimiento morfológico de *O. ficus-indica* var. *inermis*, se determinó que con el inoculó de bacterias *Pseudomonas sp.* se alcanzó un mayor peso fresco de cladodio y peso radicular de los mismos y en el tratamiento con micorrizas del sector de Cabuyal se logró el mayor peso fresco de cladodio.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Nacional de Tumbes por el apoyo financiero, a través de los recursos de Canon y sobre Canon; al consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e

Innovación, CONCYTEC, por las becas a estudiantes de Maestría y a la Empresa de Biotecnología molecular IncaBiotec SAC.

Referencias bibliográficas

Aguirre-Garrido, J.F.; Montiel-Lugo, D.; Hernández, C.; Torres-Cortés, G.; Milan, V.; Toro, N.; Martínez, F.; Ramírez, H. 2012. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid

highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek* 101: 891–904.

Alary, V.; Nefzaoui, A.; Jemaa, B. 2007. Promoting the adoption of natural resource management technology in arid and semi-

- arid areas: modelling the impact of spineless cactus in alley cropping in Central Tunisia. *Agricultural systems* 94(2): 573-585.
- Artursson, V.; Finlay, R.D.; Jansson, J.K. 2006. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environ Microbiol.* 8(1): 1-10.
- Carreón, Y.; Beltrán-Nambo, M.; Martínez, T. 2013. Protective effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plants of tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to Cr(VI). *FYTON* 82: 127-134.
- Díaz, P., Ferrera, R.; Almaraz, J.J.; Alcántara, G. 2001. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra* 19: 4.
- Döbereiner, J.; Urquiaga, S.; Boddey, M.; Ahmad, N. 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. *Nitrogen economy in tropical soil. Fertil. Res.* 42: 339-346.
- Gerderman, J.; Nicholson, T. 1963. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Gómez, L.; Hernández, M.; Herrera, M.; Arroyo, F.; Vargas, R.; Olalde, P. 2012. Aislamiento de Bacterias Promotoras del Crecimiento de la Rizósfera de Plantas de Guayaba (*Psidium guajava*). *Ra Ximhai* 8(3): 97-102.
- Kang, T.J.; Yang, M.S. 2004. Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology* 4(20): 1-12.
- Khana, D.; Mridha, M.A.U.; Solaiman, A.R.M.; Tofazzal, H. 2006. Effect of edaphic factor son root colonization and spore population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Bulletin Institute. Tropical Agriculture* 29: 97-104.
- Loredo, O.; López, R.; Espinosa, V. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión *TERRA Latinoamericana* 22(2): 225-239.
- Marasco, R.; Rolli, E.; Ettoumi, B.; Vigani, G.; Mapelli, F.; Borin, S.; Abou-Hadid, A.; El-behairy, U.; Sorlini, C.; Cherif, A.; Zocci, G.; D. Daffonchio. 2012. A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming. *Microbial Diversity and Plant Drought Resistance. Argonne National Laboratory. Estados Unidos de América:* Edit. J. Gilbert.
- Michiels, A.; Wim Van den Ende, M.; Tucker, M.; Van Riet, L.; Van Laere, A. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal Biochem* 315(1): 85-89.
- MINAM. 2011. La desertificación en el Perú. Cuarta Comunicación Nacional del Perú a la Convención de Lucha contra la desertificación y la sequía. Perú: Ministerio del Ambiente.
- Nadeem, S.M.; Ahmad, M.; Zahir, Z.A.; Javaid, A.; Ashraf, M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnol Adv.* 32(2): 429-48.
- Nobel, P. 2002. *Cacti: Biology and use*. Los Angeles, Londres: University of California press. Berkley.
- Phillips, J.; Hayman, D. 1970. Improves procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158 - 161.
- Prashar, P.; Kapoor, N.; Sachdeva, S. 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Rev Environ Sci Biotechnol* 13: 63-77.
- Pulido, L.E.; Medina, N.; Cabrera, A. 2003. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y cebolla (*Allium cepa* L.). I. crecimiento vegetativo. *Cultivos Tropicales* 24(1): 15-24.
- Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10(2): 73-80.
- Reynolds, S. 2003. El nopal (*Opuntia spp.*) como forraje en Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y2808s/y2808s04.htm#BM04>
- Salim, K.; Irfan, M.; Kamaluddin; Tanweer A.; Abdin, M.Z. 2007. Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion. *African Journal of Biotechnology* 6(3): 175-178.
- Schoebitz, M. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum sp.*). Tesis Licenciado Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia - Chile.
- Shafiqua, G.; Stephan, R. 2013. Molecular detection of Arbuscular mycorrhizal fungi in calcareous soil and roots of *Zea mays* L. *J. Acad. Indus. Res.* 1(9): 547-549.

- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud* 2(2): 70-78.
- Thompson, J. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In *Advances in soil sciences*. Stewart, BA, 1-40. New York: Springer-Verlag.
- UNEP. 2006. Los desiertos: perspectivas.
- Vejan, P.; Abdullah, R.; Khadiran, T.; Ismail, S.; Nasrulhaq, A. 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability. A Review. *Molecules* 21(5): 1-17
- Zarik, L.; Meddich, A.; Hijri, M.; Hafidi, M.; Ouhammou, A.; Ouahmane, L.; Duponnois, R.; Boumezzough, A. 2016. Use of arbuscular mycorrhizal fungi to improve the drought tolerance of *Cupressus atlantica* G. *C R Biol.* 339(5-6): 185-196.