

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Aislamiento y caracterización de microorganismos asociados a la planta de candelilla
(*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) y su efecto en la germinación y crecimiento en
Phaseolus vulgaris.

Por:

ELVIRA ZARET GARCÍA PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Aislamiento y caracterización de microorganismos asociados a la planta de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) y su efecto en la germinación y crecimiento en *Phaseolus vulgaris*.”

Por:

ELVIRA ZARET GARCÍA PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

DR. JULIO CÉSAR TAFOLLA ARELLANO
Asesor Principal UAAAN

DRA. LORENA JACQUELINE GÓMEZ GODÍNEZ
Asesora Principal Externa

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Aislamiento y caracterización de microorganismos asociados a la planta de candelilla
(*Euphorbia antisiphilitica* Zucc) y su efecto en la germinación en *Phaseolus vulgaris*.

Por:

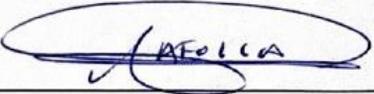
ELVIRA ZARET GARCÍA PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal



Dra. Lorena Jacqueline Gómez Godínez
Asesora Principal Externa



Dra. Olga Miriam Rutiaga Quiñones
Asesor



Dr. Agustín Hernández Juárez
Asesor



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo Coahuila, México.
Diciembre, 2022.

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

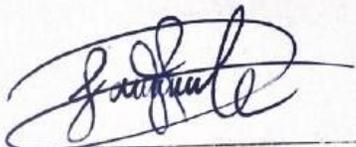
Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

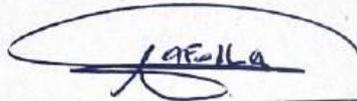
Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Atentamente.

Alma Terra Mater



Elvira Zaret García Pérez
Autor principal



Dr. Julio César Tafolla Arellano
Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**, la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por la aportación a mi desarrollo como alumna, estudiante, persona y profesionista.

Al **Centro Nacional de Recursos Genéticos** por todo el apoyo y aportaciones para el desarrollo de este proyecto que me ha brindado la oportunidad de cumplir una meta importante en mi vida.

Al **Dr. Julio César Tafolla Arellano** por su disponibilidad y confianza para desarrollar cada uno de las metas propuestas.

A la **Dra. Lorena J. Gómez Godínez** por brindarme la facilidad de instalaciones para poder realizar mi proyecto.

A la **Dra. Miriam Rutiaga Quiñones**, **Dr. Agustín Hernández Juárez**, la **M.C. Aideé González Ruíz** y al **M.C. Luis Bernardo Rincón López** por la disposición y apoyo otorgado para realizar este proyecto.

Al proyecto de Proyecto de innovación: “**Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zuc).** UAAAN-38111-425405001-2921 por el financiamiento para el desarrollo de esta tesis.

A el **Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular** por las grandes lecciones y la confianza otorgada y lograr hacerme ver que la ciencia es algo mágica que hecha entre amigos es invaluable.

A la **M.C. María Del Carmen Julia García** por ser un gran pilar de apoyo a lo largo de mi trayectoria escolar, creer en mí y siempre estar en la mejor disposición de ayudar, así como por sus grandes consejos.

Al **Dr. Marco Adán Juárez Verdayes** por su paciencia, dedicación y palabras de aliento formando de mí una estudiante y profesionista consciente y preparada.

DEDICATORIA

A DIOS.

A mi abuela ***Ma. Elena Briones T.*** por ser una mujer virtuosa que con su amor y apoyo ayudó forjarme como la persona que soy ahora, por siempre ser mi lugar seguro y feliz. Por abrazarme en esos días grises y siempre tener una palabra de aliento. Por los inestimables y preciosos momentos que pasé junto a ella.

A mis padres ***Raquel Pérez Briones*** y ***Gabriel García Reyes*** por ser un gran soporte en cada paso que daba y por alentarme cada día. Por todos aquellos sacrificios que día con día han hecho para que yo pueda avanzar constantemente como persona.

A mi sobrina ***Africa Adanna Cortez García*** por ser ese toque de alegría que ayuda a que mis días sean más llevaderos.

A mis tíos ***Juana Elizabeth Reyna Rios*** y ***Abel García*** por creer en mí y brindarme su apoyo para alcanzar mis objetivos.

A ***Elizabeth Muñoz, Sonia Duron, Brisa Bernadac, Nallely Monsivais, Gabriela Dávila*** y ***Polet Sifuentes*** por ser un gran soporte dentro de mi estadía dentro de esta preciosa universidad, así como por los grandes momentos, los consejos que me han brindado y sobre todo por hacer de mi vida un poco más memorable.

ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO

DERECHO DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO ¡Error! Marcador no definido.	
AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE GENERAL DEL CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN.....	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivo General.....	2
1.3 Objetivos específicos	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Generalidades de la candelilla.....	3
2.1.1 Botánica	4
2.1.2 Descripción morfológica de la planta	4
2.1.3 Características de la raíz.....	5
2.1.4 Características de la hoja.....	6
2.1.5 Características de la flor	6
2.1.6 Características del fruto.....	7
2.1.7 Características de la semilla.....	7
2.1.8 Hábitat y distribución	7
2.2 Interacción microorganismo-planta	9
2.2.1 Filósfera	9
2.2.2 Endósfera	10
2.2.3 Rizósfera	10
2.2.4 Mecanismos de acción de las PGPR	10
2.2.5 Mecanismos de acción Directo.....	11
2.2.5.1 Solubilización de fosfato.....	11
2.2.5.2 Fijación de nitrógeno.....	12
2.2.5.3 Solubilización de Potasio.....	13
2.2.5.4 Síntesis de Fitorreguladores.....	13
2.2.5.5 Producción de sideróforos.....	13
2.2.6 Mecanismos de acción Indirectos	14
2.2.6.1 Resistencia Sistémica Adquirida.....	14
2.2.6.2 Control de patógenos por competencia o antagonismo.....	14
2.2.6.3 Producción de enzimas.....	14
2.2.6.4 Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos	14
2.3 Uso de Bacterias PGPR como una nueva estrategia en la agricultura.....	14

2.3.1 Efecto de los inóculos bacterianos en los cultivos.....	15
2.4 Un cultivo de gran importancia mundial	16
2.4. 1 Implemento de inóculos bacterianos en el cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3. Área de estudio.....	18
3. 1 Muestreo.....	18
3. 1. 1 Aislamiento de bacterias	18
3. 2.1 Dilución en serie de suelo	19
3. 2. 2 Dilución en serie de rizósfera	20
3. 2. 3 Dilución en serie de bulbo	21
3. 3 Selección de cepas bacterianas.....	21
3. 3. 1 Selección de cepas con características PGPR.....	22
3. 3. 2 Producción de sideróforos.....	23
3. 3. 3 Solubilización de Fosfatos	23
3. 3. 4 Solubilización de Potasio.....	23
3. 3. 5 Solubilización de Nitrógeno	23
3. 4 Cuantificación de solubilización de N, P, K y producción de sideróforos	24
3. 5 Evaluación del efecto de las bacterias PGPR aisladas en la promoción y crecimiento en <i>Phaseolus vulgaris</i>	24
3. 5. 1 Preparación del inóculo.....	24
3. 5. 2 Inoculación para evaluar la germinación	25
3. 5. 3 Inoculación de semillas para evaluación de crecimiento.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4. 1 Aislamiento de cepas bacterianas de rizósfera, suelo y bulbo	27
4. 2 Evaluación cualitativa de características PGPR	28
4. 3 Evaluación cuantitativa de características PGPR.....	31
4. 4. 1 Evaluación de los efectos PGPR en el crecimiento de <i>Phaseolus vulgaris</i>	35
IV. CONCLUSIONES	39
VI. LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Ubicación geográfica de toma de muestras</i>	18
Cuadro 2. Desinfección semilla	26
Cuadro 3. Morfología colonial de las cepas aisladas en la rizósfera de candelilla	27
Cuadro 4. Morfología colonial de las cepas aisladas en el suelo de candelilla	27
Cuadro 5. Morfología colonial de las cepas aisladas en bulbo desinfectado de candelilla.	28
Cuadro 6. Morfología colonial de las cepas aisladas en el bulbo sin desinfectar de candelilla.	28
Cuadro 7. Cepas positivas a la evaluación cualitativa para características PGPR.....	30
Cuadro 8. Medio para solubilizadores de potasio.	31
Cuadro 9. Medio para solubilizadores de fósforo	31
Cuadro 10. Medio para productores de sideróforos	32
Cuadro 11. Medio para fijadores de Nitrógeno las letras pegadas.....	32
Cuadro 12. Prueba de medias mediante Tukey ($p>0.05$) en raíz de frijol (cm).....	36
Cuadro 13. Prueba de medias mediante Tukey ($p>0.05$) de Peso seco de frijol (g).	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Asociación de candelilla con otras especies.....	3
Figura 2. <i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc	5
Figura 3. Raíz de candelilla	6
Figura 4. Flor de candelilla	6
Figura 5. Desierto Chihuahuense donde se distribuye la candelilla.....	7
Figura 6. Textura del suelo Desierto Chihuahuense.....	8
Figura 7. Dilución en serie de suelo.	19
Figura 8. Dilución en serie de Rizosfera	20
Figura 9. Dilución en serie Bulbo	21
Figura 10. Selección de bacterias	22
Figura 11. Selección de cepas PGPR	22
Figura 12. Preparación de inóculos	25
Figura 13. Viraje de color en presencia de halo en medios específicos para la determinación de características PGPR.....	29
Figura 14. Porcentaje de germinación de cepas y control en semillas de frijol.....	33
Figura 15. Desarrollo de raíz en prueba de germinación de las diferentes cepas y control.....	34
Figura 16. Efecto de la inoculación de las cepas 3, 8 y 23 en el crecimiento de <i>Phaseolus vulgaris</i> . .	35
Figura 17. Peso fresco de la raíz de plantas de frijol.....	37
Figura 18. Peso fresco del tallo de plantas de frijol	37

RESUMEN

Euphorbia antisyphilitica Zucc es un arbusto endémico del desierto Chihuahuense que recibe el nombre coloquial de "Candelilla". Se encuentra dentro de los diez recursos forestales no maderables de mayor impacto en México, ya que a partir de ella se basa la economía de diversas localidades mediante la recolección, extracción y venta de cera. Esta especie se desarrolla funcionalmente en un hábitat donde se encuentra expuesta a temperaturas extremas, precipitaciones pluviales mínimas y suelos con nula materia orgánica. Al estar bajo altas condiciones de estrés la planta genera una interacción planta-microorganismo que le ofrece distintos mecanismos para su desarrollo. Sin embargo, la información e investigación que nos permitan identificar los microorganismos asociados a esta planta para su posterior empleo es limitada. Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar los microorganismos asociados al suelo, rizósfera y bulbo de la planta candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) para determinar sus características promotoras de crecimiento vegetal, así como su efecto en la germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

Se aislaron 25 cepas bacterianas de las cuales; 8 pertenecen a rizósfera, 8 a suelo, 5 a bulbo desinfectado y 5 más de bulbo desinfectado. De estas, dieron positivas en al menos una de las características asociadas a Bacterias Promotoras De Crecimiento (por sus siglas en inglés, PGPR): producción de sideróforos, solubilizadores de potasio o fosforo y fijación de nitrógeno. Se seleccionaron tres que mostraron ser positivas a más de una característica PGPR y que tuvieron una alta eficiencia de producción, por lo cual se seleccionaron las cepas 3, 8 y 23 para evaluar su efecto en la germinación y crecimiento de frijol *Phaseolus vulgaris*. Con las cepas 3 y 23 se obtuvo un 100% de germinación. En el caso de la longitud de raíz no se obtuvo una diferencia significativa entre cepas, sin embargo, en el peso fresco de raíz la cepa 3 tuvo una diferencia significativa a comparación de las otras dos cepas y el control. Finalmente, en la evaluación de peso fresco de tallo no se mostraron diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas.

Palabras clave: Candelilla, Microorganismos, Bacterias Promotoras De Crecimiento.

I. INTRODUCCIÓN

El desierto Chihuahuense es una zona donde se encuentra alojadas grandes miembros de las familias *Cactaceae*, *Asparagaceae* así como la familia de otras plantas xerófitas que por sí mismas ya desarrollan mecanismos anatómicos, fisiológicos y morfológicos que le permite sobrellevar el estrés abiótico y condiciones ambientales inhóspitas a los que se ven expuestas (Granado-Sánchez *et al.*, 2010).

No obstante, diversos estudios realizados señalan que otro factor de suma importancia para la adaptabilidad de estas especies radica en la interacción que establecen con los diversos microorganismos los que le ayudan a subsistir en estas condiciones desfavorables. Estos microorganismos son capaces de actuar de distintas formas favorables hacia la planta. Dentro de estos podemos encontrar a las Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) las cuales son integrantes del microbioma perteneciente a la planta, estas tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal a partir de fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos regulación y producción de fitohormonas, síntesis de compuestos volátiles, así como la producción de enzimas y actividad de biocontrol (Puente *et al.*, 2004) .

La candelilla es una especie endémica de este desierto, que es conocida por su gran capacidad de adaptabilidad a situaciones de estrés extremo debido a su entorno, presenta la producción de cera como mecanismo de defensa que le permite conservar la humedad. Sin embargo, también establece correlaciones con diversas especies que le permite sobrellevar las condiciones de pH alcalinos, materia orgánica nula, suelos bajos en nitrógeno y poca humedad (Salazar-Ramírez *et al.*, 2021) . Sin embargo, la información e investigación que nos permitan identificar los microorganismos asociados a esta planta para su posterior empleo es limitada. Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar los microorganismos asociados al suelo, rizósfera y bulbo de la planta candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) para determinar sus características promotoras de crecimiento vegetal, así como su efecto en la germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

1.1 Hipótesis

Los microorganismos asociados a la planta candelilla cuentan con efectos de promoción vegetal que pueden ser aplicados a cultivos comerciales como *Phaseolus vulgaris* L.

1.2 Objetivo General

Aislar y caracterizar los microorganismos asociados al suelo, rizósfera y bulbo de la planta candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) para determinar sus características promotoras de crecimiento vegetal, así como su efecto en la germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

1.3 Objetivos específicos

1.3.1 Aislar y purificar las bacterias asociadas al suelo, rizósfera, y bulbo de candelilla.

1.3.2 Identificar las bacterias con funciones PGPR de los aislados en diferentes medios selectivos y diferenciales.

1.3.3 Evaluar los efectos de las cepas bacterianas con mayor eficiencia de producción en la germinación y crecimiento en *Phaseolus vulgaris* L.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la candelilla.

Euphorbia antisyphilitica Zucc es un arbusto endémico del desierto Chihuahuense que puede llegar a medir entre 30 a 60 cm de altura, por lo general presenta raíces pequeñas y tallos de color verde grisáceo, suele encontrarse en suelos pobres en nitrógeno y ricos en carbonato de calcio, con pH de 7.4 a 8.4. (Rojas Molina *et al.*, 2011).

Este arbusto es uno de los más relevantes en la familia *Euphorbiaceae*. Por lo general suele crecer junto con otras especies como ocotillo, algunos cactus, lechuguilla, sotol y pasto chino como se muestra en la **Figura 1** (Salazar-Ramírez *et al.*, 2019.).



Figura 1. Asociación de candelilla con otras especies.

Es una especie de suma importancia ecológica debido a que permite el desarrollo de otras especies y previene la erosión del suelo por los efectos del viento y radiación solar (Moreno Resendez *et al.*, 2019). También, tiene una relevancia social y económica ya que está considerada como uno de diez recursos forestales más importantes en México, puesto que la cera que es extraída de sus tallos es usada en distintos ámbitos industriales que van desde la elaboración de cosméticos hasta aplicaciones en la industria alimentaria

(Martínez Salvador *et al.*, 2013).

Además, la candelilla tiene un gran potencial a futuro debido a que está considerada como un “petrocultivo” es decir que, a partir de este, es posible obtener compuestos de hidrocarburos que pueden ser transformados a carburantes. De manera tal que sería posible obtener un combustible proveniente de un recurso natural renovable (Villa-Castorena *et al.*, 2010).

2.1.1 Botánica

La clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Dicotyledoneae*

Orden: *Euphorbiales*

Familia: *Euphorbiaceae*

Género: *Euphorbia*

Especie: *antisyphilitica*

2.1.2 Descripción morfológica de la planta

Esta es un arbusto perenne que presenta un color verde grisáceo esta tonalidad es dada debido a la cera que produce y recubren sus tallos como mecanismo de defensa ante los patógenos y clima extremo en el que se ve situada.

Por lo general suele alcanzar un diámetro promedio de 90 cm en su madurez, sus tallos son largos, erectos y van desde los 0.1 a 1.0 cm de diámetro, se estima que en promedio llega a desarrollar 100 tallos con un aspecto cilíndrico y suelen presentarse de forma de rizomas (subterráneos) y aéreos (González Mancilla *et al.*, 2017).



Figura 2. *Euphorbia antisiphilitica* Zucc

2.1.3 Características de la raíz

Presenta una raíz pequeña que puede tener distintas tonalidades que van desde el verde grisáceo hasta un café rojizo esta se encuentra recubierta por una capa semileñosa además de presentar látex, suele contar con una cantidad abundante de raíces adventicias como se muestra en la **Figura 3** (Ávila-Rebollar *et al.*, 2007).



Figura 3. Raíz de candelilla

2.1.4 Características de la hoja

Se presentan en la parte distal del tallo, suelen ser espaciadas, pequeñas y sésiles. Se encuentran de una forma alterna, verticilada u opuestos. Cuando son jóvenes presenta un color verde oscuro, pero al volverse seniles comienza a aparecer un tinte rojizo en el ápice que se expande por los bordes hasta el limbo hasta que finalmente la hoja se desprende (Ávila-Rebollar *et al.*, 2007).

2.1.5 Características de la flor

Sus flores se encuentran ordenadas en espigas compuestas de cinco piezas con un perianto de forma simple, sus estambres se encuentran en filamentos que a su vez pueden estar libres o soldados, están interpolados sobre un disco nectarífero (**Figura 4**). Presenta un gineceo que es un ovario súpero que contiene tres carpelos donde se ubican tres lóculos donde cada uno de ellos puede llegar a contener uno o dos óvulos (Salvador- Martínez *et*



Figura 4. Flor de candelilla

al., 2013).

2.1.6 Características del fruto

Alcanza una longitud de 1 cm de longitud y su diámetro llega a medir de 5 a 6 mm, en su madurez presenta una coloración café. Se presentan en cápsulas trilobular sujetado de un pedúnculo. Por lo general cuando el fruto ha completado su desarrollo se transforma en semilla de manera que la cápsula que lo envuelve estalla cayendo a un lado de la planta (Villa-Castorena *et al.*, 2010).

2.1.7 Características de la semilla

Presenta un color café claro con una estructura muy delgada de un color blanquecino por lo general estas presentan una viabilidad promedio de 53.16%, tomándose en cuenta factores como el peso de semillas, coloración del fruto, etc. (Flores del Ángel *et al.*, 2013).

2.1.8 Hábitat y distribución

Esta planta se encuentra distribuida por todo el desierto de Chihuahua (**Figura 5**), zona que, se encuentra delimitada por el sudoeste de Estados Unidos, donde, incluye los estados de Arizona, Nuevo México y Texas, así mismo en el norte de México abarcando los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Coahuila, Durango Tamaulipas y Nuevo León (Ávila-Rebollar, 2007).



Figura 5. Desierto Chihuahuense donde se distribuye la candelilla

Imagen satelital de la NASA disponible en:
<https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps>

Esta área se extiende por más de 450,000 km² y se distingue por presentar un clima en donde las temperaturas van desde los -4 a los 44 °C, en general se compone por laderas, cerros, planicies y lomeríos (De la Garza *et al.*, 1993).

La candelilla suele encontrarse en suelos con densidad aparente y texturas franco-arenosas, pH de 7.4 hasta 8.4 y un porcentaje bajo de materia orgánica y nitrógeno, pero presentando un alto contenido de pedregosidad, compuesta principalmente por rocas de carbonato de calcio, que le brinde un buen drenaje, intercambio catiónico, un alto contenido de carbono orgánico (**Figura 6**). Suele encontrarse entre 1000 y 1500 m de altura, donde las lluvias son muy escasas presentando así una precipitación pluvial anual mayor a 50 mm y menor a 550 mm (Moreno-Resendez *et al.*, 2019).



Figura 6. Textura del suelo Desierto Chihuahuense
Gómez-Alonso Disponible en:
<https://www.sembrar100.com/textura-de-la-tierra/>

2.1.9 La candelilla y su interacción con los microorganismos

Al ser una especie que se desarrolla en una zona árida permite ver reflejado su interacción con los diversos microorganismos que ayudan a su adaptación a condiciones climáticas adversas, condiciones físicas y químicas del suelo desfavorables, así como la protección contra agentes patógenos. Actualmente se han reportado bacterias del género *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Cronobacter*, *Siccibacter* y *Acinetobacter*. Estos microorganismos demostraron ayudar a combatir el estrés salino alto y a su vez, ejercer características PGPR

(Salazar-Ramírez *et al.*, 2021). Sin embargo, debido a la limitada investigación que se ha realizado solo se han reportado 21 bacterias con cualidades PGPR que han tenido un efecto positivo en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana in vitro*. Por lo que aún falta investigar el reservorio de bacterias que cuenten con cualidades promotoras de crecimiento para entender la interacción de la candelilla y su medio ambiente, para que posteriormente y que puedan ser aplicadas a futuro en condiciones de invernadero sobre algún cultivo de interés.

2.2 Interacción microorganismo-planta

En el suelo una gran diversidad de microorganismos donde se incluyen, protozoos, hongos, bacterias, oomicetos, algas y virus por lo general se encuentran formando diversas interacciones que les permita su supervivencia. Esta interacción puede ser entre ellos mismos o incluso formar un vínculo con diversas especies vegetales. La diversidad de microorganismos que se relacionan con la planta puede ser catalogada en tres diferentes aspectos: 1) es cuando los microorganismos son mutualistas, 2) cuando son comensalitas y 3) cuando son patógenos. Al establecer una relación con alguna especie vegetal, por lo general, las poblaciones microbianas se encuentran concentradas en tres áreas esenciales de las plantas que son; filósfera, endósfera y rizósfera (Benjumeda-Muñoz, 2017).

2.2.1 Filósfera

La filósfera se refiere a la concentración de microorganismos que se encuentran en la superficie de los órganos aéreos de la planta. En su mayoría esta microbiota se encuentra a lo largo de las venas foliares o se disponen en biopelículas en la superficie de las hojas. Los microorganismos que aquí se encuentran son de vital importancia para el desarrollo de la planta ya que fomentan la síntesis de fitohormonas, fijación de nitrógeno y favorecen la captación de distintos sustratos a través de porinas y transportadores ABC (Dighton & Krumins, 2014).

Por lo general el microbioma de esta zona suele cambiar rápidamente, debido a que el acceso a nutrientes es limitado y se encuentran susceptibles a las diferentes alteraciones físicas (Ochoa *et al.*, 2022).

2.2.2 Endósfera

La endósfera se ve delimitada por las poblaciones microbianas que se encuentran en la endorizósfera, endofilósfera y dentro de los tejidos reproductivos o bien en el tejido interno de las semillas. En su mayoría estos tienen un impacto positivo hacia la salud de la planta, ya que tienen la capacidad de suprimir enfermedades de las acciones de los patógenos, así como reducir el impacto ambiental (Isaza-Alvares, 2019).

2.2.3 Rizósfera

La zona de la rizósfera se ve delimitada por 3 a 5 cm de la capa del suelo que está en contacto con las raíces de las plantas, es aquí en donde hay mayor actividad microbiana y aumento de biomasa. Este sector es uno de los más ricos en nitrógeno, materia y compuestos orgánicos, así como una textura en el suelo más propicia que favorece el desarrollo de los microorganismos. Se establece que se encuentra una concentración de 10 a 1000 veces mayor en cuanto a la asociación simbiótica de bacterias a comparación de otras áreas de la raíz (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Existen diversas formas en las que una bacteria puede establecer un sinergismo en esta zona. De estas formas se establecen dos grandes grupos que ayudan a la asociación de estas bacterias, dentro de la primera agrupación se incluyen las bacterias móviles del suelo a los cuales se les designa el nombre de Rizobios, por otro lado, encontramos al grupo que es capaz de formar una simbiosis con las plantas (García, 2011).

En ambos grupos se pueden encontrar diversos géneros de bacterias PGPR, que no solo promueven el crecimiento vegetal, sino que también son capaces de actuar como control biológico contra fitopatógenos, ya que son capaces de adaptarse a diversas condiciones ambientales ayudando a mitigar situaciones de estrés en la planta (Granada-Mora *et al.*, 2016).

2.2.4 Mecanismos de acción de las PGPR

Las bacterias que se encuentran agrupadas dentro de las PGPR presentan diferentes acciones que al ser empleadas les permiten a las plantas mitigar diversos tipos de estreses abióticos lo cual las coloca como una potencial alternativa en la agricultura.

Por lo general estas se ven divididas en dos grandes grupos: primero, aquellas cuyo mecanismo es indirecto, es decir, ocurre fuera de la planta. Caso contrario, con el segundo grupo que se clasifica como directo, ya que llegan a afectar directamente el metabolismo debido a la expresión de genes (Zahir-A. *et al.*, 2004).

2.2.5 Mecanismos de acción Directo

2.2.5.1 Solubilización de fosfato

En la naturaleza la disponibilidad de fósforo (P) es cada vez más escasa por la falta de fuentes naturales, es un ámbito sumamente delicado sobre todo para la producción agrícola. Uno de los grandes inconvenientes que se tiene para la correcta asimilación de fósforo por parte de las plantas es que por lo general este se encuentra en el suelo de una forma no asimilable. Existen dos maneras en que este mineral puede presentarse, la forma inorgánica y la orgánica, la forma que este se presente se encuentra sujeto a diferentes factores del suelo como pH, la vegetación que ahí se encuentra, actividad microbiana y así mismo la fertilización que reciba el suelo (Palma-Terán, 2022).

Este es un punto de acción para algunos grupos de bacterias como los son *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Klubiella* en donde a través de diferentes acciones ayudan a la solubilización de fósforo (Samaniego-Vivanco, 2018).

Existen diversos mecanismos que desarrollan las bacterias PGPR para ayudar a la solubilización de fosforo, una de ellas radica en la disminución de pH del medio extracelular mediante la secreción de ácidos orgánicos que actúan como quelantes de cationes de calcio, también puede atraer Fe, Al y Mg, que ayudan a la liberación de fosfatos a partir de compuestos fosfáticos insolubles (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2016).

Así mismo se puede dar la solubilización de fosforo por la síntesis de enzimas fosfatasas que permite hidrolizar el fosforo orgánico que procede de materia orgánica (Palma-Terán, 2022).

2.2.5.2 Fijación de nitrógeno

Otro de los elementos que son de suma importancia para el desarrollo de la planta es el nitrógeno (N), dentro de las bacterias con cualidades PGPR aquellas que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en una molécula disponible para las plantas son una de las más estudiadas y con mayor importancia en la industria de la agricultura, a tal grado que ya se encuentran de forma comercial para su uso como biofertilizantes (Granada-Mora, 2016).

Las bacterias que son fijadoras de nitrógeno pueden encontrarse en dos casos diferentes, el primero y más conocido es de aquellas a las que se les denomina simbióticas asociadas a leguminosas, estas tienen la cualidad de poder colonizar las raíces y formar nódulos como es el caso de *Rhizobium* (Benjumeda-Muñoz, 2017). Sin embargo, en este grupo también podemos catalogar a aquellas llamadas de vida libre donde se encuentran géneros como *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, entre otras. Para ambos grupos su mecanismo de acción se deriva por la capacidad de síntesis de la enzima nitrogenasa. Ya sea si los microorganismos son de vida libre o en simbiosis con la planta, este proceso se encarga de permitir que este elemento químico sea reducido y posteriormente fijado para dar paso a compuestos como el amonio (NH_4), que posteriormente es transformado a formas más asimilables como nitrito (NO_2) y nitrato (NO_3) (Fernández-Pascual *et al.*, 2002).

Para la reducción de N_2 a NH_4 se lleva a cabo la siguiente reacción:



Este es un proceso que necesita de cantidades muy grandes de energía y poder reductor y por lo tanto se necesitan de condiciones específicas para que la enzima nitrogenasa pueda trabajar en condiciones óptimas. Para que el complejo enzimático trabaje de una manera óptima, se necesitan cantidades bajas de oxígeno que permita la fosforilación oxidativa, para lo cual, la mayoría de las bacterias cuenta con mecanismos que les permite mantener las concentraciones de este elemento, de estos se destaca la protección conformacional, inhibición reversible, protección respiratorio, microaerofilia, síntesis de la nitrogenasa así como la separación espacial de esta enzima y barreras de difusión (Mayz-Figueroa, 2004).

2.2.5.3 Solubilización de Potasio

El potasio (K) es uno de los nutrientes de mayor importancia para las plantas que participa en la activación de más de 80 enzimas involucradas en diferentes reacciones biológicas, además, ayuda a hacer frente a un estrés abiótico como; sequías, heladas, bajas precipitaciones pluviales y en presencia de patógenos. Al igual que fósforo se encuentra en el suelo de una forma no asimilable para la planta (Velázquez-Gurrola et al., 2015).

Dentro de las PGPR se pueden presentar diversos mecanismos para la solubilización de potasio entre los cuales podemos encontrar la oxidoreducción y la producción de ácidos grasos (Samaniego-Vivanco, 2018).

Para una movilizar el potasio del suelo, la bacteria se encarga de la oxidación parcial de glucosa para la producción de ácidos de los cuales se destacan: el ácido tartárico, ácido glucónico, ácido oxálico, ácido 2-cetoglucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico y el ácido succínico así mismo también se presenta la producción de protones que se deriva de la asimilación del NH_4^+ , que a su vez, ayuda a reducir el pH del suelo. Una vez que se lleva a cabo esta acidólisis se hidroliza el potasio mineral (Álvarez et al., 2016).

2.2.5.4 Síntesis de Fitorreguladores

Se pueden encontrar bacterias capaces de sintetizar hormonas como las giberelinas, citoquininas, auxinas y el etileno, facilitando en la planta el crecimiento radicular, desarrollo de pelos radiculares, incremento de la parte aérea, una mejor respuesta en la formación de brotes y raíces primarias, así como la germinación de semillas y la formación de nódulos (Dighton & Krumins, 2014).

2.2.5.5 Producción de sideróforos

El hierro (Fe), es uno de los micronutrientes de mayor importancia para la planta al tener participación para la síntesis de pigmentos y actuar como cofactor para la formación de enzimas que participan en la regulación de procesos de importancia como la fotosíntesis, fijación de nitrógeno y respiración. En su mayoría se encuentra en el suelo de en forma de ion Fe^{+3} , como hidróxidos y óxidos insolubles y por ende no solubles para la planta. Para

hacer este compuesto más soluble algunas bacterias se encargan de liberar moléculas quelantes capaces de reducir y solubilizar el hierro (Palacios-Rodríguez *et al.*, 2016).

2.2.6 Mecanismos de acción Indirectos

2.2.6.1 Resistencia Sistémica Adquirida

Esta les permite a las plantas desencadenar distintas vías de transducción de señales, que ayudarán a la planta para defenderse contra los patógenos, la cual, se ve inducida cuando las bacterias producen distintos compuestos como: sideróforos, ácido salicílico y liposacáridos (Leighton-Fleriderman, 2017).

2.2.6.2 Control de patógenos por competencia o antagonismo

Una de las principales características que tienen las bacterias promotoras de crecimiento es la colonización, sobre todo aquellas que se encuentran en la rizósfera, ayudan a desplazar a otros microorganismos que puedan llegar a perjudicar a la planta. Así mismo, distintos géneros de estas bacterias son capaces de sintetizar moléculas y sustancias como antifúngicos y antibióticos (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.2.6.3 Producción de enzimas

Diversas cepas bacterianas son capaces de sintetizar enzimas como quitinasas, proteasas y glucanasas que se encargan de romper y degradar las paredes celulares de las células (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

2.2.6.4 Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos

Se ha reportado que diversos géneros de bacterias son capaces de hidrolizar diversos compuestos como el ácido fusárico, causante del marchitamiento por infección de patógenos (Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010).

2.3 Uso de Bacterias PGPR como una nueva estrategia en la agricultura

En la actualidad, dentro de la industria agrícola la aplicación de compuestos químicos como fertilizantes que permiten tener una mejor solubilización de minerales, ha hecho posible el mantener e incrementar el rendimiento de las cosechas. Sin embargo, debido al mal manejo y sobre aplicación de estos, se han generado un sinnúmero de consecuencias hacia

los agroecosistemas como: contaminación de aguas, eutrofización, contaminación del aire, la degradación del suelo por la variación de pH, el deterioro de las propiedades físicas y sobre todo el desequilibrio biológico por el cambio radical de la microfauna causando una disminución notable en el rendimiento de los cultivos (Santoyo-G *et al.*, 2009).

Se estima que, de no implementar nuevas estrategias en la agricultura actual para el año 2050, un 50% de las zonas cultivables no serán viables, las cuales se verán afectadas tanto por el efecto que los fertilizantes químicos han desarrollado y los efectos que el cambio climático traería consigo (FAO, 2018).

Por lo tanto, uno de los principales retos a futuro es buscar innovaciones tecnológicas que propicien a la conservación del ambiente, que permitan incrementar la productividad y rendimiento de los cultivos, así como, reducir los costos de producción para una agricultura sustentable (FAO, 2009).

La implementación de los biofertilizantes y los inóculos bacterianos son dos de las grandes alternativas propuestas para dar solución a este gran reto. Por su parte, el uso de inóculos bacterianos ayuda para suplir las necesidades nutricionales de las plantas y a su vez se pueden emplear como un sistema que contrarreste la contaminación de suelos, ya que ayudan en la disminución de la disponibilidad de la toxicidad de diferentes metales pesados mejorando el crecimiento y desarrollo a través del reciclaje de nutrientes, desintoxicación de restos de productos químicos y contribuir a la mejora de la estructura del suelo (Izasa-Álvarez, 2019).

2.3.1 Efecto de los inóculos bacterianos en los cultivos.

Existen diversos estudios que demuestran los beneficios que las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) tiene un impacto significativo en el desarrollo y crecimiento de los cultivos. Dichos beneficios están aunados al crecimiento de la biomasa radicular, el área de raíces, aumento en el suministro de nutrientes, así como la absorción de estos. Dentro de los estudios realizados han agrupado diversos géneros de bacterias según el mecanismo que está presente y su efecto en la planta (Layne-G *et al.*, 2008).

Otro de los mecanismos más estudiados en estos microorganismos es la fijación de

nitrógeno, algunos de los géneros de bacterias que están asociados a este proceso son: *Azoarcus sp*, *Beijerinckia sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans* y *Rhizobium sp.*, el efecto de estas hacia la planta no solo radica en el incremento de nitrógeno, sino que influye en el aumento de biomasa y formación de raíces laterales (Quiroz-Ruedas, 2021).

En el caso de suelos contaminados por metales pesados el género *Kluyvera sp.* muestra una eficiencia en la reducción de metales pesados como el níquel facilitando a la planta su desarrollo en estas zonas (Quiroz-Ruedas, 2021).

Otro de los mecanismos mejor estudiados y ya implementados al mercado es la solubilización de fosfatos por los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, que les permite a los cultivos aumentar el contenido de biomasa y el fósforo disponible (Palacio-Rodríguez *et al.*, 2016).

Para la síntesis de fitorreguladores los géneros de mayor impacto son: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, su efecto en la planta radica en el aumento de biomasa y un crecimiento y ramificación de raíz, así como inducir al ciclo vegetativo (Benjumeda-Muñoz, 2017).

Por otro lado, en áreas desérticas el género *Azospirillum sp.* ha demostrado incrementar la resistencia a condiciones adversas como la sequía, salinidad y toxicidad del suelo permitiendo a los cultivos su supervivencia y un aumento significativo en la biomasa (Quiroz-Ruedas, 2021). Gracias a la producción de compuestos antibacterianos y antifúngicos tales como dicitilfloroglucinol, subtilosin A, clorotetaina, micobacilina, bacilena, pirrolnitrina entre otros, han demostrado gran eficiencia para el antagonismo de fitopatógenos mostrándose como una alternativa hacia los pesticidas químicos (Santoyo-G. *et al.*, 2010).

2.4 Un cultivo de gran importancia mundial

Actualmente el frijol (*Phaseolus vulgaris*) se encuentra catalogado como uno de los granos de mayor importancia no sólo nacionalmente, sino en el mundo entero. Esto se debe a que tiene una gran presencia en el ámbito alimentario y socioeconómico al formar parte de la dieta de miles de personas de bajos ingresos, siendo esta su principal fuente de

proteínas, minerales (Zn y Fe), oligosacáridos y fibra. Así mismo al contener grandes cantidades de polifenoles, saponinas y fitoesteroles ayuda a la prevención de enfermedades crónicas-degenerativas (Herrera-Deneise *et al.*, 2021).

A día de hoy, aunque se tienen registros de la gran adaptabilidad que esta especie presenta hacia diversas condiciones agroclimáticas, sin embargo, el rendimiento en la producción de frijol disminuye bajo condiciones de temporal en los estados que componen la faja productora de frijol en México, esto debido a la baja disponibilidad de agua para el riego, desertificación severa, las sequías intermitentes, el déficit que se presenta en la precipitaciones pluviales así como la erosión y decadencia de minerales en el suelo. Si a esto se le añade las variables desatadas por el cambio climático se prevé que el rendimiento unitario del grano de frijol se reduzca hasta en un 50% (Uresti-Gil *et al.*, 2021).

Es por esto que para mitigar y neutralizar el impacto negativo que se tiene en las distintas áreas de siembra y aquellos efectos por el cambio climático es de suma importancia. Actualmente se encuentran el desarrollo de tecnologías utilizando sistemas biológicos como bacterias y hongos para mejorar y brindarle mejores características a los cultivos.

2.4. 1 Implemento de inóculos bacterianos en el cultivo de *Phaseolus vulgaris*.

Existen diversos estudios donde se ha puesto a evaluación diversas cepas bacterianas para determinar su efecto en frijol. Los géneros mayormente utilizados para este tipo de bioensayos son: *Pseudomonas*, *Beijerinckia*, *Bacillus* y *Rhizobium* que al ser inoculados ayuda a estimular el crecimiento de las plántulas, teniendo un efecto positivo en la fenología y biomasa del frijol. En su mayoría se reporta un desarrollo significativo en la longitud y peso seco de la raíz, así como el rendimiento que se tiene por plántula (Granda-Mora *et al.*, 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Área de estudio

El muestreo se realizó en diversas locaciones del ejido “La Tortuga”, Ramos Arizpe, Coahuila que se encuentra ubicado entre 25°51'43.2"N y 101°16'22.3"W.

3.1 Muestreo

La recolección se llevó a cabo seleccionando individuos de candelilla al azar en tres diferentes ubicaciones dentro de los límites del ejido La tortuga, Ramos Arizpe (**Cuadro 1**).

Para su recolección, los individuos fueron extraídos manualmente incluyendo su raíz así mismo, se recolectó suelo de donde se encontraba la candelilla, para después pasar cada uno a una bolsa de polipapel estéril, y posteriormente resguardarse en bolsas de papel Kraft para su posterior transporte al Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP donde se conservaron a 4°C para su posterior procesamiento.

Cuadro 1. *Ubicación geográfica de toma de muestras.*

Especie	Municipio	Ejido	Latitud	Longitud	Altitud
<i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc	Ramos Arizpe (Coahuila)	La Tortuga	25°28'34"	101°21'1"	1310
<i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc	Ramos Arizpe (Coahuila)	La Tortuga	25°28'29"	101°21'9"	1300
<i>Euphorbia antisyphilitica</i> Zucc	Ramos Arizpe (Coahuila)	La Tortuga	25°28'38"	101°21'0"	1290

3.1.1 Aislamiento de bacterias

Se utilizaron tres partes vegetativas de la planta, rizósfera y bulbo. También, se realizó un aislamiento del suelo donde se encontraba la candelilla con diluciones en serie en base 10 (puntos 3.2.1, 3.2.2 y 3.2.3). Todo el procedimiento fue realizado bajo una campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad.

3. 2.1 Dilución en serie de suelo

Para su procesamiento se tomaron 10 g de suelo y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada estéril. Para su siembra, se tomó en cuenta las dilución -5 de la cual se tomó 1 ml y se colocó en una placa Petri con medio Agar Soya Trypticaséina (TSA) distribuyendo la muestra con perlititas de vidrio estériles. Esto se llevó a cabo por duplicado, incubándolas a 29°C por 24 h (**Figura 7**).

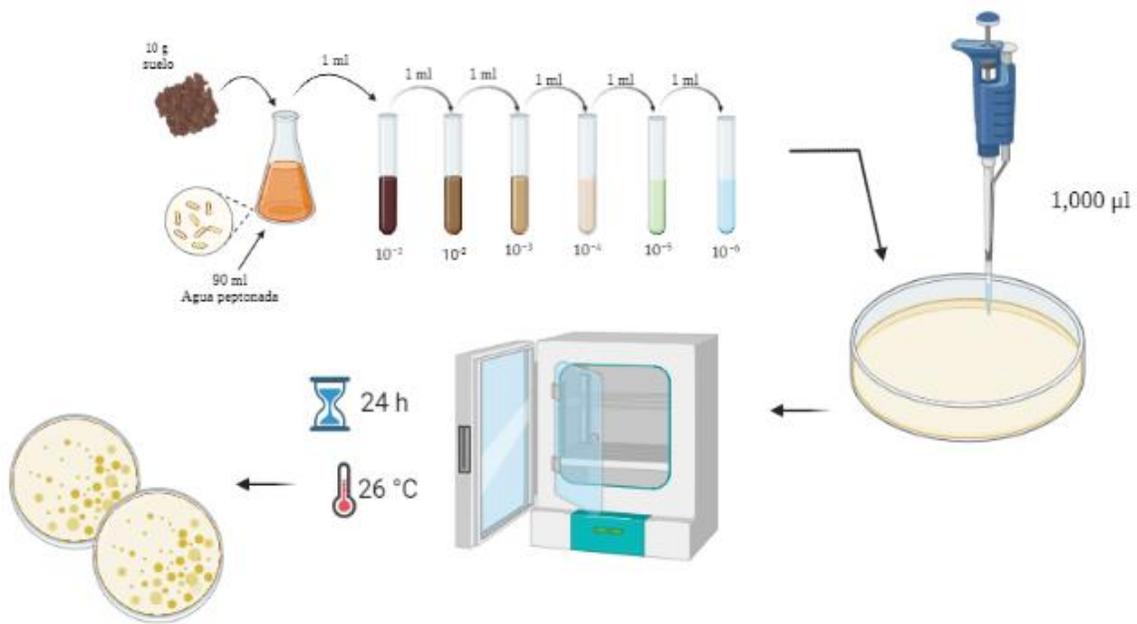


Figura 7. Dilución en serie de suelo.
Created with BioRender

3. 2. 2 Dilución en serie de rizósfera

Se tomó el suelo que se encontraba más cercano a las raíces dos o tres centímetros antes de llegar al tallo para posteriormente tomar 10 g y elaborar diluciones en serie en agua peptonada. Para la siembra se tomó en cuenta la dilución 10^{-3} de la cual se siguió el procedimiento descrito en el punto 3. 2. 1 (Figura 8).

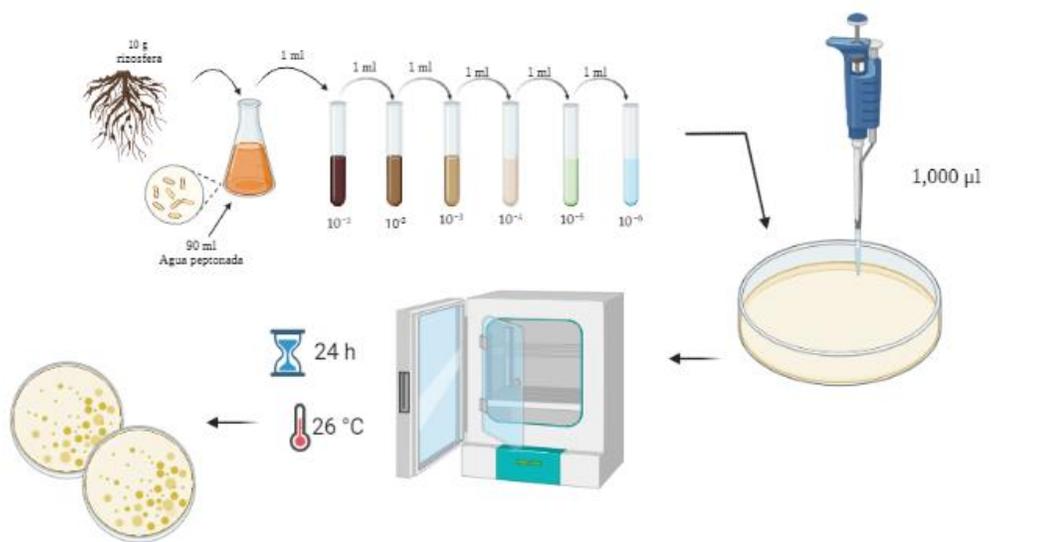


Figura 8. Dilución en serie de Rizosfera
Created with BioRender

3. 2. 3 Dilución en serie de bulbo

Para realizar el aislamiento de esta zona se tomaron en cuenta dos tratamientos, el primero en el que el bulbo estuvo sin desinfectar y el segundo en donde se le realizó un protocolo de desinfección, posteriormente las muestras fueron maceradas por separado y se realizaron diluciones seriadas y fueron sembradas en las condiciones descritas en el punto 3.2.1 (Figura 9).

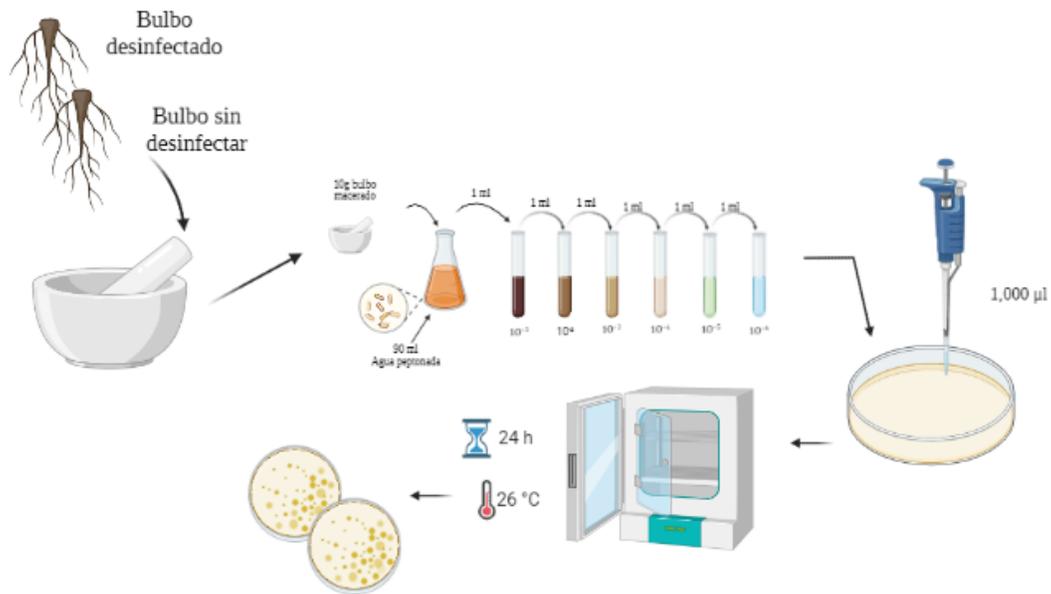


Figura 9. Dilución en serie Bulbo
Created with BioRender

El protocolo de desinfección para el tratamiento dos consistió en sumergir el bulbo en Etanol al 70% agiténdolo durante un minuto, posteriormente se enjuagó con agua estéril durante un minuto, para después agregarle Cloralex al 30% durante 10 minutos, lavando cinco veces con agua destilada, para desechar el agua y dar un enjuague con tiosulfato de sodio al 2%. Finalmente, se le hizo un doble enjuague con agua destilada y se dejó secar.

3. 3 Selección de cepas bacterianas

Después del periodo de incubación de las cajas, se realizó una descripción de las características macroscópicas y microscópicas para aislar las diferentes cepas. Una vez puras a las cepas obtenidas se les asignó un número para su posterior empleo en las diferentes pruebas realizadas (Figura 10).

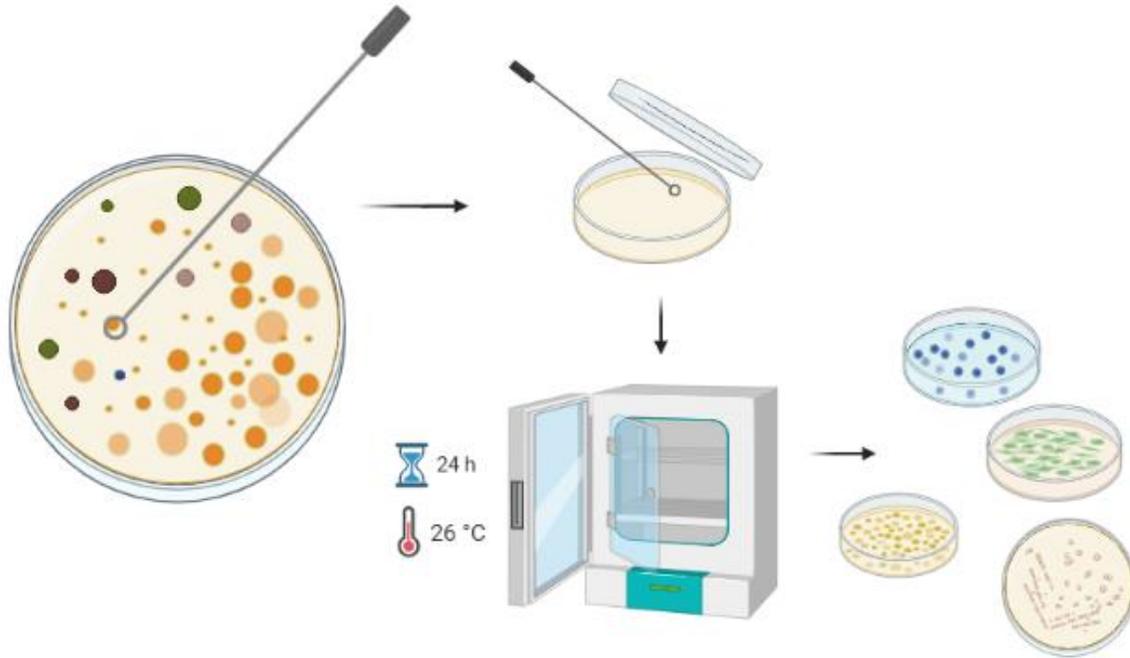


Figura 10. Selección de bacterias
Created with BioRender.

3. 3. 1 Selección de cepas con características PGPR

Para la evaluación de las capacidades PGPR de las cepas obtenidas se realizaron distintos ensayos *in vitro* en donde se determinó la producción de sideróforos, solubilización de fosfato, solubilización de potasio y la fijación de nitrógeno (**Figura 11**).

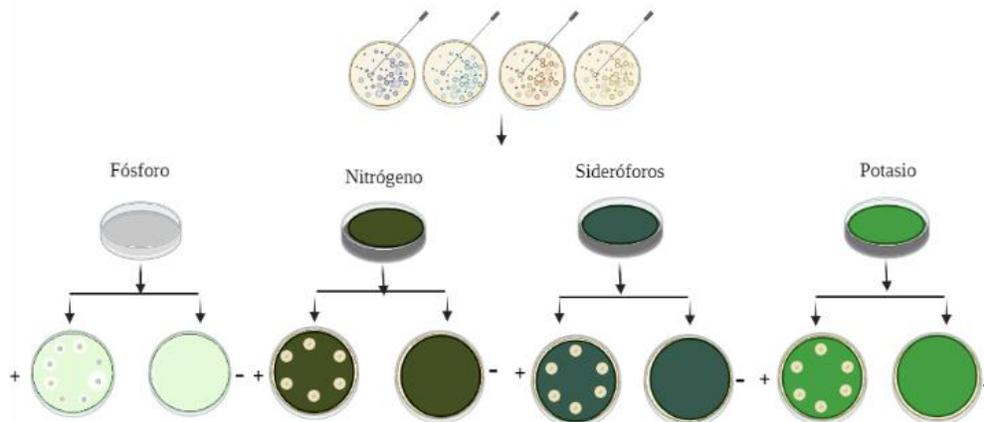


Figura 11. Selección de cepas PGPR
Created with BioRender

3. 3. 2 Producción de sideróforos

Se utilizó la metodología propuesta por Schwyn & Neilands (1987) con indicadores del CAS (cromo azurol S) y el HDTMA (hexadeciltrimetilamonio). Este es un método que funciona mediante el viraje de color a amarillo.

En primera instancia se realizó una prueba cualitativa en donde las cepas bacterianas fueron sembradas en placas de medio TSA que se incubaron por 24 horas a 26°C para que las bacterias estuvieran frescas. Posteriormente cuando las bacterias estaban en su punto máximo de actividad se realizó un rayado en placas que contenían el medio específico para sideróforos y las cajas se incubaron durante 24 horas a 26°C.

3. 3. 3 Solubilización de Fosfatos

Para la evaluación de fosfatos se utilizó el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate), este contiene fosfato de forma insoluble ($\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$), para favorecer la visualización del viraje de color en la formación de halo en el medio, se le añadió azul de bromofenol como lo señala Tajera-Hernandez *et al.*, (2013).

Se realizó una siembra en placas de medio TSA incubando durante 24 horas a 26°C para mantener las bacterias frescas para posteriormente ser rayadas en el medio específico para solubilizadores de fosfato para posteriormente incubarlas 24 horas a 26°C.

3. 3. 4 Solubilización de Potasio

Se utilizó un medio en el cual se tiene potasio en una fuente mineral, es decir un compuesto insoluble, de manera que los microorganismos que contengan la maquinaria necesaria para solubilizar este compuesto podrán hacer un viraje en el medio de cultivo.

Para la siembra se realizó el mismo procedimiento que los puntos **3.3.1** y **3.3.2**.

3. 3. 5 Solubilización de Nitrógeno

Para determinar, la fijación de nitrógeno de las cepas se utilizó un medio libre de nitrógeno y un indicador de cambio de pH como lo es el azul de bromotimol, donde solo las bacterias capaces de sintetizar la enzima nitrogenasa fijarán nitrógeno atmosférico en forma de amonio y por lo tanto producir el viraje de color.

La siembra se realizó conforme a los puntos 3.3.1 y 3.3.2.

3. 4 Cuantificación de solubilización de N, P, K y producción de sideróforos

Para determinar a las cepas bacterianas con mayor solubilización de minerales y producción de sideróforos con anterioridad se estrieron las cepas que dieron positivo en la prueba cualitativa en un medio TSA para asegurar que las bacterias estuvieran frescas. Posteriormente, se ajustaron a 1 en la escala de Mcfarland inoculando una colonia de la placa en un tubo con 5 ml de solución salina estéril y agitando en vortex durante 3 minutos para homogeneizar para finalmente tomar 10 µl e inocular en cada uno de los medios selectivos correspondiente.

Posteriormente se evaluó la Eficiencia Relativa de Producción (ERP) y la Eficiencia de Producción (EP) usando las siguientes fórmulas:

$$ERP = \frac{DP}{DC}$$

Donde: ERP es la Eficiencia Relativa de producción
DP es el Diámetro de Producción
DC es el Diámetro de Crecimiento

$$EP = \frac{(DH) - (DC)}{DC} \times 100$$

Donde: EP es la Eficiencia de Producción
DH es el Diámetro de Halo
DC es el diámetro de la colonia

3. 5 Evaluación del efecto de las bacterias PGPR aisladas en la promoción y crecimiento en *Phaseolus vulgaris*

Para evaluar el efecto en la germinación de semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se seleccionaron las tres cepas que dieron mayor rendimiento en las pruebas de cuantificación de solubilización.

3. 5. 1 Preparación del inóculo

Las cepas se incubaron en un medio líquido TSB (Caldo Soya Tripticaseína) durante 24 horas a 26°C, posteriormente, se realizó un ajuste de la densidad óptica, donde a partir del caldo TSB se tomó 1 ml del crecimiento a una celda para espectrofotometría y se midió

la absorbancia de cada una de las cepas y se ajustó a una DO_1 de 1. Se ajustó con base a la siguiente fórmula:

$$x = \frac{(DO_1)(V)}{DO_2}$$

Donde: DO_1 es la densidad óptica a llegar
 V es el volumen final que se obtendrá
 DO_2 es la densidad óptica problema

Una vez ajustada la densidad óptica se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de solución salina al 0.85% se volvió a centrifugar para dar un enjuague y finalmente se volvió a resuspender (**Figura 12**).

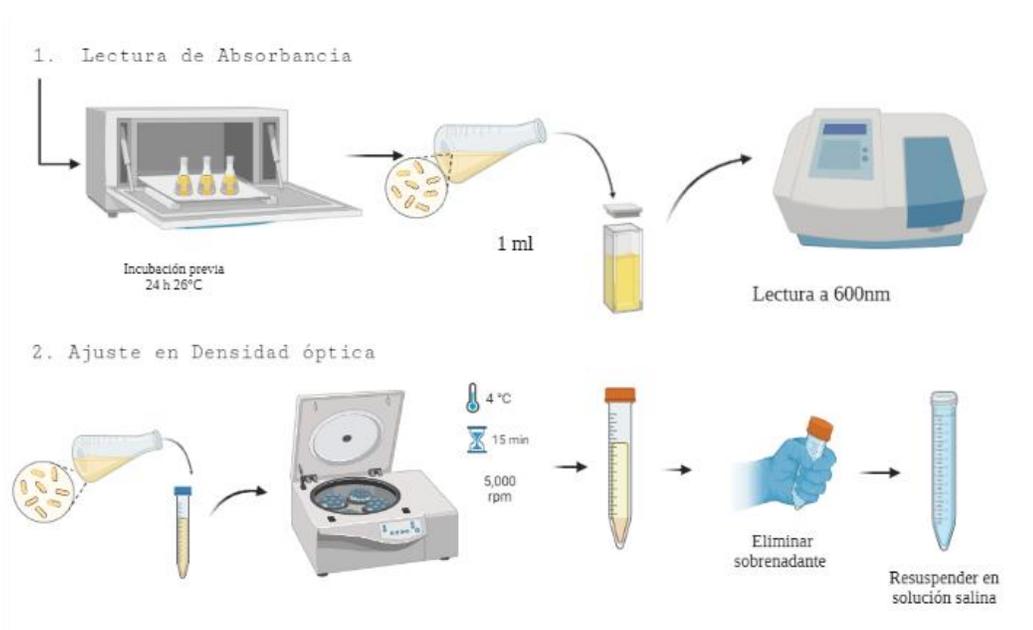


Figura 12. Preparación de inóculos
Created with **BioRender**.

3. 5. 2 Inoculación para evaluar la germinación

Las semillas utilizadas fueron sometidas a un proceso de desinfección descrito en la **Cuadro 2**, posteriormente se llevó a cabo la metodología de la toalla de papel donde se utilizaron tres repeticiones y un control, de tres semillas cada una. Las semillas desinfectadas se colocaron en una toalla de papel humedecida con agua estéril, una vez colocadas se inoculó cada tratamiento con 1,000 μl del inóculo bacteriano obtenido en el

punto **3.5.1** y finalmente se le agregó otra toalla de papel previamente humedecida, como envoltura y se cerró la caja Petri sellándola con papel parafilm, para posteriormente se germinaron durante 7 días a 26°C.

Cuadro 2. Desinfección semilla

Reactivo	Tiempo
Etanol 70%	1 minuto
Agua estéril	1 minuto
Cloralex 30%	10 minutos
Agua estéril	5 x 1 minuto
Tiosulfato de sodio	1 minuto
Agua estéril	2 minutos

3. 5. 3 Inoculación de semillas para evaluación de crecimiento

Se germinaron semillas de frijol en agar bacteriológico hasta la emersión de la radícula para posteriormente pasarlo a macetas del #5 con un sustrato de Peat Moss y Vermiculita en una relación 1:1 estéril.

Se realizaron tres réplicas de cada tratamiento más un control, con tres semillas cada uno. A cada semilla se le inocularon 1000 µl del inóculo preparado en el punto **3. 5. 1**. Y se colocó un algodón estéril para cubrir el sustrato y los inóculos, se llevaron a condiciones de invernadero. Se regaron cada tercer día con una solución de sales compuesta de Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, MgSO₄, FeSO₄ y una solución de trazas con H₃BO₃, MnSO₄, CU₂SO₄.

Para su evaluación se recolectaron las medidas semanales de la longitud del tallo de cada uno de los frijoles y al término de seis semanas se tomaron en cuenta los parámetros de la raíz, así como el peso fresco y seco de cada planta.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1 Aislamiento de cepas bacterianas de rizósfera, suelo y bulbo

Se aislaron 25 cepas bacterianas a las cuales como nombre se les asignó un número del uno al veinticinco dependiendo de la zona aislada, posteriormente se tomó en cuenta la morfología macroscópica de cada una de las cepas aisladas descritas en los siguientes cuadros.

En la rizósfera se logró el aislamiento de 8 cepas bacterianas diferentes, de igual manera en el suelo se aislaron 8 cepas bacterianas, 4 más de el bulbo desinfectado y 5 del procesamiento de bulbo sin desinfección.

Las morfologías obtenidas en cada uno de los aislados se adjuntan en las **Cuadros 3, 4, 5, 6.**

Cuadro 3. *Morfología colonial de las cepas aisladas en rizósfera de candelilla.*

Cepa Bacteriana	Forma	Elevación	Borde	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto	Superficie	Gram
1	redondo	aplanada	irregular	opaca	opaca	seca	rugosa	positivo
2	redondo	convexa	irregular	translucida	brillante	húmeda	rugosa	positivo
3	puntiforme	convexa	entero	translucida	brillante	húmeda	lisa	negativo
4	redondo	convexa	entero	translucida	brillante	húmeda	lisa	negativo
5	puntiforme	abombada	entero	translucida	opaca	seca	rugosa	negativo
6	redondo	convexa	irregular	opaca	opaca	seca	rugosa	positivo
7	redondo	convexa	entero	translucida	brillante	húmeda	lisa	negativo
8	puntiforme	convexa	entero	translucida	brillante	húmeda	lisa	negativo

Cuadro 4. *Morfología colonial de las cepas aisladas en el suelo de candelilla.*

Cepa Bacteriana	Forma	Elevación	Borde	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto	Superficie	Gram
9	redondo	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
10	redondo	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
11	redondo	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	negativo
12	irregular	aplanada	irregular	opaca	opaca	seca	rugosa	positivo
13	redondo	convexa	entero	opaca	opaca	húmeda	lisa	positivo
14	redondo	levantada del margen	entero	opaca	opaca	húmeda	rugosa	positivo
15	puntiforme	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
16	redondo	convexa	entero	translúcida	brillante	húmeda	lisa	negativo

Cuadro 5. *Morfología colonial de cepas aisladas en bulbo desinfectado de candelilla.*

Cepa Bacteriana	Forma	Elevación	Borde	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto	Superficie	Gram
17	redondo	convexa	irregular	opaca	opaca	húmeda	lisa	positivo
18	irregular	aplanada	irregular	opaca	opaca	seca	rugosa	positivo
19	redondo	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
20	puntiforme	convexa	entero	translúcida	opaca	húmeda	lisa	positivo

Cuadro 6. *Morfología colonial de cepas aisladas en bulbo sin desinfectar de candelilla.*

Cepa Bacteriana	Forma	Elevación	Borde	Luz transmitida	Luz reflejada	Aspecto	Superficie	Gram
21	irregular	convexa	irregular	translúcida	brillante	húmeda	lisa	negativo
22	redondo	convexa	entero	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
23	puntiforme	convexa	irregular	translúcida	opaca	seca	rugosa	negativo
24	redondo	plana	irregular	opaca	brillante	húmeda	lisa	positivo
25	redondo	convexa	entero	translúcida	brillante	húmeda	rugosa	positivo

Como se observa en los cuadros anteriores, la presencia de bacterias se mantuvo igual tanto para rizósfera, suelo y comenzó a disminuir en el aislamiento de bulbo. Esta disminución se debe a que al ser un lugar más limitado y estable a comparación de otras partes de en la planta, cuenta con condiciones y nutrientes específicos de manera que solo bacterias con características particulares puedan desarrollarse ahí (Estrada-González, 2017).

4. 2 Evaluación cualitativa de características PGPR

De las 25 cepas de bacterias que se aislaron, 16 de ellas dieron positivo para la prueba cualitativa de características PGPR. De las cuales, 5 pertenecían al aislamiento de rizósfera, 5 a suelo, 3 a bulbo sin desinfectar y 3 más a bulbo desinfectado.

Para determinar que una bacteria era positiva ante alguna de las características se tomó en cuenta no solo que esta pudiera crecer en el medio, sino que fuera capaz de producir un halo como se muestra en la **Figura 13**, indicando que estas eran capaces de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y potasio, así como producir sideróforos. Una vez terminada la evaluación los datos de las cepas positivas a los medios de Nitrógeno, Fósforo, Potasio y Sideróforos (**Cuadro 7**).

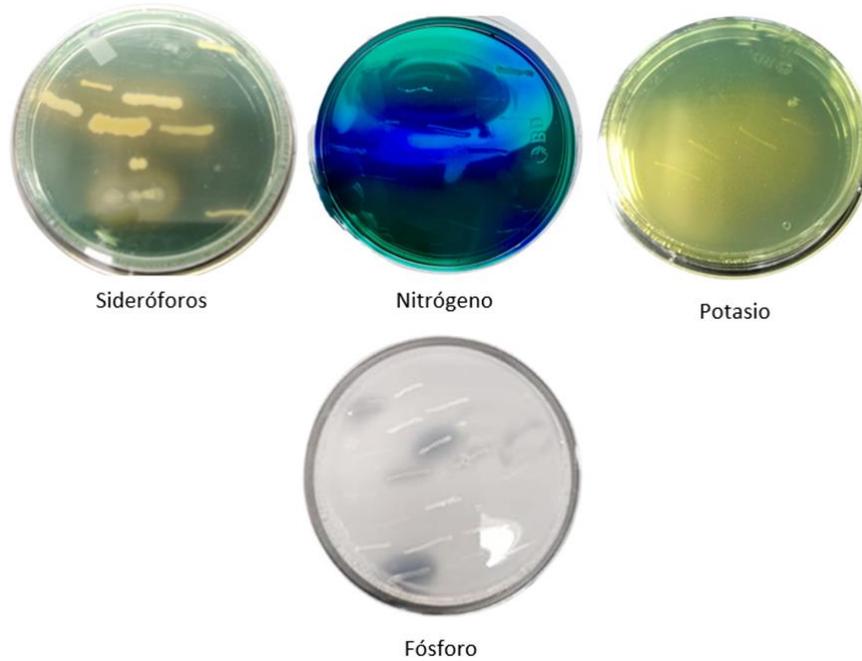


Figura 13. Viraje de color en presencia de halo en medios específicos para la determinación de características PGPR

Cuadro 7. Cepas positivas a la evaluación cualitativa para características PGPR

NITRÓGENO	FÓSFORO	POTASIO	SIDERÓFOROS
3	3	3	3
4	23	4	4
5		5	8
7		8	11
8		12	20
		13	21
		15	22
		16	23
		17	
		19	
		20	
		21	
		22	
		23	

De las cepas evaluadas, se presenta un mayor número de solubilizadoras de potasio ya que 14 cepas dieron positivas para esta característica, y sólo 2 de las cepas dieron positivo a solubilizadoras de fósforo. Por otro lado, para la producción de sideróforos se presentan 8 cepas y 5 más para fijadoras de nitrógeno. También se destaca que la cepa 3 tiene las cuatro características PGPR evaluadas, la cepas 4, 8 y 23 son positivas para tres de las cuatro características evaluadas, mientras que la cepa 20, 21 y 5 son positivas para dos de las características. Finalmente, las cepas 12, 13, 15, 16, 17, 19 y 22 solo para una de las características.

Es de importancia destacar que muchas veces los resultados negativos de las cepas ante este tipo de pruebas no están directamente relacionados a que esta no sea parte del grupo de bacterias PGPR, ya que en muchas ocasiones estas bacterias son capaces de solubilizar compuestos como Potasio y Fósforo, así como fijar nitrógeno y producir sideróforos, pero no de una manera significativa que se pueda ver reflejada en los medios selectivos (Ochoa-Aznárez, 2022).

4. 3 Evaluación cuantitativa de características PGPR

En el **Cuadro 8** se muestra que solo las cepas 3, 4, 5,8, 20, 21 y 23 mostraron una diferencia significativa estadística en la eficiencia de producción en comparación con las otras cepas. De manera que las tres cepas con una mayor eficiencia de producción fueron la cepa 23 es aquella con una eficiencia de producción de 980, seguida de la cepa 21 cuya eficiencia de producción es de 716.67 y por último la cepa 3 con 575.

Cuadro 8. Medio para solubilizadores de potasio

CEPA	DB	DH	ERS	EP
3	5.33 c	36 e	6.75 c	575 c
4	5 c	30 cde	6 c	500 c
5	7.33 d	27.33 cd	3.72 b	272.72 b
8	3 a	18 b	6 c	500 c
12	3 a	3 a	1 a	0 a
13	3 a	3 a	1 a	0 a
15	3 a	4 a	1.33 a	33.33 a
16	3 a	4 a	1.33 a	33.33 a
17	3 a	4 a	1.33 a	33.33 a
19	3.67 ab	4 a	1.09 a	9.09 a
20	4 b	24 bc	6 c	500 c
21	4 b	32.67 de	8.12 d	716.67 d
22	3 a	6 a	2 a	100 a
23	3.33 ab	36 e	10.8 e	980 e

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p>0.05$. Diámetro de la bacteria= DB, Diámetro del Halo= DH, Eficiencia Relativa de Producción= ERP y Eficiencia de producción= EP.

En el caso de solubilizadores de fósforo se obtuvo una diferencia significativa estadística en la eficiencia de producción de las dos cepas, donde la cepa 23 presentó una la mayor eficiencia de producción con 90.91, como se muestra en el **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Medio para solubilizadores de fósforo

CEPA	DB	DH	ERS	EP
3	6.66 a	12.00 a	1.80 a	80.00 b
23	7.33 a	14.00 a	1.91 a	90.91 a

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p>0.05$. Diámetro de la bacteria= DB, Diámetro del Halo= DH, Eficiencia Relativa de Producción= ERP y Eficiencia de producción= EP.

Para la producción de sideróforos solo se mostró una diferencia significativa entre la bacteria 21 y 23 a comparación de las demás. Siendo la cepa 23 la de una mayor eficiencia de producción de 980 como se muestra en el **Cuadro 10**.

Cuadro 10. Medio para productores de sideróforos

CEPA	DB	DH	ERS	EP
3	5.50 ab	29.00 ac	5.32 a	431.62 a
4	5.60 ab	20.40 abc	3.80 a	280.00 a
8	5.50 ab	16.00 ab	3.88 a	287.50 a
11	5.33 ab	12.67 ab	2.37 a	137.30 a
20	4.50 ab	19.00 ab	4.44 a	340.00 a
21	5.33 ab	26.44 ac	5.99 ab	502.78 ab
22	3.00 a	6.00 b	2.00 a	100.00 a
23	3.33 ab	36.00 c	10.80 b	980.00 b

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p > 0.05$. Diámetro de la bacteria= DB, Diámetro del Halo= DH, Eficiencia Relativa de Producción= ERP y Eficiencia de producción= EP.

Las cepas que dieron positivo para fijación de nitrógeno, hubo una diferencia significativa en el caso de la cepa 7 por su baja fijación de nitrógeno, mientras que las otras cepas mantuvieron una fijación de nitrógeno superior a 200, de las cuales las bacterias 8 y 4 se destacaron por la mayor eficiencia de producción con 233.33, seguidas de la cepa 3 con 200 en su eficiencia de producción (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Medio para fijadores de Nitrógeno las letras pegadas

CEPA	DB	DH	ERP	EP
3	6.00 a	18.00 ab	3.00 a	200.00 a
4	6.00 a	20.00 a	3.33 a	233.33 ab
5	6.00 a	18.00 ab	3.00 a	200.00 a
7	6.33 a	14.67 b	2.32 a	131.58 b
8	6.00 a	22.00 a	3.33 a	233.33 ab

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p > 0.05$. Diámetro de la bacteria= DB, Diámetro del Halo= DH, Eficiencia Relativa de Producción= ERP y Eficiencia de producción= EP.

4. 4 Evaluación de los efectos PGPR en la germinación y desarrollo de raíz de *Phaseolus vulgaris*

Para el bioensayo en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se tomaron en cuenta tres aislados, los cuales presentaron las siguientes cualidades: ser positivo a más de una característica PGPR y presentar una alta eficiencia de producción. Por lo cual, se seleccionó la cepa 3, 8 y 23.

Como se observa en la **Figura 14** no se encuentra una diferencia significativa en la inducción de germinación entre las tres cepas, sin embargo, se muestra una diferencia de las cepas ante el control. Siendo las cepas 3 y 23 en aquellas donde el porcentaje de germinación fue igual a 100%.

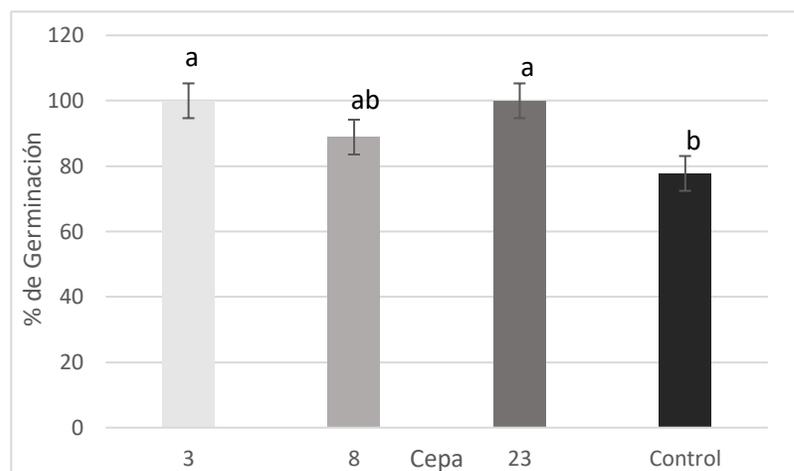


Figura 14. Porcentaje de germinación de cepas y control en semillas de frijol
*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p > 0.05$.

Por otro lado, se pudo observar una diferencia significativa en el desarrollo de raíces primarias y secundarias en cuanto a las cepas y control como se muestra en la **Figura 15**.



Figura 15. Desarrollo de raíz en prueba de germinación de las diferentes cepas y control.

Barra de escala = 1 cm

El porcentaje de germinación puede deberse principalmente a la producción de fitorreguladores como lo son las auxinas, estas son hormonas vegetales que se ha comprobado su eficiencia para promover el desarrollo de la raíz como se muestra en la **Figura 15**, además, juega un papel fundamental en la reducción del tiempo que se requiere para la germinación. Por otra parte, se sugiere que la solubilización de los distintos compuestos de las cepas bacterianas como es el caso de enzimas ayudan a la degradación de la capa que recubre el endospermo de la semilla (Romero-García, 2016).

4. 4. 1 Evaluación de los efectos PGPR en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*

En la **Figura 16** se muestra el desarrollo que la planta de frijol mostró a las 6 semanas al ser inoculada con una cepa bacteriana junto al control, visualmente se logra apreciar mayor desarrollo foliar y un incremento en longitud y raíces secundarias.

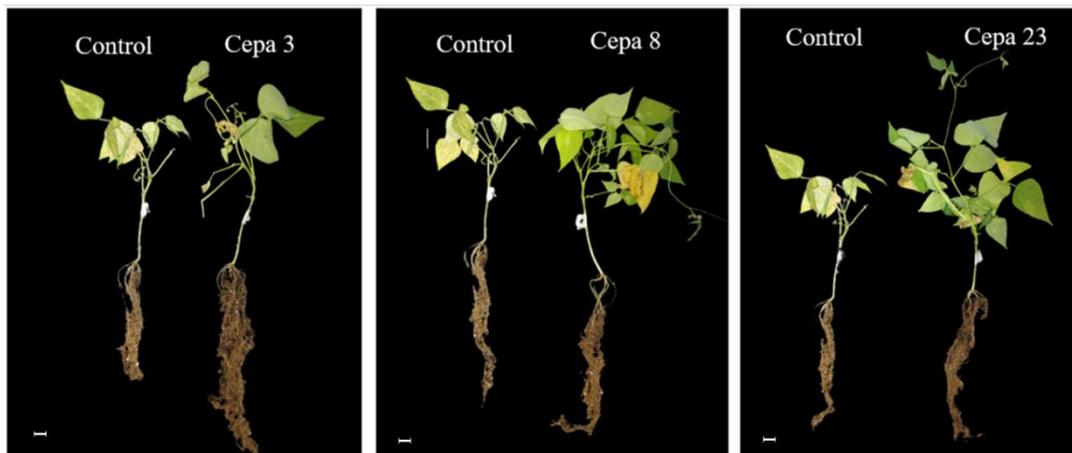


Figura 16. Efecto de la inoculación de las cepas 3, 8 y 23 en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.
Barra de escala= 1 cm

En la cepa 3 se puede apreciar un mayor desarrollo radicular, así como en la cepa 8, lo que coincide con diversas literaturas que señalan que un mayor desarrollo del sistema radicular se ve influenciado principalmente por bacterias aisladas de la rizósfera, estas se encargan de la promoción para formar pelos radicales y raíces secundarias (Layne-G *et al.*, 2008).

Por otro lado, en el **Cuadro 12** se muestran las medidas de las raíces de las plantas de frijol en donde no se muestra una diferencia significativa en cuestión de las plantas inoculadas con el control.

Cuadro 12. Prueba de medias mediante Tukey ($p>0.05$) en raíz de frijol (cm)

CEPA	P1	P2	P3
Control	23.00 a	22.30 a	23.00 A
8	23.86 a	24.43 a	25.33 A
23	24.00 a	25.33 a	22.33 A
3	26.66 a	24.66 a	23.33 a

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p>0.05$, Planta 1= P1, Planta 2= p2 y Planta 3 3= p3.

De acuerdo con la literatura en la planta si bien la raíces primarias ayudan a dar un buen sostén a la misma, la mayor parte de la absorción tanto de agua como de nutrientes se da a través de los pelos radiculares, a su vez estos se encuentran en el área de maduración de las raíces, es decir en la parte superior de la zona de elongación (Canto-Martín *et al.*, 2004), por lo tanto el hecho de que las plantas no presente una diferencia significativa en la longitud de raíz no presenta un resultado negativo.

En cuanto al peso fresco de raíz se encuentra una diferencia significativa entre los tratamientos y el control, así mismo se hace una diferencia entre las plantas inoculadas con las cepas 8 y 23 contra el peso obtenido en la raíz de las plantas inoculadas con la cepa 3 siendo esta la que muestra un mayor peso fresco en raíz, como se muestra en el **Figura 17.**

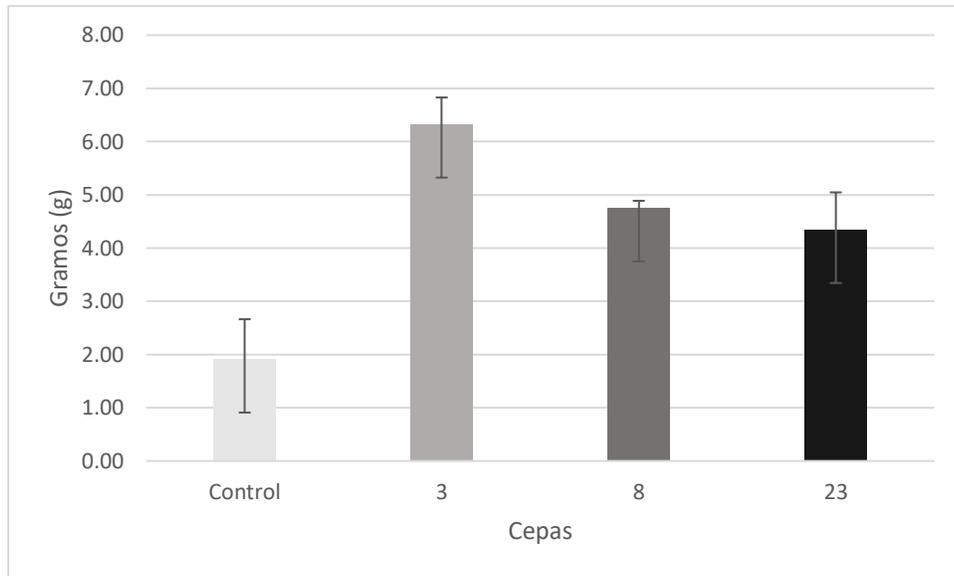


Figura 17. Peso fresco de la raíz de plantas de frijol *Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p > 0.05$.

Por otro lado, los pesos del tallo de frijol muestran una diferencia significativa estadística en cuanto a los pesos de las plantas inoculadas con las cepas 3 y 23 respecto al control, siendo la cepa tres la que muestra un mayor peso en la parte aérea **Figura 18**.

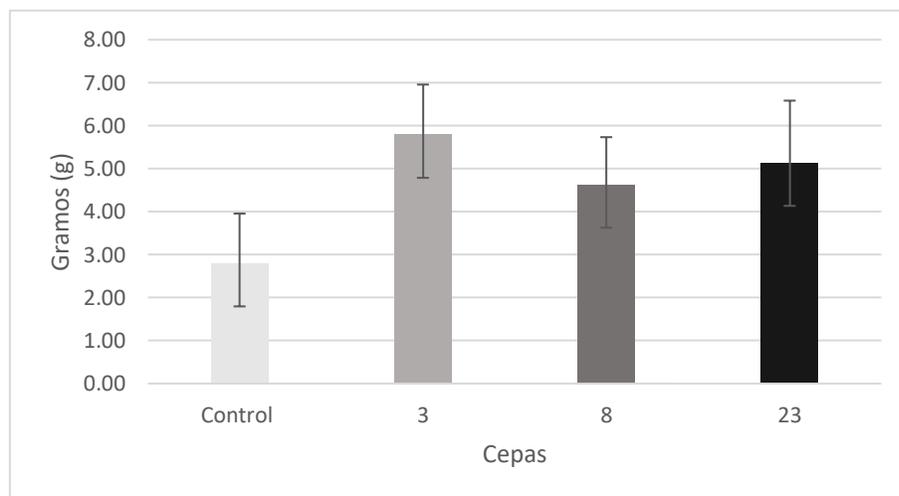


Figura 18. Peso fresco del tallo de plantas de frijol *Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p > 0.05$.

Cuadro 13. Prueba de medias mediante Tukey ($p>0.05$) de Peso seco de frijol (g).

BACTERIA	RA1	RA2	RA3	TA1	TA2	TA3
3	1.21 a	1.47 a	1.18 a	1.00 a	1.14 a	1.52 a
8	1.20 a	1.00 a	0.78 a	0.88 a	1.33 a	0.76 a
23	1.06 a	1.49 a	1.39 a	1.12 a	1.73 a	1.10 a
Control	0.09 b	0.27 b	0.19 b	0.1 b	0.09 b	0.44 b

*Las letras iguales significan que no hay significancia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a $p>0.05$, peso seco de raíz 1-3 = RA1-RA3 y peso seco tallo 1-3 = TA1-TA3.

En el **Cuadro 13** se muestra una diferencia significativa entre los pesos secos de las raíces y tallos de las plantas inoculadas con las tres cepas bacterianas en contraste con el control, sin embargo, no se demostró ninguna diferencia significativa entre los pesos secos de las tres cepas bacterianas.

De acuerdo a Laynez G (2008) el aumento en el peso seco significa una promoción evidente de crecimiento que las plantas llegan a tener, a su vez este crecimiento se ve influenciado por los distintos mecanismos de las bacterias PGPR donde a través de la síntesis de metabolitos, como es el caso de los fitorreguladores le permite el desarrollo de raíces secundarias y pelos radicales que en consecuencia trae consigo una mayor captación de nutrientes. Por otro lado, la síntesis de sideróforos, solubilización de minerales y fijación de nitrógeno ayudan a un mejor desarrollo de la parte foliar de las plantas.

De manera que es deducible que hubo una interacción positiva por parte de los inóculos bacterianos que permitieron no solo el desarrollo de raíces sino de la parte foliar de las plantas incrementando significativamente el peso seco entre aquellas que fueron inoculadas y el control.

IV. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió demostrar que la planta candelilla cuenta con diversos microorganismos que se distribuyen en las áreas de rizósfera, suelo y bulbo con características de promoción vegetal que pueden ser aplicados a diversos cultivos comerciales. Se aislaron 25 cepas bacterianas de las cuales; 8 pertenecen a rizósfera, 8 a suelo, 5 a bulbo desinfectado y 5 más de bulbo desinfectado. De estas, dieron positivas en al menos una de las siguientes características de promoción vegetal (PGPR): producción de sideróforos, solubilizadores de potasio o fosforo y fijación de nitrógeno. Se seleccionaron tres que mostraron ser positivas a más de una característica PGPR y que tuvieron una alta eficiencia de producción, por lo cual se seleccionaron las cepas 3, 8 y 23 para evaluar su efecto en la germinación y crecimiento de frijol *Phaseolus vulgaris*. Con las cepas 3 y 23 se obtuvo un 100% de germinación. En el caso de la longitud de raíz no se obtuvo una diferencia significativa entre cepas, sin embargo, en el peso fresco de raíz la cepa 3 tuvo una diferencia significativa a comparación de las otras dos cepas y el control. Finalmente, en la evaluación de peso fresco de tallo no se mostraron diferencias estadísticas entre las cepas evaluadas.

VI. LITERATURA CITADA

Alanís-Flores, G. J., & Foroughbakhch, R. (2008). Antiguos grupos étnicos del norte de Nuevo León. CIENCIA UANL, XI.

Ali, A. H., Abdelrahman, M., Radwan, U., El-Zayat, S., & El-Sayed, M. A. (2018). Effect of *Thermomyces* fungal endophyte isolated from extreme hot desert-adapted plant on heat stress tolerance of cucumber. *Applied Soil Ecology*, 124, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.11.004>

Álvarez, M. del M., Ceballos, V., & López, F. R. (2016.). Preliminares en el aislamiento de microorganismos solubilizadores de Fósforo en el suelo del Jardín Botánico de una Universidad Libe, Pereira.

Avila-Rebollar, F. (2007). La candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) en el norte de Zacatecas.

Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. O. (2021). Reclamation of arid and semi-arid soils: The role of plant growth-promoting archaea and bacteria. In *Current Plant Biology* (Vol. 25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100173>

Bañuelos-Revilla, J. E., Palacio-Núñez, J., Martínez-Montoya, J. F., Olmos-Oropeza, G., & Flores-Cano, J. A. (2019). Potential distribution and abundance of candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) in northern Zacatecas, Mexico. *Madera Bosques*, 25(1). <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511657>

Benjumeda-Muñoz, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones*.

Berrum-Aguilar, D. (2021). Caracterización fisicoquímica y funcional de la planta de candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc) en diferentes localidades.

Camila, M., Álvarez, I., Correa Álvarez, J., Genética, E., Coasesora, B., García, G., Estudiante, G., & Biotecnología, M. (2019). Diversidad y predicción del potencial funcional de las comunidades bacterianas asociadas a vitroplantas de banano cv. Williams.

Canales, E., & Canales Martínez. (2006). La Candelilla. *Biodiversitas*, 69, 1–5.

Canto-Martín, J. C., Medina- Peralta, S., Morales-Avileno, D., & A. (2004). Efecto de la inoculación con *Azospirillum* sp. en plantas de Chile habanero. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4, 21–27. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93940104>

Cean, S. (2021). Inoculación con *Rhizobium phaseoli* en tres genotipos de *Phaseolus vulgaris* L. Bajp dos densidades de población.

Correa- S, O. (2013). Los microorganismos del suelo y su rol indiscutido en la nutrición vegetal. <https://www.researchgate.net/publication/306960003>

Dighton, J., & Krumins, J. A. (2014). Biodiversity, Community and Ecosystems Interactions in Soil: Promoting Plant Growth. <http://www.springer.com/series/10166>

Estrada-Gonzales, Á. (2017). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L.

FAO. (2019). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. (s. f.). <https://www.fao.org/3/y3557s/y3557s09.htm>

FAO. (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050.

Fernández-Pascual, M., de María, N., & Rosario-De Felipe, M. (2002). Fijación biológica de nitrógeno factores limitantes. Ciencia y Medio Ambiente.

Flores Del Ángel. (2013). Situación actual de las poblaciones de candelilla.

Foroughbakhch, R., & Alvarado-Vázquez, M. A. (2013). Wood properties of native species from Northern Mexico View project Manejo Integral Recursos Naturales UANL View project. <https://www.researchgate.net/publication/317537143>

García, S. C. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. In CT (Vol. 3).

González Mancilla, A., Almaraz Suárez, J. J., Ferrera Cerrato, R., Rodríguez Guzmán, M. del P., Taboada Gaytán, O. R., Trinidad Santos, A., Alarcón, A., & Arteaga Garibay, R. I. (2017). Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile poblano (*Capsicum annuum* L.). Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 33(3), 463–474. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.09>

Granado-Sánchez, D., Sánchez-González, A., & Granados-Victorino, L. R. (2011). Ecología de la vegetación del desierto Chihuahuense. Chapingo Serie Forestales y Del Ambiente, XVII, 111–130.

Granda- Mora, Caridad, M., García, N., Rolando, Á., Carrión, R., Alvarado-Capó, Y., Torres Gutiérrez, R., Alvarado, J., La, / N, Loja, A., & Letra, C. (2016). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* cv. Mantequilla a la inoculación de cepas de *Rhizobium* nativas de Ecuador en casas de cultivo. Centro Agrícola, 43(4), 49–56.

Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. Journal of Advanced Research, 8(6), 687–695. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.09.001>

Jorge, A., & Aguirre, J. (2020). Manejo, aprovechamiento e innovación para la producción de cera de candelilla.

Klever, G.-M., Salomé, A.-A., Yadira, C.-R., Salas Yessenia, L., Rigaud Ximena, J., Ángel, R.-C., & Narcisa, U.-G. (2020). Caracterización morfológica y fisiológica de

microorganismos rizosféricos nativos de sistemas agroforestales de café. In Bosques Latitud Cero (Vol. 10, Issue 2).

Layne, J. A. (2008). Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a rizobacterias promotoras del crecimiento y resistencia inducida a *Xanthomonas campestris* Response of *Phaseolus vulgaris* to growth promoting rhizobacteria and induced resistance to *Xanthomonas campestris* (Vol. 20).

Leonardo, A. (2013). Bacterias endófitas: un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario Endophytic bacteria: a new field of research for development of agricultural sector. In Rev. Colombiana cienc. Anim (Vol. 5, Issue 2).

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. In Annual Review of Microbiology (Vol. 63, pp. 541–556). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Martínez-Martínez, E., Aguilar-Castillo, R., Brajcich-Gallegos, P., Cruz Vázquez, A., & Salinas-González, H. (2013). Ecología y usos de especies forestales de interés comercial de las zonas áridas de México.

Mau, S., Vega, K., & Araya, M. (2011b). Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales. Revista de Ciencias Ambientales, 42(2), 45. <https://doi.org/10.15359/rca.42-2.4>

Mayocotte-de la Peña, M., Robles-Parra, J. M., & Tafolla-Arellano, J. C. (2021). Prácticas para un desarrollo local sustentable. Agraria, 18.

Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. In Revista UDO Agrícola (Vol. 4, Issue 1).

Montserrat, Y., Díaz, R., Guzmán Moreno, J., María, R., Santoyo, R., Reveles Hernández, R. G., Elena, L., & Rodríguez, V. (2020). Aislamiento e identificación morfológica y molecular de hongos asociados a plantas de zanahoria enfermas (Vol. 14, Issue 2).

Moreno Resendez, A., Hernández-Herrera, J. A., Valenzuela-Núñez, L. M., & Martínez-Salvador, M. (2019). Modelación de la presencia de *Euphorbia antisyphilitica* Zucc mediante propiedades físicas y químicas del suelo. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 6(18). <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.1910>

NORMA Oficial Mexicana. (n.d.).

Ochoa, Y., Pedro, A., Montori, M., Blanco, D., Eva, P., & Calvo, T. (2022). Estudio de la función de las bacterias PGPR en el desarrollo de la trufa.

Ochoa-Reyes, E., Saucedo-Pompa, S., de La Garza, H., Martínez, D. G., Rodríguez, R., & Noé Aguilar-Gonzalez, C. (2010). Extracción tradicional de cera de *Euphorbia antisyphilitica*. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM>

Palacio-Rodríguez, R., Ramos, B. P., & Sáenz-Mata, J. (2016a). Germination experiment of semi-arid environment native species seeds under climate change conditions View project. <https://www.researchgate.net/publication/349043748>

Palacio-Rodríguez, R., Ramos, B. P., & Sáenz-Mata, J. (2016b). Germination experiment of semi-arid environment native species seeds under climate change conditions View project. <https://www.researchgate.net/publication/349043748>

Palma-Terán, A. (2022). Microorganismos solubilizadores de fósforo (P) y potasio (K) como alternativa biotecnológica para una agricultura sustentable.

Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., & Lebsky, V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(5), 629–642. <https://doi.org/10.1055/s-2004-821100>

Quiroz Rudas, M. A. (2021). Introducción de bacterias rizosféricas en la agricultura para la reducción de fertilizantes químicos.

Rodríguez Hernández, M. (2012). Inducción del desarrollo vegetal de *Euphorbia antisyphilitica* Mediante *Bacillus* sp.

Rojas Molina, R., Saucedo Pompa, S., de León Zapata, M. A., Jasso Cantú, D., & Aguilar, N. (2011). Ensayo pasado, presente y futuro de la candelilla Essay past, present and future of candelilla.

Romero-García, V., García-Ortiz, V., Hernández-Escareño, J., & Sánchez-Yáñez, J. (2016). *Phaseolus vulgaris* response to plant growth promoting microorganisms. *Scientia Agropecuaria*, 7, 313–319. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.20>

Rzedowski Rotter, J. (2021). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) Autoridad Científica CITES de México Manual de procedimientos para emitir consideraciones técnicas por especie para la formulación de Dictámenes de Extracción No Perjudicial (NDF): Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*).

Salazar-Ramírez, M. T., Sáenz-Mata, J., Preciado-Rangel, P., Fortis-Hernández, M., Rueda-Puente, E. O., Yescas-Coronado, P., & Orozco-Vidal, J. A. (2021c). Plant growth-promoting rhizobacteria associated to candelilla rhizosphere (*Euphorbia antisyphilitica*) and its effects on *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(2), 1–17. <https://doi.org/10.15835/nbha49212294>

Samaniego-Vivanco, T. D. (2018). Determinación de la capacidad de solubilización de Potasio por *Bacillus mucilaginosus*.

Santoyo, G., Valencia-Cantero, E., & Orozco-Mosqueda, Ma. del C. (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens*. *Terra Latinoam.*

Sarabia, M., & Orozco Hernandez, M. (2015). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones.

Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A. F., Saenz-Galindo, A., Garza, H. de la, Jasso-Cantú, D., & Aguilar, C. N. (2009). Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42(4), 511–515. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.017>

Sifuentes-Rincón, A., & Pacheco-Contreras, V. (2018). Aislamiento e identificación molecular de microorganismos asociados con el fruto del Tempesquistle (*Sideroxylon palmeri*) (Vol. 6, Issue 31). www.riiit.com.mx

Tajera-Hernández, B. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos. *Agronomía Mesoamericana*, 24, 357–364.

Toribio-Ferrer, E. (2021). Regeneración Natural de candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.) en seis intensidades de corta bajo diferentes condiciones climáticas.

Ulibarry, P. G. (2019). Consecuencias ambientales de la aplicación de fertilizantes Autor Resumen. <http://bcn.cl/28ziq>

Ulloa, J. A., Rosas-Ulloa, P., Ramírez-Ramírez, C., & Ulloa-Rangel, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*), su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos.

Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Rhizospheric bacteria with potential benefits in agriculture. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 343–355. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>

Velázquez-Gurrola, A., & Ramos-Alegría, M. P. (2015a). Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas.

Velázquez-Gurrola, A., & Ramos-Alegría, M. P. (2015b). Beneficios de microorganismos solubilizadores de P y K en la recuperación y mantenimiento de suelos agrícolas.

Velía, A., Garay, A., Alberto, J., Gallegos, A., & Muro, L. R. (2021). El cultivo del frijol presente y futuro para México.

Villa-Castorena, M., Catalán-Valencia, E. A., Inzunza-Ibarra, M. A., González-López, M. de L., & Arreola-Ávila, J. G. (2010). Production of candelilla seedlings (*Euphorbia antisiphylitica* Zucc.) by cuttings. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, XVI(1), 37–47. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2009.07.027>

Villavicencio-Gutiérrez, E. E., Cano-Pineda, A., Castillo-Quiroz, D., Hernández-Ramos, A., & Martínez-Burciaga, O. U. (2021). Sustainable forest management of non-wood resources in the semi-desert of northern Mexico. In *Revista Mexicana de Ciencias*

Forestales (pp. 31–63). National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12iEspecial-1.1083>