

<https://doi.org/10.15517/1xmz9014>

Bacterias rizosféricas asociadas a *Dryopteris pseudofilix-mas* (Dryopteridaceae) en el Monte Tláloc, México

Rosa Mireya López-Ambrocio¹;  <https://orcid.org/0000-0002-3424-7322>

Ronald Ferrera-Cerrato²;  <https://orcid.org/0000-0001-5143-0172>

Juan J. Almaraz^{2*};  <https://orcid.org/0000-0002-2696-2684>

Libia Iris Trejo-Téllez²;  <https://orcid.org/0000-0003-3433-065X>

Leticia Pacheco³;  <https://orcid.org/0000-0001-7804-8512>

Ma. Cristina Gpe. López-Peralta¹;  <https://orcid.org/0000-0002-6816-1260>

Oscar García-Barradas⁴;  <https://orcid.org/0000-0001-8986-7214>

Sandra Cortés-Pérez²;  <https://orcid.org/0000-0002-3102-0173>

Azareel Angulo-Castro⁵;  <https://orcid.org/0000-0002-5824-3609>

1. Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México; rosiambrocio@gmail.com, cristy@colpos.mx
2. Postgrado de Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México; ronaldfe@colpos.mx, jalmaraz@colpos.mx (*Correspondencia); tlibia@colpos.mx; sandracortespez04@gmail.com
3. Área de Botánica, Depto. de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Av. Ferrocarril San Rafael Atlixco 186, Col. Leyes de Reforma 1ª Sección Alcaldía Iztapalapa 09340 Ciudad de México, México; pacheco@xanum.uam.mx
4. Instituto de Química Aplicada, Universidad Veracruzana. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Ánimas C.P. 91190, Xalapa 91190, Veracruz, México; osgarcia@uv.mx
5. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-El Dorado km 17.5, Culiacán Rosales 80000, Sinaloa, México; Azareel.angulo@uas.edu.mx

Recibido 22-IV-2024. Corregido 12-XII-2024. Aceptado 02-IX-2025.

ABSTRACT

Rhizospheric bacteria associated with *Dryopteris pseudofilix-mas* (Dryopteridaceae) at Mount Tláloc, México

Introduction: Plant roots harbor communities of bacteria that can provide benefits to their host through the production of phytohormones, phosphate solubilization, and nitrogen fixation. In Mexico, there are few studies on the richness and diversity of rhizobacteria communities associated with ferns.

Objective: To analyze and identify the functional groups of bacteria from the rhizosphere of *Dryopteris pseudofilix-mas* in Mount Tláloc, Mexico.

Methods: Rhizospheric soil from *D. pseudofilix-mas* was collected at four sites where this fern occurs naturally. Bacterial populations were quantified by the plate count and dilution method. The isolated strains were characterized and identified using the 16S rDNA gene. Physical and chemical characteristics of the soil were determined and data of soil moisture, temperature and light in the canopy were collected.



Results: The total bacteria population was from 30.1 to 92.3 x 10⁴ CFU g⁻¹ soil. Soil pH and phosphorus content influenced the density of bacterial populations. About 108 bacterial strains were isolated, 92 were Gram-negative and 16 Gram-positive. The isolated strains belonged to 20 genera, being the most abundant *Pseudomonas* and *Bacillus*. The Sørensen index indicates that the species of bacteria are similar in the four sites; *Pseudomonas jessenii* was present in the four sites. The bacterial strains presented more than one plant growth promoting activity, being the group of nitrogen fixers the most abundant.

Conclusions: The rhizosphere of *D. pseudofilix-mas* harbors diverse groups of functional bacteria that could potentially be used in biotechnology for ecological restoration or agricultural purposes. The bacterial population of the four sites was dominated mainly by *Pseudomonas* and *Bacillus*.

Keywords: Fern; rhizobacteria; soil microorganisms; diversity; vegetation.

RESUMEN

Introducción: Las raíces de las plantas albergan comunidades de bacterias que pueden proveer beneficios a su hospedante a través de la producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno. En México se cuenta con pocos estudios sobre la riqueza y diversidad de las poblaciones de rizobacterias asociadas a helechos.

Objetivo: Analizar e identificar grupos funcionales de bacterias de la rizosfera de *Dryopteris pseudofilix-mas* en el Monte Tláloc, México.

Métodos: Se recolectó suelo rizosférico de cuatro sitios donde este helecho crece en forma natural. Las poblaciones de bacterias fueron cuantificadas por el método de dilución y conteo en placa. Las cepas aisladas fueron caracterizadas e identificadas usando el gen 16S rDNA. Se determinaron las características físicas y químicas del suelo y se registraron datos de humedad del suelo, temperatura y luz recibida sobre el dosel del helecho.

Resultados: La población de bacterias totales fue de 30.1 a 92.3 x 10⁴ UFC g⁻¹ suelo. El pH y el contenido de fósforo en el suelo influyeron en la densidad de las poblaciones bacterianas. Se aislaron 108 cepas bacterianas, 92 fueron Gram-negativas y 16 Gram-positivas. Las cepas aisladas pertenecieron a 20 géneros, los más abundantes fueron *Pseudomonas* y *Bacillus*. El índice de Sørensen indica semejanza en las especies de bacterias en los cuatro sitios, *Pseudomonas jessenii* estuvo presente en los cuatro sitios. Las cepas bacterianas presentaron más de una actividad promotora del crecimiento vegetal, el grupo de fijadores nitrógeno fue el más abundante.

Conclusiones: La rizosfera de *D. pseudofilix-mas* alberga diversos grupos de bacterias funcionales que potencialmente pueden usarse en una biotecnología para la restauración ecológica o para fines agrícolas. La población bacteriana de los cuatro sitios estuvo dominada principalmente por *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Palabras clave: helecho; rizobacterias; microorganismos del suelo; diversidad; vegetación.

INTRODUCCIÓN

Los helechos son plantas vasculares cuya dispersión es por medio de esporas (Martínez-Salas & Ramos, 2014). Sus rizomas y raíces son fuentes sustanciales de materia orgánica que pueden mantener una gran diversidad de comunidades microbianas (Anderson, 2009), no obstante, son un grupo de plantas pobremente estudiado en relación con los microorganismos asociados a su rizosfera.

Las comunidades bacterianas del suelo asociadas a la rizosfera de las plantas son valiosas a nivel ecológico y biotecnológico, dado que, influyen en la fisiología y crecimiento de las plantas. Si bien, algunas comunidades de

bacterias en la rizosfera promueven el crecimiento vegetal, otras son patógenas (Mendes et al., 2013). Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) tienen efectos benéficos en el crecimiento de las plantas mediante distintos mecanismos como son la producción de fitohormonas, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, entre otros (Reed & Glick, 2023).

Se ha sugerido que cada especie de planta tiene su microbioma específico (Mendes et al., 2013), dado que, se ha observado que la abundancia y composición de las comunidades bacterianas en la rizósfera tienden a cambiar con diferentes especies de plantas (Chaluvadi & Bennetzen, 2018; Mitter et al., 2013). La

actividad de estas comunidades es estimulada por los exudados de las raíces como aminoácidos, grasas, ácidos, nucleótidos, esteroides, azúcares, vitaminas y ácidos orgánicos, los cuales varían en cantidad y composición en función de la especie vegetal (Qu et al., 2020).

A la fecha, se conoce que seis especies de helechos han sido objeto de estudio para conocer sus interacciones con rizobacterias; y se ha observado que a sus raíces se asocian cepas de *Aeromonas aquatica*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyonensis*, *Paenibacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. De las cuales, algunas cepas se han citado por presentar actividades de promoción en el crecimiento vegetal (Antenzio et al., 2021; Byung-Chun et al., 2009; Huang et al., 2010; Quisehuatl-Tepexicuapan et al., 2016; Sen et al., 2018; Watrud et al., 2003).

Por lo tanto, el análisis de las comunidades bacterianas asociadas a este grupo de plantas permitiría inferir sobre las funciones que desempeñan los gremios presentes y si existe cierta afinidad entre comunidades bacterianas y las raíces de los helechos. En México, los estudios sobre la riqueza y diversidad de las poblaciones de rizobacterias asociadas a helechos son escasos (Rincón-Molina et al., 2022).

Las especies del género *Dryopteris* poseen notables propiedades medicinales, como son antihelmínticas, antimicrobianas y antiinflamatorias, además recientes investigaciones citan que algunas poseen actividades citotóxicas (Han et al., 2015; Li et al., 2023; Ping et al., 2023; Zhang et al., 2023). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar, cuantificar y determinar grupos funcionales de rizobacterias asociadas a *Dryopteris pseudofilix-mas* (Fée) Rothm., este helecho se distribuye en México, crece principalmente en bosques de *Abies religiosa*, *Pinus-Quercus* y barrancas boscosas de *Juniperus*, en altitudes de 2 400 a 3 650 m.s.n.m. (Oseguera-Olalde et al., 2022; Rodríguez et al., 2008), en suelos ácidos a ligeramente ácidos, con alto contenido de materia orgánica. Se encuentra principalmente en cañadas y en orillas de los ríos, o en sitios donde hay mayor humedad; no hay una descripción precisa de la ecología de esta especie (Rodríguez et al., 2008).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: El área de estudio se encuentra en la región fisiográfica conocida como Sierra Nevada, en la parte oriental del Estado de México, sobre el declive oeste del Monte Tláloc. El muestreo se realizó en la cañada localizada hacia el este de la comunidad de San Pablo Ixayoc, en un trayecto de 2 km (19°26'23.7"-19°26'52.9" N & 98°45'49.8"-98°46'8.6" W) a una altitud entre 2 947 y 3 019 m. En la parte alta de la cañada la vegetación corresponde a bosque de *Abies religiosa* y en la parte baja es bosque mixto (*Quercus laurina* y *Quercus rugosa*, *Abies religiosa*, *Cupressus lussitanica*, *Arbutus xalapensis*). El clima es templado y húmedo, con lluvias en el verano (Sánchez & López, 2003), la precipitación anual oscila entre 500 y 900 mm, y la temperatura media anual es de 14 °C, la máxima de 21 °C y la mínima de 7 °C, de acuerdo con los datos climáticos de la estación meteorológica de San Juan Tolopan, localizada a 10 km del área de estudio y a una altitud de 2 750 m (Conagua, 2024). Los suelos del área de estudio son ricos en materia orgánica, derivados de cenizas volcánicas y clasificados como andosoles de moderado desarrollo (Galván-Díaz, 2021).

Recolección de material biológico: Se seleccionaron cuatro sitios localizados a lo largo de la cañada, a 500 m de distancia una de otra. En cada sitio se seleccionaron cuatro individuos de cobertura y tamaño similar (Bautista-Cruz et al., 2014), en los cuales se tomaron muestras de suelo rizosférico (100 g) de cuatro puntos equidistantes a una profundidad de 15 cm. Las muestras de cada planta se mezclaron para obtener una muestra compuesta y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento (Lara-Pérez et al., 2015).

En campo, se registró la temperatura del suelo con un termómetro (HANNA, HI-145, Limena, Italia), la humedad del suelo se determinó con un medidor Field Scout (Spectrum technologies, Inc., TDR-300, Aurora, EE. UU.) y la radiación fotosintéticamente activa se midió por arriba del dosel del helecho con un sensor



unido a un Dataloger (Spectrum technologies, Inc., WatchDog 1 400, Aurora, EE. UU.).

De acuerdo con lo indicado por Lorea y Riba (1990) se recolectaron dos ejemplares completos, se prensaron y se llevaron al laboratorio para su herborización. Los ejemplares se identificaron mediante el uso de claves a nivel de familia, género y especie (Mickel & Smith, 2004). El material de respaldo se depositó en Herbario-Hortorio (CHAPA), del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, con número de acceso 154-990.

Análisis fisicoquímico de suelo: Las muestras del suelo rizosférico fueron tamizadas con malla de 2 mm y secadas al aire. La densidad aparente se determinó por el método de Blake y Hartge (1986). Con un potenciómetro (OHAUS, ST3100-F, Parsippany, EE. UU.) se midió el pH y la conductividad eléctrica en dS m^{-1} a 25 °C (suelo:agua en relación 1:2, p:v). El fósforo disponible se determinó por el método de Bray y Kurtz (1945). La materia orgánica (M. O.) se estimó por el método de Walkley y Black (1934). El nitrógeno total se determinó a través del método semi-micro Kjeldahl (Etchevers, 1987). El tipo de suelo en los sitios muestreados es andosol.

Cuantificación de microorganismos rizosféricos: Las poblaciones de bacterias fueron cuantificadas por el método de dilución y conteo en placa. Para esto se pesaron 10 g de suelo rizosférico y se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-5} . De cada dilución respectiva se tomó una alícuota de 100 μL y se distribuyó en la caja Petri que contenía medio de cultivo sólido (Aquiahuatl et al., 2012). Los medios de cultivo empleados fueron Agar nutritivo para bacterias totales, Agar Czapek Dox para actinobacterias (Wollum, 1982), Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) para bacterias solubilizadoras de fosfato, medio de Rennie (Rennie, 1981) para bacterias fijadoras de nitrógeno, Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951) para bacterias productoras de auxinas y medio agar-carboximetil celulosa (Vedder, 1951) para bacterias celulolíticas. La siembra se realizó por

triplicado. Después de la siembra, las cajas de Petri se colocaron en una incubadora (BINDER, FD115, Tuttlingen/Alemania), bajo condiciones de oscuridad, a 28 °C.

El conteo de microorganismos se efectuó tres días después de la incubación en las placas que contenían de 30 a 300 colonias. La cantidad de microorganismos en las muestras de suelo rizosférico se determinó como unidades formadoras de colonias y se promedió. La fórmula que se utilizó fue:

$$UCF=A*BD$$

donde A es el promedio del número de colonias, B el factor inverso de la dilución y D la cantidad que se agregó de la dilución. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1} suelo seco) (Ramírez-Gama et al., 2015). En el caso de las actinobacterias se cuantificaron las colonias secas y polvosas, que en observación microscópica presentaban filamentos.

Para bacterias celulolíticas, transcurrido el tiempo de incubación se adicionó Rojo Congo al 0.1 % como revelador de colonias presentes en el medio, después de 15 min se retiró el exceso y se agregó NaCl 1 M por 15 min, para luego hacer el conteo de las colonias que presentaron halos de hidrólisis. Las colonias solubilizadoras de fosfato en medio Pikovskaya se identificaron por la formación de un halo transparente alrededor de las colonias. De las colonias crecidas en medio LB sólido se tomaron muestras y se sembraron en microplacas de 96 pozos que contenían medio LB líquido. Las microplacas se incubaron por 48 h, luego se les adicionó el reactivo Salkowski (2 ml de FeCl_3 al 0.5 M en 100 ml de ácido perclórico al 35 %) y se dejaron en oscuridad por 30 min. El cambio de color a rosa, que varía en tonalidad, es característico de bacterias que producen auxinas. Las colonias que crecen en medio de Rennie fijan nitrógeno, ya que el medio no tiene una fuente de nitrógeno.

Aislamiento y determinación de función ecológica de las cepas bacterianas: Se aislaron

y purificaron colonias bacterianas con diferente tamaño, color y apariencia. A todas las cepas se les realizó una tinción de Gram (Ramírez-Gama et al., 2015). Las cepas se cultivaron en diferentes medios para evaluar su función (características asociadas a su capacidad de promover crecimiento vegetal). Las pruebas se realizaron a 108 cepas de bacterias aisladas, cada prueba se realizó por triplicado. Se emplearon los medios específicos: medio agar-carboximetil celulosa, medio libre de nitrógeno (NFB) (Döbereiner & Day, 1976), Pikovskaya y medio LB. El procedimiento para identificar cepas con capacidad de degradar celulosa, fijar nitrógeno, solubilizar fosfato y producir auxinas fue el mismo que se usó en la cuantificación de microorganismos.

Identificación molecular de las cepas bacterianas: Cada cepa bacteriana aislada se cultivó en medio King B, a temperatura ambiente durante 2 días para la extracción de ADN. Cada colonia bacteriana se recolectó y se procedió a la extracción de DNA de acuerdo con el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2 % (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; EDTA 2H₂O mM; CTAB 2 %; NaCl 1.4 M) (Doyle & Doyle, 1990).

La amplificación ribosomal se realizó mediante PCR correspondiente a la subunidad pequeña 16S rDNA. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 15 μ L que contenía 7.86 μ L de agua HPLC, 3 μ L de 5 x PCR buffer, 0.6 μ L de dNTPs (20 μ M de cada uno), 0.18 μ L de cada iniciador (10 μ M) (Sigma-Aldrich, EE. UU.), 3 μ L de DNA genómico (20 ng) y 0.18 μ L (2U) de GoTaq DNA polimerasa (Promega, EE. UU.). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (BIO-RAD, C1000 Touch, EE. UU.).

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa (Seakem, EE. UU.) al 1.5 % teñido con GelRed (Biotium, EE.UU.) corrido a 88 V durante 1.5 h. Los geles se visualizaron en un transiluminador Infinity (Vilber Lourmat, 3 026 WL/LC/26MX, Vilber Lourmat, Alemania) con el software Infinity-Capt y se limpiaron con la enzima

ExoSAP-IT (Affymetrix, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron con el software BioEdit Sequence Alignment Editor v7.2.6 (Hall, 1999), creándose una secuencia consenso para cada una de las cepas, las que se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con la opción BLAST_nucleotide 2.2.29. Las secuencias consenso se compilaron en un formato fasta. El alineamiento múltiple de secuencias se efectuó con la opción MUSCLE (Edgar, 2004) incluido en el MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de tres parámetros de Tamura (Tamura & Nei, 1993). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-10 871.74). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo de parámetro Tamura 3, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.3873)). El árbol fue dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 32 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 1 553 posiciones en el conjunto de datos finales. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018). Se utilizó una secuencia de arqueobacteria como grupo externo. En negritas se muestran los grupos de referencia incluidos en el análisis.

Análisis estadístico: los datos de las unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos en la rizósfera se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias por Tukey con $\alpha = 0.05$ usando el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS, 2002). Se realizó



un análisis de correlación Pearson para determinar si existe una relación entre las UFC bacterianas y las características físicas y químicas del suelo. El reemplazamiento de especies de rizobacterias entre sitios se calculó utilizando el índice de similitud de Sørensen que se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $IS = 2C/A + B$, donde A y B son el número de especies en las muestras A y B, respectivamente, y C es el número de especies compartidas por las dos muestras (Moreno, 2001). El valor de este índice varía de 0 a 1, donde 0 indica que no hay especies en común, y 1 que todas las especies son compartidas (Magurran, 1988).

RESULTADOS

Variables registradas en campo: El área de estudio presentó homogeneidad ambiental, los valores de temperatura del suelo ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y del suelo son similares. En la Tabla 1 se muestran los promedios de la altitud registrados en cada sitio de muestreo, la altitud varió de 3 019 a 2 947 m. La radiación fotosintéticamente activa (RFA) fue baja en los cuatro sitios de muestreo. Aun cuando fue baja, el mayor valor se obtuvo en el sitio 4 con $141.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En los demás sitios la RFA fue similar.

La humedad relativa fue mayor en los sitios 1, 2 y 3 con valores de 60.9, 63 y 62.1 % respectivamente, en estos sitios el dosel del bosque fue más denso, mientras que en el sitio 4 la incidencia del sol fue más directa, el sitio 4 presentó la menor humedad relativa con 55.8 %.

Características físicas y químicas del suelo: En los sitios de estudio los valores de pH fluctuaron de 5.3 a 6.1, el fósforo disponible de 66.5 a 33.5 mg kg^{-1} , el nitrógeno total de 0.50 % a 0.33 % y el contenido de materia orgánica (M. O.) de 3.4 a 4.2 %, la conductividad eléctrica tuvo valores de 0.41 a 0.99 dS m^{-1} y la densidad aparente (D. A.) de 0.81 a 0.95 g cm^{-3} (Tabla 2).

Cuantificación de microorganismos rizosféricos: Las poblaciones de bacterias en cada sitio de muestreo presentaron diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) (Tabla 3). El sitio 4 presentó la población más alta de bacterias totales (BT) y bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN), con 92.3×10^4 y 11.8×10^4 UFC g^{-1} de suelo, respectivamente. En el sitio 2 se registró el menor número de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno con 2.6×10^4 UFC g^{-1} de suelo. Las poblaciones de actinobacterias fluctuaron de 4 a 30×10^3 UFC g^{-1} de suelo. Las bacterias celulolíticas presentaron la población más alta en el sitio 2 con 8.5×10^4 UFC g^{-1} de suelo en comparación con los otros.

Correlación entre el número de microorganismos y las características del suelo: La población de BT tuvo alta correlación con el pH y el fósforo (0.91), lo que indica que las densidades de BT aumentan en los sitios con mayor pH y con mayor contenido de fósforo. Del mismo modo, las BSP presentaron correlación alta con el fósforo (0.75). Las densidades de BFN presentaron correlación positiva y estadísticamente significativa (0.96; $\alpha = 0.05$) con

Tabla 1

Altitud (m), radiación fotosintéticamente activa (RFA), humedad relativa, humedad y temperatura del suelo en los cuatro sitios de estudio. / **Table 1.** Altitude (m), photosynthetically active radiation (PAR), relative humidity, humidity and soil temperature in the four study sites.

Sitio	Altitud (m)	RFA ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Humedad relativa (%)	Humedad del suelo (%)	Temperatura del suelo ($^{\circ}\text{C}$)
S1	3019 \pm 0.5	51.0 \pm 21.1	60.9 \pm 1.3	24.3 \pm 2.1	10.5 \pm 0.2
S2	2984 \pm 1.0	31.8 \pm 10.2	63.0 \pm 1.5	23.3 \pm 0.5	11.0 \pm 0.2
S3	2960 \pm 0.3	47.3 \pm 10.0	62.1 \pm 0.8	19.3 \pm 3.1	10.7 \pm 0.2
S4	2947 \pm 0	141.3 \pm 37.1	55.8 \pm 0.3	23.5 \pm 1.5	11.2 \pm 0.1

Los datos mostrados son promedios por sitio \pm error estándar. / Data shown are site averages \pm standard error.

Tabla 2

Características físicas y químicas del suelo en cada sitio muestreado. / **Table 2.** Physical and chemical characteristics of the soil per sampled site.

Sitio	C. E. (dS m ⁻¹)	pH	N total (%)	M. O. (%)	Fósforo (mg kg ⁻¹)	D. A. (g cm ⁻³)
S1	0.61	5.5	0.33	4.2	33.5	0.95
S2	0.99	5.3	0.53	3.5	44.6	0.81
S3	0.41	5.9	0.50	3.4	44.5	0.84
S4	0.51	6.1	0.50	3.4	66.5	0.82

Tabla 3

Unidades formadoras de colonias (UFC) de microorganismos en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* en cuatro sitios de estudio. / **Table 3.** Colony-forming units (CFUs) of microorganisms in the rhizosphere of *D. pseudofilix-mas* at four study sites.

Grupo de microorganismos (UFC g ⁻¹ suelo)	Sitio			
	1	2	3	4
BT X 10 ⁴	30.1 (±8.7) b	23.0 (±6.0) b	35.6 (±12.8) b	92.3 (±7.7) a
BSF X 10 ⁴	2.2 (±0.4) ab	2.3 (±0.6) ab	1.6 (±0.6) b	3.2 (±0.1) a
BFN X 10 ⁴	5.4 (±0.4) bc	2.6 (±0.1) c	7.4 (±1.1) b	11.8 (±1.6) a
BC X 10 ⁴	7.0 (±1.0) ab	8.5 (±2.3) a	3.3 (±0.7) b	3.5 (±0.6) b
AT X 10 ³	4.0 (±0.2) b	19.0 (±0.8) ab	30.0 (±1.0) a	8.0 (±0.2) b

Bacterias totales (BT); Bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF); Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN); Bacterias celulolíticas (BC); Actinobacterias totales (AT). Valores en la misma fila con la misma letra no presentan diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$, $a > b$). Medias $n = 4$, \pm error estándar. / Total bacteria (TB); Phosphate solubilizing bacteria (PSB); Nitrogen fixing bacteria (NFB); Cellulolytic bacteria (CB); Total actinobacteria (TA). Values in the same row with the same letter do not show significant differences (Tukey, $\alpha = 0.05$, $a > b$). Means $n = 4$, \pm standard error.

Tabla 4

Correlaciones entre el número de microorganismo y las características del suelo en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas*. / **Table 4.** Correlations between the number of microorganisms and soil characteristics in the rhizosphere of *D. pseudofilix-mas*.

	pH	M. O.	N	P	Altitud
BT	0.827	-0.389	0.219	0.909	-0.678
BSF	0.331	-0.134	0.113	0.752	-0.311
BFN	0.962*	-0.343	0.105	0.777	-0.678
BC	-0.967*	-0.478	-0.218	-0.568	0.739
AT	0.062	-0.636	0.633	-0.072	-0.429

Bacterias totales (BT); Bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF); Bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN); Bacterias celulolíticas (BC); Actinobacterias totales (AT); M. O. = materia orgánica (%); NT = nitrógeno total (%); P = fósforo (mg kg⁻¹); K = potasio (mg kg⁻¹). *Correlación significativa $\alpha = 0.05$. / Total bacteria (TB); Phosphate solubilizing bacteria (PSB); Nitrogen fixing bacteria (NFB); Cellulolytic bacteria (CB); Total actinobacteria (TA); M. O. = organic matter (%); NT = total nitrogen (%); P = phosphorus (mg kg⁻¹); K = potassium (mg kg⁻¹). *Significant correlation $\alpha = 0.05$.

el pH, lo cual muestra que las densidades de BFN incrementan en los sitios con mayor pH. En tanto, las densidades de bacterias celulolíticas presentaron correlación negativa y estadísticamente significativa (-0.97; $\alpha = 0.05$) con el pH (Tabla 4).

Aislamiento e identificación molecular de las bacterias: En total se aislaron 108 cepas de bacterias de la rizosfera de *D. pseudofilix-mas*, 92 fueron Gram-negativas, y 16 Gram-positivas. El 47 % de morfotipos bacterianos observados fueron de tipo bacilo, el 28 % cocobacilo,



el 15 % estreptobacilos, el 61 % diplococos, el 3.2 % estreptococos y el 0.7 % tétradas. Las cepas bacterianas identificadas se agruparon en 20 géneros; solo 84 cepas se determinaron hasta nivel de especie, y 24 hasta género, con una máxima identidad entre el 99 y 100 %. Con base a los árboles filogenéticos, se observa que en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* los géneros que predominaron son *Pseudomonas* y *Bacillus*. El primero fue el más numeroso, 59 cepas aisladas pertenecieron a este género, de las cuales 20 corresponden a *Pseudomonas jessenii*. Por otra parte, *Bacillus*, estuvo representado por 10

cepas, principalmente por *Bacillus nakamurai* con 7 cepas. En menor cantidad se encontraron *Chryseobacterium*, *Buttiauxella*, *Paraburkholderia*, *Aeromonas*, *Arthrobacter* y *Peribacillus*. Para el sitio 1 se identificaron 27 cepas bacterianas distribuidas en 9 géneros (Fig. 1). En el sitio 2 se identificaron 32 cepas distribuidas en 10 géneros (Fig. 2), para el sitio 3 se identificaron 21 cepas, que se agruparon en 7 géneros (Fig. 3) y en el sitio 4 se identificaron 28 cepas distribuidas en 9 géneros (Fig. 4). En todos los sitios el clado dominante y más numeroso fue el de *Pseudomonas*. Los valores del índice de

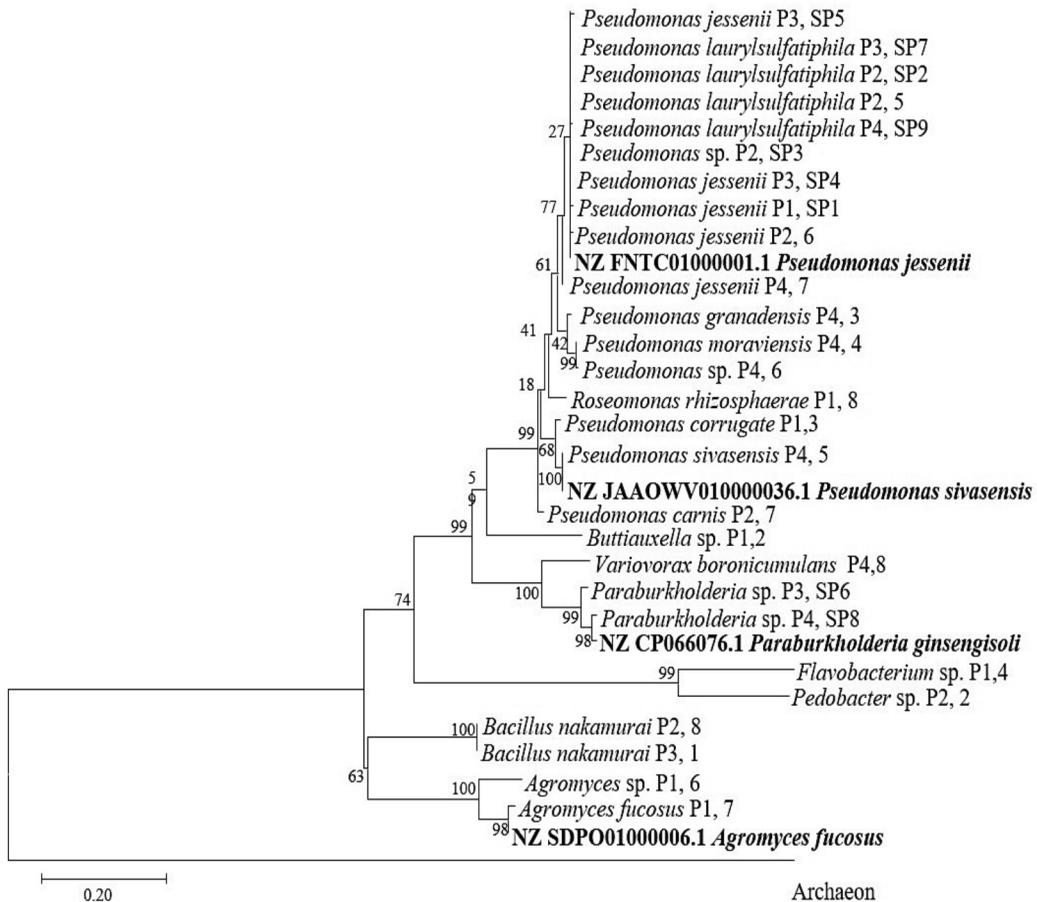


Fig. 1. Análisis filogenético de las cepas bacterianas identificadas en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* en el sitio 1. Nombre y cepa. En negritas se muestran los grupos de referencia incluidos en el análisis. Se utilizó una secuencia de *Archeobacteria* como grupo externo. La barra indica 20 sustituciones por grupo. / **Fig. 1.** Phylogenetic analysis of the bacterial strains identified from the rhizosphere of *D. pseudofilix-mas* at site 1. Name and strain. The reference groups included in the analysis are shown in bold. *Archeobacteria* was included as an external outgroup. Bar, 20 substitutions per group.

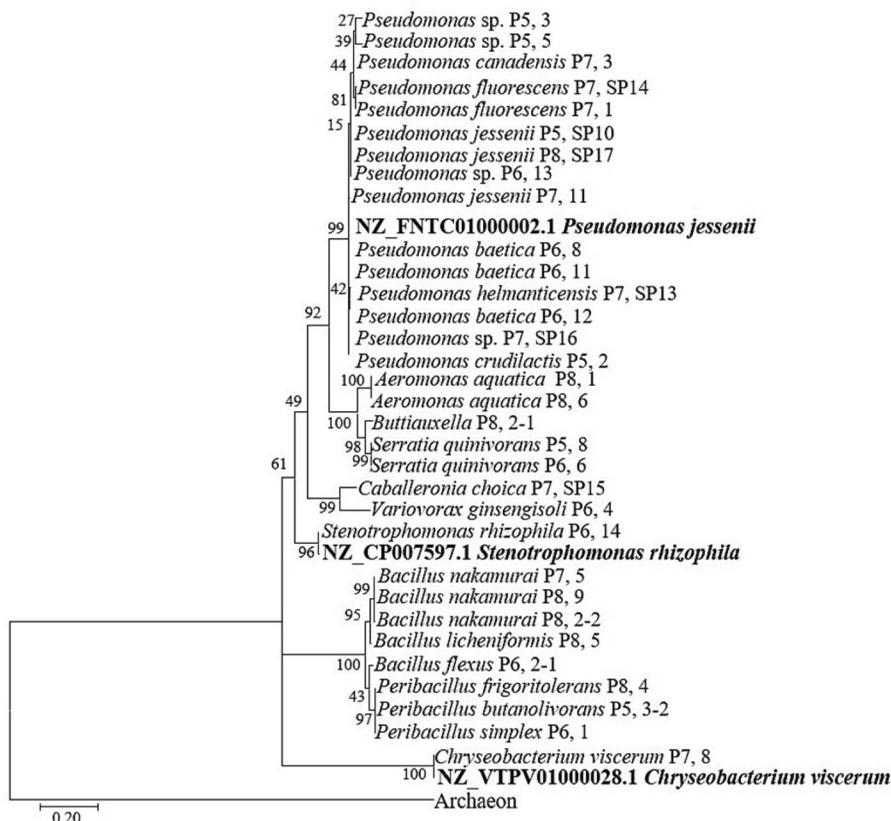


Fig. 2. Análisis filogenético de las cepas bacterianas identificadas en la rizosfera de *D. pseudoflix-mas* en el sitio 2. Nombre cepa. En negritas se muestran los grupos de referencia incluidos en el análisis. Se utilizó una secuencia de *Arqueobacteria* como grupo externo. La barra indica 20 sustituciones por grupo. / **Fig. 2.** Phylogenetic analysis of the bacterial strains identified from the rhizosphere of *D. pseudoflix-mas* at site 2. Name and strain. The reference groups included in the analysis are shown in bold. *Archaebacteria* was included as an external outgroup. Bar, 20 substitutions per group.

similitud de Sørensen indican bajo recambio de especies de bacterias rizosfericas en los sitios 2 y 3. En contraste, el sitio 1 y el sitio 4 presentaron poca similitud (Tabla 5). Los cuatro sitios compartieron especies de *Pseudomonas*; la especie *Pseudomonas jessenii* estuvo presente en todos los sitios.

Las 108 cepas evaluadas presentaron actividades promotoras del crecimiento vegetal. Los grupos funcionales evaluados fueron: solubilizadores de fosfato, productores de auxinas, fijadores de nitrógeno y celulolíticos; los cinco grupos estuvieron presentes en todos los sitios. En la Fig. 5 se observa que el grupo de fijadores de nitrógeno es el más abundante, seguido del

Tabla 5

Valores del índice de similitud de Sørensen de la comunidad de rizobacterias entre los cuatro sitios de muestreo. / **Table 5.** Values of the Sørensen similarity index of the rhizobacterial community between the four sampling sites.

Sitios	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
Sitio 1	1	0.21	0.22	0.15
Sitio 2	0.21	1	0.50	0.22
Sitio 3	0.22	0.50	1	0.33
Sitio 4	0.15	0.22	0.33	1

grupo de productores de auxinas y solubilizadores de fosfato; mientras que el grupo menos numeroso fue el de celulolíticos.

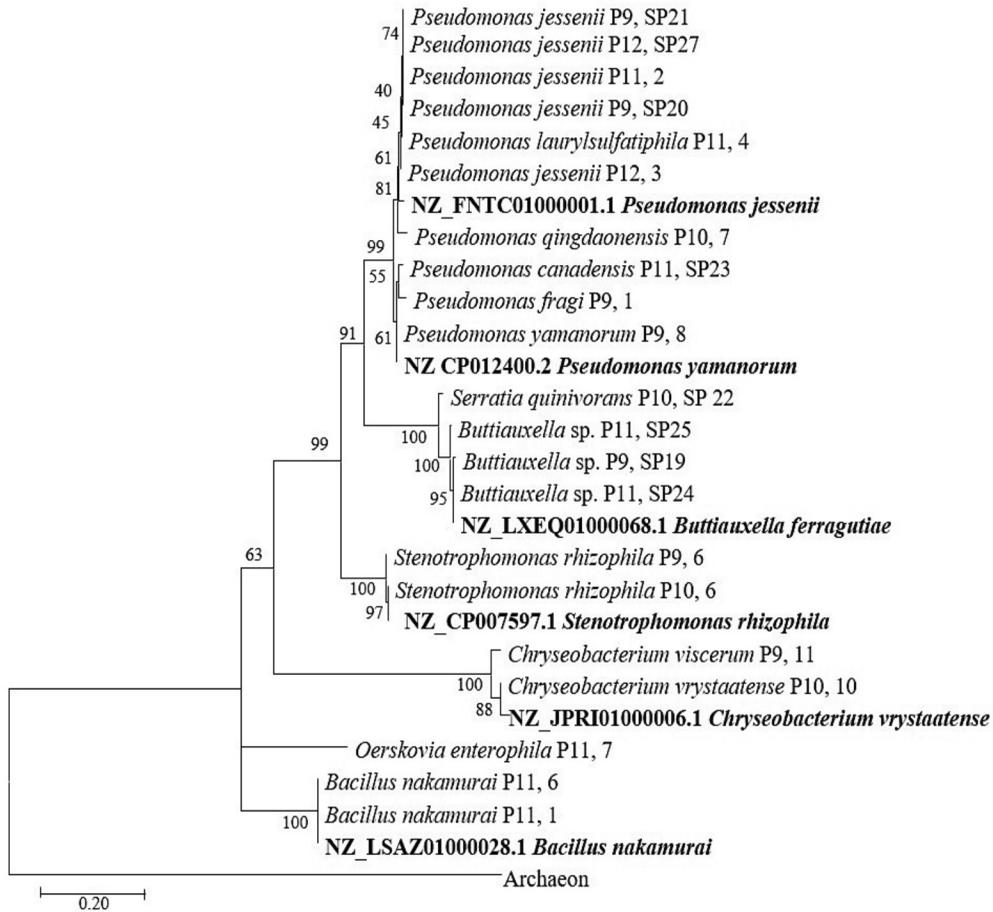


Fig. 3. Análisis filogenético de las cepas bacterianas identificadas en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* en el sitio 3. Nombre y cepa. En negritas se muestran los grupos de referencia incluidos en el análisis. Se utilizó una secuencia de *Arqueobacteria* como grupo externo. La barra indica 20 sustituciones por grupo. / **Fig. 3.** Phylogenetic analysis of the bacterial strains identified from the rhizosphere of *D. pseudofilix-mas* at site 3. Name and strain. The reference groups included in the analysis are shown in bold. *Archaebacteria* was included as an external outgroup. Bar, 20 substitutions per group.

DISCUSIÓN

Los valores de temperatura del suelo ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa y del suelo (%) fueron similares en los 4 sitios, lo que sugiere que las condiciones climáticas son parecidas a lo largo de la cañada. Estudios florísticos señalan que en las cañadas se forman condiciones microclimáticas que se mantienen a lo largo de éstas (Cabrera-Luna & Gómez-Sánchez, 2005). Aun cuando el sitio 4 recibió más del doble de radiación fotosintéticamente activa que los otros sitios,

en general esta radiación en los cuatro sitios de muestreo fue baja (31.8 a $141.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El sitio 4 se ubicó en el extremo de la cañada donde el bosque es menos denso y recibe un poco más de radiación solar. La intensidad lumínica tiene efectos en la temperatura del suelo (Hill et al., 2022), sin embargo, en este caso la temperatura del suelo fue similar y baja en los 4 sitios, variando solo de 10.5 a $11.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual indica que los sitios reciben poca luz.

El suelo fue ácido a ligeramente ácido (5.3 a 6.1), con alto contenido de fósforo (33.5

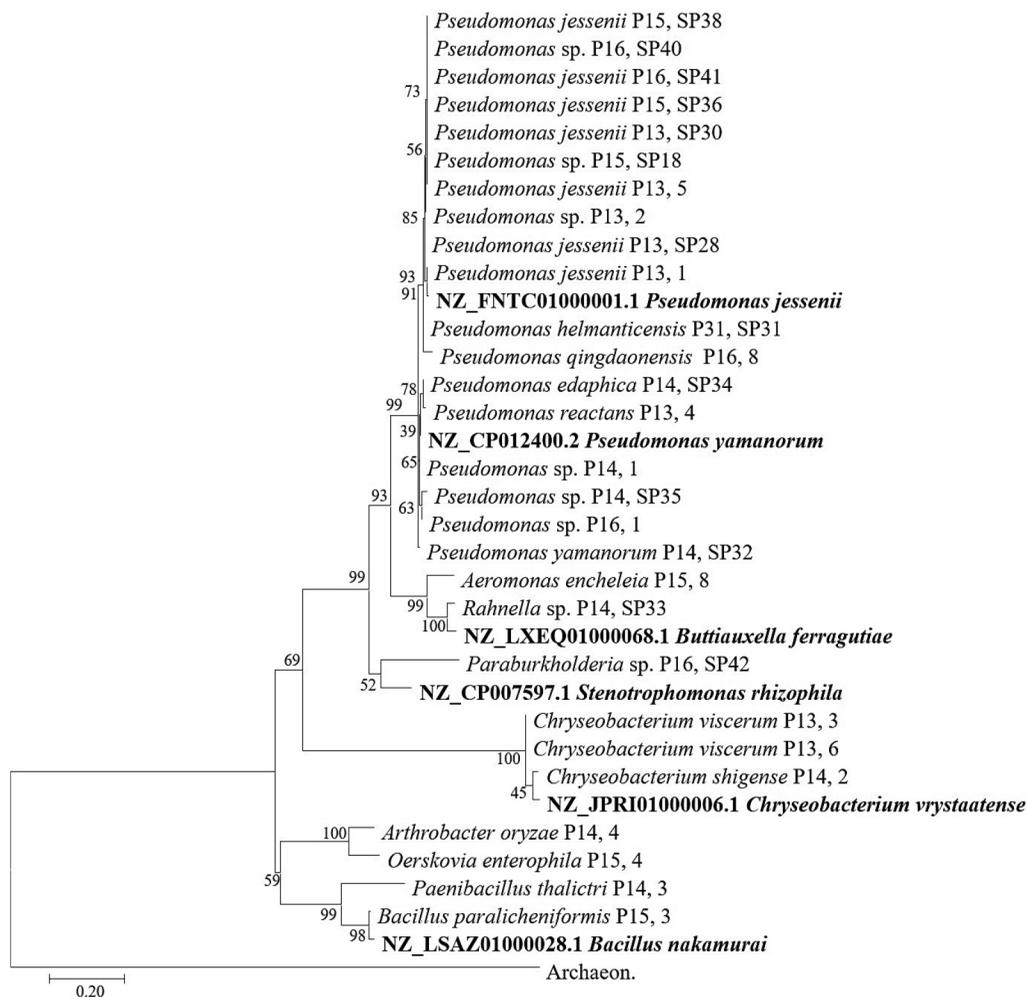


Fig. 4. Análisis filogenético de las cepas bacterianas identificadas en la rizosfera de *D. pseudoflax-mas* en el sitio 4. Nombre y cepa. En negritas se muestran los grupos de referencia incluidos en el análisis. Se utilizó una secuencia de *Arqueobacteria* como grupo externo. La barra indica 20 sustituciones por grupo. / **Fig. 4.** Phylogenetic analysis of the bacterial strains identified from the rhizosphere of *D. pseudoflax-mas* at site 4. Name and strain. The reference groups included in the analysis are shown in bold. *Archaebacteria* was included as an external outgroup. Bar, 20 substitutions per group.

a 66.5 mg kg⁻¹), nitrógeno (0.33 a 0.53 %) y contenido moderado de materia orgánica (3.4 a 4.2 %) (Rodríguez & Rodríguez, 2015). Estos valores son más elevados respecto a los citados previamente en el Monte Tláloc los cuales fluctúan de 3 a 22.9 mg kg⁻¹ (Aldrete, 2008; Galván-Tejada et al., 2014; Martínez-Rojas, 2015). La diferencia posiblemente se debe a que en este caso se trata de una cañada, en la cual, por efecto de la erosión, escorrentía y lluvias se presenta

un acarreo y deposición de partículas del suelo, así como de materia orgánica; en consecuencia, hay una mayor capacidad de retención de recursos (Rodríguez et al., 2008).

Las poblaciones de bacterias totales observadas en la rizosfera de *D. pseudoflax-mas* fueron de 23 x 10⁴ a 92.3 x 10⁴ UFC g⁻¹ de suelo, las cuales son relativamente bajas. En otras especies de plantas, incluyendo helechos, la población de bacterias puede ser de más de

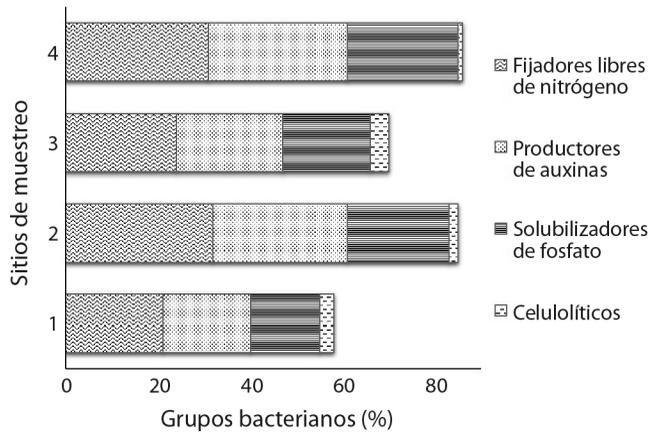


Fig. 5. Porcentaje de grupos bacterianos con diferentes funciones, aislados de la rizosfera de *D. pseudoflax-mas* en cada sitio muestreado. / **Fig. 5.** Bacterial group percentages with different functions, isolated from the rhizosphere of *D. pseudoflax-mas* per sampled site.

10^7 UFC g^{-1} (Anderson, 2009; Liu et al., 2021). Posiblemente, esta diferencia se debe a que la composición de las poblaciones bacterianas en la rizosfera está en función tanto de las especies de plantas, así como de las propiedades físicas y químicas del suelo (Ling et al., 2022).

Las características del suelo influyeron en las poblaciones de bacterias evaluadas, pues se observó que la población de BT presentó una correlación positiva con el pH y fósforo; las BSP una correlación positiva con el fósforo, las BFN una correlación positiva con el pH, y las bacterias celulolíticas presentaron correlación negativa con el pH. Se ha observado que la abundancia y composición de las comunidades microbianas en la rizosfera están en función de la especie vegetal, y las propiedades del suelo como: la humedad, la temperatura, el pH, contenido de nitrógeno y fósforo (Chaluvadi & Bennetzen, 2018; Mitter et al., 2013). Un pH ácido afecta negativamente el crecimiento de bacterias e inhibe su actividad y las condiciones alcalinas pueden provocar su muerte, mientras que un pH cercano a la neutralidad favorece el crecimiento bacteriano (Ratzke & Core, 2018). En el caso de BFN, se ha observado que el crecimiento de las bacterias y las tasas de fijación de nitrógeno disminuyen en un

suelo con pH ácido (Navarro-Noya et al., 2016; Smercina et al., 2019).

La disponibilidad de recursos induce un recambio en las comunidades bacterianas, este cambio está asociado a las capacidades enzimáticas de los diferentes grupos bacterianos (Lauber et al., 2009). La celulosa es el polisacárido más abundante en la biomasa vegetal, y algunos microorganismos son capaces de liberar enzimas para degradar este polímero; su actividad y plegamiento varía a medida que cambia el pH (Kshitipati et al., 2024). En este estudio, la comunidad de bacterias celulolíticas tienen una correlación negativa con el pH, posiblemente las enzimas producidas por este grupo de bacterias presentan mejor actividad cuando el pH es bajo.

Las cepas de bacterias aisladas en su mayoría fueron Gram-negativas (85 %), lo cual es consistente con estudios enfocados en la diversidad microbiana del suelo donde citan que en la rizosfera existen numerosas cepas Gram-negativas, entre las cuales destacan los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Pantoea* y *Agrobacterium* (Moreno et al., 2018).

En el presente trabajo, las especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus* en la rizósfera

de *D. pseudofilix-mas* fueron las que predominaron, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura, que señala que estos géneros son las más comunes en ecosistemas terrestres; su abundancia y persistencia se debe a su versatilidad metabólica que les permite competir y colonizar la rizosfera en diversos ambientes (Giri et al., 2005; Zboralski & Filion, 2020). No obstante, *Pseudomonas jessenii* y *Bacillus nakamurai* estuvieron presentes en la mayoría de los sitios, posiblemente este helecho provee los exudados radicales necesarios para el desarrollo de estas especies, pues se conoce que la cantidad y tipo de exudados liberados por la raíz, ejercen un efecto selectivo sobre las rizobacterias que viven ahí (Glick, 2020).

Los valores del índice de similitud de Sørensen indican que en los sitios 2 y 3 existe un bajo recambio de especies de bacterias. En contraste, el sitio 1 y el sitio 4 presentaron baja similitud. Los cuatro sitios comparten especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*; la especie *Pseudomonas jessenii* estuvo presente en todos los sitios, mientras que *Bacillus nakamurai* se registró en el sitio 1, 2 y 3. Se ha observado una tendencia similar en la rizosfera de diferentes especies de helechos; en *Pteridium aquilinum* la especie común en los sitios de estudio fue *Pseudomonas marginalis* (Watrud et al., 2003). Las especies *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliqueifaciens* estuvieron presentes en todos los individuos muestreados de *Pronephrium nudatum* (= *Abacopteris nudata* (Roxb.) S. E. Fawc. & A. R. Sm.) y *Bolbitis heteroclita* (Sen et al., 2018).

En el presente estudio se encontró que la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* alberga diferentes géneros de bacterias que tienen más de una actividad de promoción de crecimiento. En el caso del género *Pseudomonas* (72 cepas analizadas), el 79 % mostró la capacidad de producir auxinas, solubilizar fosfato y fijar nitrógeno, el 8 % tuvieron la capacidad de solubilizar fosfato y fijar nitrógeno; y el 7 % se caracterizó por producir auxinas y fijar nitrógeno. Solo el 4 % tuvo la capacidad de producir auxinas, solubilizar fosfato, fijar nitrógeno y degradar celulosa, estas cepas son: *Pseudomonas fragi*

P9, 1; *Pseudomonas* sp. P5, 4 y *Pseudomonas corrugata* P1, 3.

El género *Pseudomonas* es uno de los grupos de bacterias más diversos y ecológicamente significativos, su distribución en el suelo es importante en la promoción del crecimiento de las plantas y el control de patógenos (Sah & Singh, 2016). En su interacción con helechos, *P. nitroreducens* altera la determinación del sexo y desarrollo de rizoides en el gametofito de *Ceratopteris richardii* (Ganger et al., 2019). En este estudio, *Pseudomonas jessenii* presentó la capacidad de producir auxinas, solubilizar fosfato y fijar nitrógeno. Se ha citado que la especie confiere protección a su planta hospedante contra una serie de patógenos del suelo (Qin et al., 2016).

La cepa *Pseudomonas corrugata* P1, 3 se caracterizó por solubilizar fosfato, producir auxinas y fijar nitrógeno, en la literatura se ha descrito como patógeno oportunista; no obstante, también se ha demostrado su eficacia para inhibir crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas, y tener capacidad de producir auxinas (Palleroni, 2015). La especie *P. lauryl-sulfatiphila* en este trabajo presentó la capacidad de producir auxinas y solubilizar fosfato, lo cual coincide con estudios previos que la describen por su capacidad de solubilizar fosfato y favorecer la biomasa en las plantas hospedantes (López-Hernández et al., 2022).

Otras especies encontradas en la rizosfera de *D. pseudofilix-mas* fueron: *Bacillus nakamurai*, presente en tres sitios y que presentó la capacidad de producir auxinas y fijar nitrógeno; *Oerskovia enterophila*, aislada en dos sitios, la cual tiene capacidad de producir auxinas y degradar celulosa y *Arthrobacter oryzae*, aislada en un sitio y fija nitrógeno. Jag et al. (2017) señala que *O. enterophila* degrada quitina y en su fase estacionaria adopta forma de cocoides. Con respecto a *A. oryzae* también se ha citado como promotora de crecimiento vegetal y tolerante a sequía, las bacterias de esta especie se caracterizan por presentar crecimiento lento y son ligeramente móviles (Benmrid et al., 2024).

También se aislaron cepas pertenecientes a las especies de *Aeromonas aquatica*, *A.*



encheleia, *Chryseobacterium shigense*, *C. viscerum* y *C. vrystaatense*, que presentaron la capacidad de producir auxinas y fijar nitrógeno. El género *Chryseobacterium* se considera un grupo importante asociado a plantas debido a que las especies exhiben actividades promotoras del crecimiento vegetal (Montero-Calasanz et al., 2014). El género *Aeromonas* se ha encontrado asociado al helechito acuático *Azolla filiculoides* (Quisehuatl-Tepexicuapan et al., 2016).

Dryopteris pseudofilix-mas (Fée) Rothm. que se distribuye en el Monte Tláloc, crece en suelos ácidos a ligeramente ácidos, con alto contenido de N y P, contenido moderado de M.O. y una conductividad eléctrica menor a 1. Las características del suelo como el pH y el contenido de fósforo influyeron en las poblaciones microbianas evaluadas.

La caracterización de las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera muestra que la población de los cuatro sitios, está dominada principalmente por dos clados: *Pseudomonas* y *Bacillus*. Las cepas pertenecientes a las especies de *Pseudomonas jessenii* y *Bacillus nakamurai* son recurrentes en la rizosfera de esta planta, estas bacterias pueden ser un grupo común asociado a *D. pseudofilix-mas*, ya que estuvieron presentes en todos los sitios de muestreo.

La rizosfera de *D. pseudofilix-mas* alberga diversos grupos de bacterias funcionales que potencialmente pueden dirigirse a una biotecnología para la restauración ecológica o para fines agrícolas. En su mayoría, las cepas bacterianas analizadas presentaron más de una actividad de promoción del crecimiento. Sin embargo, es necesario realizar pruebas en distintas especies de plantas para confirmar los efectos de las cepas en el crecimiento vegetal. *D. pseudofilix-mas* es un reservorio de bacterias con diferentes funciones que probablemente ejercen un efecto benéfico sobre la planta.

Declaración de ética: Los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales

pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado. A Hilda Victoria Silva Rojas por facilitar el acceso al laboratorio que dirige, para llevar a cabo el análisis de ADN. A Genaro Pineda y Margarito Pineda por el apoyo en el trabajo de campo.

REFERENCIAS

- Aldrete, A. (2008). *Distribución altitudinal, tratamientos pregerminativos e influencia de Lupinus spp. (Fabaceae, Papilionoideae) en la fertilidad de suelos forestales*. [Tesis doctoral, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas]. Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/1423>
- Anderson, R. O. (2009). Eukaryotic Microbial Communities Associated with the Rhizosphere of the Temperate Fern *Thelypteris noveboracensis* (L.) Nieuwl. *American Fern Journal*, 99(3), 176–181.
- Antenozio, M. L., Giannelli, G., Marabottini, R., Brunetti, P., Allevato, E., Marzi, D., Capobianco, G., Bonifazi, G., Serranti, S., Visioli, G., Stazi, S. R., & Cardarelli, M. (2021). Phytoextraction efficiency of *Pteris vittata* grown on a naturally As-rich soil and characterization of As-resistant rhizosphere bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), 6794. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86076-7>
- Aquiahuatl, M., Volke, T., Prado, L., Matsumoto, S., Ramírez, F., & Salazar, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general* (1a Ed.). Universidad Autónoma Metropolitana.
- Bautista-Cruz, A., Montaña, N., Camargo-Ricalde, S., & Pacheco, L. (2014). Hongos micorrizógenos arbusculares y nutrimentos del suelo asociados a cuatro especies de helechos en dos ecosistemas de Oaxaca, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(3), 199–212. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2014.02.007>
- Benmrid, B., Ghoulam, C., Ammar, I., Nkir, D., Saidi, R., Staropoli, A., Iacomino, G., Elhajjami, E., Cheto, S., Geistlinger, J., Idbella, M., & Bargaz, A. (2024). Drought-tolerant rhizobacteria with predicted

- functional traits enhanced wheat growth and P uptake under moderate drought and low P-availability. *Microbiological Research*, 285, 127795. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127795>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/10.1128/jb.62.3.293-300.1951>
- Blake, G. R., & Hartge, K. H. (1986). Bulk Density. In A. Klute (Ed.), *Physical and Mineralogical Methods-Agronomy Monograph* (2nd Ed., pp. 363–365). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed>
- Bray, R. H., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science*, 59, 39–45. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-194501000-00006>
- Byung-Chun, K., Mi, K., Hyun, K., Beom, S., Sook, K., & Kee-Sun, S. (2009). Isolated from the Rhizosphere of the Fern *Paenibacillus filicis* sp. Nov., isolated from the rhizosphere of the fern. *The Journal of Microbiology*, 47(5), 524–529. <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0266-8>
- Cabrera-Luna, J. A., & Gómez-Sánchez, M. (2005). Análisis florístico de La Cañada, Querétaro, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 77, 35–50.
- Chaluvadi, S., & Bennetzen, J. L. (2018). Species-associated differences in the below-ground microbiomes of wild and domesticated setaria. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1183. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01183>
- Conagua. (2024). *Información Estadística Climatológica. Base de Datos Climatológica Nacional*. Servicio Meteorológico Nacional, Comisión Nacional del Agua, México. https://smn.conagua.gob.mx/tools/RECURSOS/Normales_Climatologicas/Mensuales/mex/mes15210.txt
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13–15.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Döbereiner, J., & Day, J. M. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. En W. E. Newton, & C. J. N. Nyman (Eds.), *International Symposium on Nitrogen Fixation* (1a Ed., pp. 518–538). Washington State University Press.
- Etchevers, J. D. (1987). Determinación de nitrógeno en suelos. En S.A. Aguilar, J. D. Etchevers, & R. J. Z. Castellanos (Eds.), *Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo* (pp. 45–83). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo.
- Galván-Díaz, E. L. (2021). *Procesos edáficos en andosoles en una catena en el Monte Tláloc: estudio multiescalar* [Tesis de maestría, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas]. Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/4957>
- Galván-Tejada, N. C., Peña-Ramírez, V., Mora-Palomino, L., & Siebe, C. (2014). Soil P fractions in a volcanic soil chronosequence of Central Mexico and their relationship to foliar P in pine trees. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177, 792–802. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300653>
- Ganger, M. T., Hiles, R., Hallowell, H., Cooper, L., McAllister, N., Youngdahl, D., Alfieri, J., & Ewing, S. J. (2019). A soil bacterium alters sex determination and rhizoid development in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *AoB PLANTS*, 11(2), plz012. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plz012>
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., & Varma, A. (2005). Microbial diversity in soils. En A. Varma, & F. Buscot (Eds.), *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions* (Vol. 3, pp. 19–55). Soil Biology. https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_2
- Glick, B. R. (2020). Introduction to plant growth-promoting bacteria. En B. R. Glick (Ed.), *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (pp. 1–37). Springer Nature Switzerland.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Han, X., Zheng, L., Chen-Yang, L., Wei-Na, J., Hong-Tao, W., & Chun-Hua, W. (2015). Phytochemical constituents and biological activities of plants from the genus *Dryopteris*. *Chemistry & Biodiversity*, 12(8), 1131–1162. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400157>
- Hill, I., Park, D., Bridges, W., & David, W. (2022). Soil water content and photosynthetically active radiation influences soil color assessment. *Geoderma Regional*, 31, e00581. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2022.e00581>
- Huang, A., Teplitski, M., Rathinasabapathi, B., & Ma, L. (2010). Characterization of arsenic-resistant bacteria from the rhizosphere of arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(3), 236–246. <https://doi.org/10.1139/W10-005>
- Jag, V., Poehlein, A., Bengelsdorf, F. R., Daniel, R., & Dürre, P. (2017). Genome sequencing and description of *Oerskovia enterophila* VJag, an agar- and cellulose-degrading bacterium. *Standards in Genomic Sciences*, 12, 30. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0244-4>
- Kshitipati, P., Ranjan, K. P., Debadatta, S., Shraddha, M., Sanjib, K. S., Narayan, P., Sushanta, K. P., & Alok, K. P. (2024). Exploitation of cellulose degrading



- bacteria in bioconversion of agro-wastes. *Chemosphere*, 347, 140654. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140654>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <http://doi: 10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <http://doi: 10.1093/molbev/msy096>. PMID: 29722887
- Lara-Pérez, L. A., Valdés-Baizabal, M., Noa-Carrazana, J. C., Zulueta-Rodríguez, R., Lara-Capistrán, L., & Andrade-Torres, A. (2015). Mycorrhizal associations of ferns and lycopods of central Veracruz, Mexico. *Symbiosis*, 65, 85–92. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0320-8>
- Lauber, C. L., Hamady, M., Knight, R., & Fierer, N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15), 5111–5120. <http://doi: 10.1128/AEM.00335-09>
- Li, X. J., Song, X. H., Tang, S. Q., Wei, K. X., Suo, Z. W., Xu, Y., Luo, J., Huang, H., Li, C. Y., Liu, D. X., & Liu, X. Q. (2023). Phytochemical constituents from rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma* and their anti-inflammatory activity. *Natural Product Research*, 38(20), 3574–3580. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2256446>
- Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature Communications*, 13, 836. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9>
- Liu, M., Li, B., Xu, L., & Yu, R. (2021). Characteristics of culturable microbial community in rhizosphere/non-rhizosphere soil of *Potentilla fruticosa* population in alpine meadow elevation gradient. *Frontiers in Soil Science*, 1, 741012. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2021.741012>
- López-Hernández, J., García-Cárdenas, E., López-Bucio, J. S., Jiménez-Vázquez, K. R., de la Cruz, H. R., Ferrera-Rodríguez, O., Santos-Rodríguez, D. L., Ortiz-Castro, R., & López-Bucio, J. (2022). Screening of phosphate solubilization identifies six *Pseudomonas* species with contrasting phytostimulation properties in *Arabidopsis* Seedlings. *Microbial Ecology*, 86(1), 431–445. <http://doi: 10.1007/s00248-022-02080>
- Lorea, F., & Riba, R. (1990). *Guía para la recolección y preparación de ejemplares para herbario de Pteridofitas*. Consejo Nacional de la Flora de México.
- Magurran, A. E. (1988). A variety of diversities. In A. E. Magurran (Ed.), *Ecological diversity and its measurement* (pp. 81–99). Princeton University Press.
- Martínez-Rojas, V. (2015). *Microorganismos del suelo y cinética de carbono en ecosistemas del Monte Tláloc* [Tesis doctoral, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas]. Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/2897>
- Martínez-Salas, E., & Ramos, C. H. (2014). Biodiversidad de Pteridophyta en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 110–113. <https://doi.org/10.7550/rmb.31827>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *Microbiology Reviews*, 37(5), 634–663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Mickel, J. T., & Smith, A. R. (2004). The Pteridophytes of Mexico. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 88, 1–1054.
- Mitter, B., Brader, G., Afzal, M., Compant, S., Naveed, M., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2013). Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria. *Advances in Agronomy*, 121, 381–445. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407685-3.00007-4>
- Montero-Calasanz, M. C., Göker, M., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Busse, H. J., Schmid, M., Klenk, H. P., Tindall, B. J., & Camacho, M. (2014). *Chryseobacterium oleae* sp. nov., an efficient plant growth promoting bacterium in the rooting induction of olive tree (*Olea europaea* L.) cuttings and emended descriptions of the genus *Chryseobacterium*, *C. daecheongense*, *C. gambrini*, *C. gleum*, *C. joostei*, *C. jejuense*, *C. luteum*, *C. shigense*, *C. taiwanense*, *C. ureilyticum* and *C. vrystaatense*. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.04.004>
- Moreno, A., García, V., Reyes, J. L., Vázquez, J., & Cano, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno, E. C. (2001). *Manual de métodos para medir la biodiversidad*. Textos universitarios: Universidad Veracruzana.
- Navarro-Noya, Y. E., Luna-Guido, M., & Dendooven, L. (2016). Cultivable nitrogen fixing bacteria from extremely alkaline-saline soils. *Advances in Microbiology*, 6, 412–423. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.66041>
- Oseguera-Olalde, T. K., Bonilla-Valencia, L., Fonseca, R. M., Martínez-Orea, Y., Lorea-Hernández, F., & Castillo-Argüero, S. (2022). Fern diversity in altitude and anthropogenic gradients in a temperate forest

- in Mexico City, Mexico. *Trees, Forests and People*, 10, 100345. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2022.100345>
- Palleroni, N. J. (2015). *Pseudomonas*. En M. E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F. A. Rainey, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria* (pp. 1–105). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Pikovskaya, R. I. (1948) Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17, 362–370.
- Ping, H., Yunqing, H., Ruirui, W., Yuan, G., Xudong, W., Xuanqin, C., Xianyan, L., Jin, Y., Jian, Y., & Rongtao, L. (2023). New tocopherol and acylphloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* and their antimicrobial activities. *Fitoterapia*, 165, 105401. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2022.105401>
- Qin, Y., Wang, D., Brandt, K. K., & Rensing, C. (2016). Two draft genome sequences of *Pseudomonas jessenii* strains isolated from a copper contaminated site in Denmark. *Standards in Genomic Sciences*, 3, 11–16. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0200-8>. PMID: 27833718
- Qu, Q., Zhang, Z., Peijnenburg, W. J., Liu, W., Lu, T., Hu, B., Chen, J., Chen, J., Lin, Z., & Qian, H. (2020). Rhizosphere microbiome assembly and its impact on plant growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(18), 5024–5038. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00073>
- Quisehuatl-Tepexcicupan, E., Ferrera-Cerrato, R., Silva-Rojas, H. V., Rodríguez-Zaragoza, S., Alarcón, A., & Almaraz-Suárez, J. J. (2016). Free-living culturable bacteria and protozoa from the rhizoplanes of three floating aquatic plant species. *Plant Biosystems*, 150(5), 855–865. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.989282>
- Ramírez-Gama, R. M., Urzúa, A., Camacho, G., Tsuzuki, R., & Esquivel, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. Editorial Trillas.
- Ratzke, C., & Gore, J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLOS Biology*, 16(3), e2004248. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>
- Reed, L., & Glick, B. R. (2023). The recent use of plant-growth-promoting bacteria to promote the growth of agricultural food crops. *Agriculture*, 13(5), 1089. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051089>
- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8–14. <https://doi.org/10.1139/m81-002>
- Rincón-Molina, C. I., Martínez-Romero, E., Aguirre-Noyola, J. L., Manzano-Gómez, L. A., Zenteno-Rojas, A., Rogel, M. A., Rincón-Molina, F. A., Ruiz-Valdiviezo, V. M., & Rincón-Rosales, R. (2022). Bacterial community with plant growth-promoting potential associated to pioneer plants from an active Mexican volcanic complex. *Microorganisms*, 10(8), 1568. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081568>
- Rodríguez, F. H., & Rodríguez, A. F. (2015). *Métodos de análisis de suelos y plantas: criterios de interpretación* (3a Ed.). Trillas.
- Rodríguez, L., Pacheco, L., & Zavala, J. A. (2008). Pteridofitas indicadoras de alteración ambiental en el bosque templado de San Jerónimo Amanalco, Texcoco, México. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 641–656.
- Sah, S., & Singh, R. (2016). Phylogenetical coherence of *Pseudomonas* in unexplored soils of Himalayan region. *3 Biotech*, 6(2), 170. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0493-8>
- Sánchez, A., & López-Mata, L. (2003). Clasificación y ordenación de la vegetación del norte de la Sierra Nevada, a lo largo de un gradiente altitudinal. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 74(1), 47–71.
- SAS. (2002). *Statistical Analysis System. Software: the SAS System for Windows version 9.0* [Computer Software]. SAS Institute Inc., Cary, NC 25513, USA.
- Sen, A., Battacharya, M. K., Prasad, H. K., & Sharma, G. D. (2018). Plant growth promoting activities of rhizosphere bacteria from two ferns *Pronophrum nudatum* (Roxb.) Holttum. and *Bolbitis heteroclite* (C. Presl) Ching: an analysis of ferns-rhizosphere relationship. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56(4), 274–278.
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6), e02546-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Vedder, E. B. (1951). Starch agar, a useful culture medium. *The Journal of Infectious Diseases*, 16(3), 385–388. <https://doi.org/10.1093/infdis/16.3.385>
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38. <https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003>
- Watrud, L. S., Maggard, S., Shiroyama, T., Coleman, C. G., Johnson, M. G., Donegan, K. K., Giovanni, G. D., Porteous, L. A., & Lee, E. H. (2003). Bracken (*Pteridium aquilinum* L.) frond biomass and rhizosphere microbial community characteristics are correlated



- to edaphic factors. *Plant and Soil*, 249(2), 359–371. <https://doi.org/10.1023/A:1022885100254>
- Wollum, A. G. (1982). Cultural methods for soil microorganisms. In A. L. Page (Ed.), *Chemical and microbiological properties-agronomy monograph* (1a Ed., pp. 781–800). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c37>
- Zboralski, A., & Filion, M. (2020). Genetic factors involved in rhizosphere colonization by phytobeneficial *Pseudomonas* spp. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 3539–3554. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.11.025>
- Zhang, J., Chen, J., Xu, W., Xia, Y., Zhu, H., Wang, J., Li, Y., Wang, G., Zhang, Y., & Chen, N. (2023). Undescribed phloroglucinol derivatives with antiviral activities from *Dryopteris atrata* (Wall. ex Kunze) Ching. *Phytochemistry*, 208, 113585. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113585>