



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
EDAFOLOGÍA

MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE *Euphorbia cyathophora* Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL BENÉFICO EN LA PRODUCCIÓN DE *E. pulcherrima*

MARÍA DE LOS ANGELES RODRÍGUEZ ELIZALDE

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO DE MEXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe MARÍA DE LOS ANGELES RODRÍGUEZ ELIZALDE, Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor ALEJANDRO ALARCÓN, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE *EUPHORBIA CYATHOPHORA* Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL BENÉFICO EN LA PRODUCCIÓN DE *E. PULCHERRIMA* y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 9 de abril de 2018



Firma de la
Alumna



Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Microorganismos rizosféricos de *Euphorbia cyathophora* y evaluación de su potencial benéfico en la producción de *E. pulcherrima***, realizada por la alumna: **María de los Angeles Rodríguez Elizalde** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 DR. ALEJANDRO ALARCÓN
ASESOR	 DR. RONALD FERRERA CERRATO
ASESOR	 DR. JUAN JOSÉ ALMARÁZ SUÁREZ
ASESOR	 DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS
ASESOR	 DR. RAMÓN IGNACIO ARTEGA GARIBAY

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2018.

MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS DE *Euphorbia cyathophora* Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL BENÉFICO EN LA PRODUCCIÓN DE *E.* *pulcherrima*

María de los Ángeles Rodríguez Elizalde (D. en C.)
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La riqueza florística de México incluye diversas especies de diferentes familias taxonómicas. Sin embargo, la falta de políticas y programas nacionales para conservar y mejorar genéticamente el material vegetal, ha propiciado que investigadores extranjeros desarrollen nuevas variedades y patentes a partir de especies silvestres nativas. La presente investigación utilizó a *Euphorbia cyathophora* (especie silvestre con potencial ornamental considerada como prioritaria de conservación por la Red de Euphorbias), para evaluar su propagación *ex situ*, y estudiar sus microorganismos rizosféricos con potencial biotecnológico para la producción de nochebuena. El capítulo I evaluó la germinación de semillas y emergencia de plántulas de *E. cyathophora*, y la influencia del efecto de luz en combinación con reguladores de crecimiento en el desarrollo de explantes (embriones). Las semillas presentaron baja germinación por la posible presencia de inhibidores. Las condiciones de luminosidad generaron un sistema radical más desarrollado con aparición temprana de raíces terciarias. La interacción de reguladores y condiciones de luz [luminosidad continua (CL) o estímulo de oscuridad-luminosidad (CL)] generó mayor número de brotes. La condición OL estimuló mayor número y longitud de raíces, respuesta morfológica (formación de callo), y desarrollo de explantes. Lo anterior, permitió generar un protocolo para obtener plantas *ex situ*. El capítulo II, evaluó la presencia hongos filamentosos, bacterias, actinobacterias, y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la rizosfera de *E. cyathophora*. Los géneros representativos de HMA fueron *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora*, y las especies *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* y *Septoglomus* aff. *constrictum*; mientras que los grupos bacterianos predominantes fueron *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, entre otras. El capítulo III evaluó el potencial de bacterias seleccionadas para su posible uso en la horticultura ornamental, al inocular tres cepas (*Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Enterobacter* sp. CPO 2.5, y *Bacillus megaterium* CPO 2.35) aisladas de *E. cyathophora* en el crecimiento vegetativo y reproductivo de *E. pulcherrima* var. Prestige Red. La inoculación bacteriana y la adición de 50% de fertilizante (Ultrasol® Multipropósito 18-18-18) promovió el crecimiento de las plantas durante su fase vegetativa y reproductiva, al incrementar el área foliar, el peso seco de hojas y total, el contenido relativo de clorofila (unidades SPAD), y la amplitud de las plantas, y la coloración de brácteas. La presente investigación es pionera en el estudio de *E. cyathophora*; además, demostró que la inoculación de rizobacterias seleccionadas por su efecto biofertilizante, mejora el crecimiento y la producción de plantas de nochebuena, y reduce la aplicación de fertilización (50% menos), vislumbrando así, su aplicación exitosa en la horticultura ornamental.

Palabras clave: propagación asexual, rizobacterias, micorriza arbuscular, Euphorbiaceae, nochebuena.

**RHIZOSPHERE MICROORGANISMS FROM *Euphorbia cyathophora* AND
EVALUATION OF THEIR POTENTIAL BENEFITS ON THE PRODUCTION OF
*E. pulcherrima***

María de los Ángeles Rodríguez Elizalde (Dr.)
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The floristic richness of Mexico includes diverse species of different taxonomic families. However, the lack of national policies and programs to conserve and to genetically improve plant materials has led foreign researchers to develop new varieties and patents from native wild species. This research utilized *Euphorbia cyathophora* (wild native plant species classified as with ornamental potential, and considered as a priority conservation species by the Euphorbias Network), to evaluate its *ex situ* propagation and to study rhizosphere microorganisms with biotechnological potential for poinsettia production. Chapter I evaluated the seed germination and seedling emergence of *E. cyathophora*, and the influence of light conditions in combination with plant growth regulators on the growth of explants (embryos). Seeds showed low germination due to the presence of inhibitors. Light conditions improved the development of more profuse root system and early formation of tertiary roots.

The interaction of plant growth regulators and light conditions [continuous luminosity (CL) or dark-light stimulus (CL)] resulted in high number of shoots. The OL condition stimulated great number and length of roots, morphogenic response (callus formation), and explant development. The later allowed the generation of a protocol for obtaining plants *ex situ*. Chapter II evaluated the presence of filamentous fungi, bacteria, actinobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the rhizosphere of *E. cyathophora*. Predominant AMF genera were *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* and *Gigaspora*, and the species *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* and *Septoglomus* aff. *constrictum*; whereas the predominant bacterial genera were *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, among others. Chapter III evaluated the potential utilization of selected bacteria for ornamental horticulture by inoculating three strains (*Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Enterobacter* sp. CPO 2.5, and *Bacillus megaterium* CPO 2.35) isolated from *E. cyathophora*, on the vegetative and reproductive growth of *E. pulcherrima* var. Prestige Red. Bacterial inoculation and the application of 50% of chemical fertilizer (Ultrasol® Multipurpose 18-18-18) enhanced plant growth during vegetative and reproductive stages, by stimulating the leaf area, the leaf and total dry weight, the relative content of chlorophyll (SPAD units), and the plant amplitude and bract color. The present research is pioneer on studying *E. cyathophora*; in addition, the inoculation of selected bacteria as biofertilizers, improved the growth and production of poinsettia plants, and reduced the fertilizer application (50% less), which pointed out the potential application of beneficial microorganisms in ornamental horticulture.

Key words: asexual propagation, rhizobacteria, arbuscular mycorrhiza, Euphorbiaceae, poinsettia.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el apoyo económico otorgado para mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo porque en sus aulas obtuve el conocimiento para la planeación y conducción de este trabajo y porque dentro de sus laboratorios e invernaderos lo pude desarrollar exitosamente.

A la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad de seguir preparándome académicamente, siempre en beneficio de ser una institución de prestigio. En especial a mis compañeros de academia M.C. José Mejía Muñoz y M.C. Amando Espinosa.

Al personal del Área de Microbiología, de la Especialidad de Edafología, Campus Montecillo por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Especialmente a la M.C. Encarnación Lara, Sr. Manuel Solano y Srita. María del Rosario Galicia.

Al Dr. Alejandro Alarcón por su gran capacidad, dedicación, conducción y apoyo en la realización de la presente tesis. Además por su amistad y confianza.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por brindarme la oportunidad de realizar un proyecto con una planta nativa con potencial ornamental y por sus grandes aportaciones al presente trabajo. ¡Gracias por sus consejos!

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez por su disponibilidad y valiosas contribuciones. Así como el apoyo técnico en las diferentes metodologías y por las muchas veces que me asesoró. Gracias por su amistad.

Al Dr. Oscar García Barradas por el apoyo brindado, sus sugerencias y comentarios en la conducción de la tesis.

Al Dr. Ramón I. Arteaga Garibay por sus contribuciones a la presente investigación.

A la Dra. Rosa María Romero López por su gran tenacidad y capacidad para revisar esta investigación. Por sus valiosas sugerencias y por compartir tan bellos mensajes.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por la asesoría estadística y por su invaluable tiempo.

A la Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza por las facilidades otorgadas para el uso del invernadero. Gracias por sus consejos y amistad.

A la Dra. Hilda Silva Rojas por las asesorías en el análisis molecular, su disponibilidad y por la amable atención que siempre tuvo conmigo.

A la M.C. Cecilia García Osorio por la fina atención y facilidades brindadas para analizar las muestras en su laboratorio.

A la Dra. Rosalba Esquivel Cote por apoyarme al establecimiento de nuevas metodologías y por lo momentos tan gratos que pasamos. Es un honor ser su amiga.

A la M.C. Aracely Gaytán Acuña. Le agradezco por alentarme en esta aventura, sus consejos y la disponibilidad en escucharme siempre.

A la Ing. Elizabeth Ventura e Ing. A. Antonio Rodríguez por el apoyo técnico en los muestreos de *E. cyathophora*.

A todos mis profesores que contribuyeron en mi formación académica en especial a la **Dra. Lourdes Arévalo, Dra. Teresa Colinas, Dra. Nieves Rodríguez, M.C. Jorge Alvarado, Dr. Gregorio Ostoia, Dra. Alejandra Gutiérrez, Dr. Juan José Almaraz, Dr. Ronald Ferrera, Dr. Julián Delgadillo, Dr. Vicente Espinosa y Dr. José Luis García.**

A la Dra. Vivian Loges por el apoyo que recibí durante mi estancia académica, la calidez humana y los consejos hacia este trabajo.

A todos mis compañeros con los que compartí 4 años maravillosos de estudios.

A los amigos que conocí durante mi estancia en los diferentes laboratorios, aulas e invernaderos.

A aquellos a quien omito, gracias.

DEDICATORIA

A Dios por la vida, la salud y la fortaleza que me brinda día a día para seguir mis metas; por las bendiciones recibidas y por poder planear y lograr todos mis sueños.

A mis abuelos, Antonio Rodríguez y Amparo Muñoz López quienes contribuyeron a mi educación con amor y cariño. Los extraño mucho...

A mis padres, Miguel Angel Rodríguez Muñoz y Beatriz Elizalde Cuevas, ambos son pilares en mi formación académica. Gracias por el cariño y por conducirme en la vida.

A mis hermanos, Saide, Samantha y Antonio gracias por apoyarme siempre.

A mi grande y pequeña familia; cada uno aportó elementos para ser lo que soy ahora.

A mi compañero de vida, M.C. Patricio Sánchez Guzmán porque sin tu apoyo no podría haber logrado este objetivo, gracias por la paciencia, amor y dedicación hacia nuestra familia.

A Andy y Julio Elí, para que sea aliciente en su futura vida académica.

A todos aquellos que creyeron en mí.....

María de los Angeles

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xxi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares	3
Hipótesis general.....	4
Hipótesis específicas	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
La familia Euphorbiaceae.....	5
Distribución de las Euphorbias	5
Distribución de <i>Euphorbia cyathophora</i>	6
Descripción de <i>Euphorbia cyathophora</i>	7
Usos de <i>Euphorbia cyathophora</i>	8
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Klotzsch.....	10
Metabolitos asociados al látex	11
Fundamentos e importancia de la técnica del cultivo <i>in vitro</i>	17
Medios de cultivo	18
Reguladores de crecimiento vegetal.....	20
Las auxinas.....	20
Aplicación de auxinas en el cultivo de tejidos	21
Las citocininas.....	21
Relación auxinas-citocininas en las plantas	22
La rizosfera	22
Rizobacterias.....	24
Hongos micorrízicos arbusculares (HMA).....	28
Uso de microorganismos en la agricultura.....	30

Discusión general de la revisión de la literatura, y justificación de la investigación	32
CAPÍTULO I. MICROPROPAGACIÓN DE <i>Euphorbia cyathophora</i> Murray:	
UNA ESPECIE CON POTENCIAL ORNAMENTAL	34
1.1 RESUMEN	34
1.2 ABSTRACT	35
1.3 INTRODUCCIÓN	36
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	37
1.4.1 Obtención de material vegetal	37
1.4.2 Establecimiento, condiciones y variables para los experimentos 1 y 2	38
1.4.3 Establecimiento, condiciones y variables evaluadas para el experimento 3	38
1.4.4 Establecimiento, condiciones, tratamientos y variables para el experimento 4	39
1.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico	39
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1.5.1 Porcentaje de germinación en sustrato y medio de cultivo	41
1.5.2 Porcentaje de germinación bajo condiciones de luz	42
1.5.3 Crecimiento de plantas en condiciones de luz (CL) y oscuridad (OL)	43
1.5.4 Crecimiento <i>in vitro</i> de explantes (Experimento 4)	45
1.5.5 Expresión morfológica de los explantes	49
1.5.6 Desarrollo de callogénesis	51
1.6 CONCLUSIONES	53
CAPÍTULO II. MICROORGANISMOS CULTIVABLES CON POTENCIAL BENÉFICO AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE <i>Euphorbia cyathophora</i> Murray	55
2.1 RESUMEN	55
2.2 ABSTRACT	56
2.3 INTRODUCCIÓN	57
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	59
2.4.1 Descripción de los sitios de muestreo	59

2.4.2 Muestreo del suelo rizosférico	61
2.4.3 Aislamiento de microorganismos en medios específicos	61
2.4.4 Determinación de índoles.....	61
2.4.5 Determinación de rizobacterias solubilizadoras de fósforo.....	62
2.4.6 Determinación de rizobacterias fijadoras de nitrógeno.....	62
2.4.7 Identificación molecular de las cepas de rizobacterias	63
2.4.8. Construcción de árboles filogenéticos.....	64
2.4.9. Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos (HMA)	64
2.4.10 Análisis estadísticos	65
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
2.5.1 Población de microorganismos de la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i> ..	66
2.5.2 Aislamiento de cepas de rizobacterias productoras de ácido indolacético de <i>Euphorbia cyathophora</i>	68
2.5.3 Cuantificación de ácido indolacético producido por rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	69
2.5.4 Aislamiento de rizobacterias solubilizadoras de fosfato de <i>Euphorbia cyathophora</i>	71
2.5.5 Cuantificación de la solubilización de fosfatos por rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	73
2.5.6 Rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i> ...	77
2.5.7 Estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa en rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	79
2.5.8 Filogenia de las rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	81
2.5.9 Determinación del porcentaje de colonización y descripción de géneros y especies de hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i>	86
2.6 CONCLUSIONES	99
CAPÍTULO III. EFECTIVIDAD DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA PRODUCCIÓN DE <i>Euphorbia pulcherrima</i>.....	101
3.1 RESUMEN	101

3.2 ABSTRACT	102
3.3 INTRODUCCIÓN	103
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.4.1 Ubicación del experimento.....	105
3.4.2 Material vegetal	105
2.4.3 Sustrato y contenedores	105
3.4.4 Trasplante	105
3.4.5 Preparación del inóculo bacteriano	105
3.4.6 Inoculación y reinoculación	106
3.4.7 Manejo de riego, fertilización, podas, manejo de plagas, y fotoperiodo.....	107
3.4.8 Variables evaluadas.....	108
3.4.9 Análisis químico del sustrato y análisis nutrimental en hojas.....	109
3.4.10 Diseño experimental y análisis estadísticos	110
3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
3.5.1 Fase vegetativa	111
3.5.2 Fase reproductiva	121
3.6 CONCLUSIONES	140
DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES FINALES	141
LITERATURA CITADA.....	145
ANEXOS	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Euphorbia cyathophora</i> en la República Mexicana (Yang <i>et al.</i> , 2012; Steinmann, 2012; Rolim <i>et al.</i> , 2015).....	6
Figura 2. Inflorescencias y brácteas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	8
Figura 3. Cápsula (A) y semillas (B) de <i>Euphorbia cyathophora</i>	8
Figura 4. Dimorfismo en brácteas y hojas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	9
Figura 5. Variedades de sol registradas en México (A = Orejona, B = Juan Pablo, C = Valsu, D = Belén, E = Valenciana, F = Corona, G = Rehilete, H =Tete, I = Amanecer Navideño (Adaptado de Red de Euphorbias).....	10
Figura 6. Nochebuena var. Prestige Red (Catálogo Floraplant 2016-2017).	11
Figura 7. Síntesis de los principales metabolitos secundarios derivados de metabolitos primarios (Adaptado de Ramawat, 2007).....	12
Figura 8. Estructura de componentes fenológicos y polifenoles (Adaptado de Crozier <i>et al.</i> , 2008).....	13
Figura 9. Sección de la raíz mostrando la ectorrizosfera y la endorrizosfera (Adaptado de Fageria y Moreira, 2011).	23
Figura 10. Mecanismos de solubilización de fósforo (P) por RPCV (Adaptado de Ahemad y Kibret, 2014).	25
Figura 11. Vías de absorción de nutrientes en raíces no micorrizadas y micorrizadas (Adaptado de Teotia <i>et al.</i> , 2017).....	28

CAPÍTULO I

Figura 1.1. Mapa de localización de los sitios de colecta de material vegetal y suelo rizosférico de <i>Euphorbia cyathophora</i>	37
Figura 1.2. Eliminación de la testa de semillas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	38
Figura 1.3. Germinación de semillas de <i>Euphorbia cyathophora</i> en sustrato (A) a los 45 días después de la siembra, y en medio de cultivo (B) a los 15 días después de la siembra.	41
Figura 1.4. Embriones en luz (A) y oscuridad (B) a los 7 días después de la siembra en MS sin reguladores de crecimiento.....	42
Figura 1.5. Número de raíces (A) y longitud de raíces (B) de <i>Euphorbia cyathophora</i> en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL), durante 48	

días. Medias \pm error estándar. Análisis estadísticos individuales por fecha y los asteriscos muestran significancia entre tratamientos de condiciones de luz (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 7.	45
Figura 1.6. Número de brotes (A) y longitud de brotes (B) de <i>Euphorbia cyathophora</i> en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) obtenidos únicamente en el tratamiento con 1.0 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ ANA, durante 70 días. Letras distintas muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$), Medias \pm error estándar, n = 18.....	46
Figura 1.7. Brotes de <i>E. cyathophora</i> crecidas en medio MS enriquecido con 1.0 mg L ⁻¹ BAP en condiciones de luz (A) y, oscuridad (B), a los 90 días después de la siembra.....	46
Figura 1.8. Formación de callo (expresión morfológica) en el tratamiento con 0.1 mg L ⁻¹ BAP en condiciones de luz (A) y oscuridad (B) a 90 días después de la siembra.....	49
Figura 1.9. Expresión morfológica de <i>Euphorbia cyathophora</i> en función de la aplicación de reguladores de crecimiento, condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) en cuatro fechas de muestreo. Simbología: BAP = benzilaminopurina, KIN = kinetina, 2iP = 2-isopenteniladenina y TDZ = thidiazuron. Análisis individuales por cada fecha; los asteriscos denotan significancia entre tratamientos de condiciones de luz (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 18.	50
CAPÍTULO II	
Figura 2.1. Aspecto general del Sitio Pedrera, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.....	59
Figura 2.2. Aspecto general del Sitio Troncones, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.....	60
Figura 2.3. Aspecto general del Sitio Mariposas, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.....	60
Figura 2.4. Capacidad de solubilización de fosfatos por rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i> . Simbología: a = Sitio Pedrera, b = Sitio Troncones, c = Sitio Mariposas. Medias + error estándar. Comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$), n = 4.	76

Figura 2.5. Estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa en bacterias diazotróficas aisladas de la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i> . Medias + error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 4.	80
Figura 2.6. Árbol filogenético de las rizobacterias productoras de índoles aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i> . En negritas se encuentran las 24 rizobacterias aisladas en esta investigación.	83
Figura 2.7. Árbol filogenético de las rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i> . En negritas se encuentran las 21 rizobacterias aisladas en esta investigación.	84
Figura 2.8. Árbol filogenético de las rizobacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i> . En negritas se encuentran las 32 rizobacterias aisladas en esta investigación.	85
Figura 2.9. <i>Glomus</i> sp 1. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared con tres capas (L1, L2, L3), hifa (H) de sostén con residuos de materia orgánica (20x). Escala 30 μm	87
Figura 2.10. <i>Glomus</i> sp 2. A) Espora globosa, color café rojizo (10x); B) Hifa de sostén en forma recta (H), pared con tres capas (L1, L2, L3) (20x). Escala 30 μm	87
Figura 2.11. <i>Glomus</i> sp 3. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared con dos capas (L1 evanescente y L2 laminada) (40x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.	87
Figura 2.12. <i>Glomus</i> sp 4. Espora subglobosa, color café (10x); B) Hifa de sostén recta, pared (L1, L2 y L3) (20x). Escala 50 μm y 30 μm , respectivamente.	88
Figura 2.13. <i>Glomus</i> sp 5. Espora subglobosa, color café (10x); Hifa de sostén (20x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.	88
Figura 2.14. <i>Glomus</i> sp 6. Espora subglobosa, color café (10x); B) Hifa de sostén recta, pared (capa L1 evanescente y L2 laminada) (20x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.	88

Figura 2.15. <i>Glomus</i> sp 7. A) Espora globosa, color naranja, hifa de sostén (10x); B) Pared (capa L1 evanescente, L2 laminada y L3 germinal) (40x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	89
Figura 2.16. <i>Glomus</i> sp 8. A) Espora globosa, color café (10x); B) Hifa de sostén amarilla recta, pared (capa L1 evanescente, L2 unitaria y L3 germinal) (20x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	89
Figura 2.17. <i>Acaulospora</i> sp 1. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (L1, L2 y L3), dos tubos germinativos (TG) (20x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	89
Figura 2.18. <i>Acaulospora</i> sp 2. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (L1, L2 y L3), presencia de cicatriz (C) (40x). Escala 30 µm.	90
Figura 2.19. <i>Acaulospora</i> sp 3. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (L1 y L2) (40x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	90
Figura 2.20. <i>Gigaspora</i> sp. A) Espora rota, color café (10x); B) Hifa de sostén color amarilla, presencia de papilas (P) en la superficie de la espora (20x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	90
Figura 2.21. <i>Rhizophagus</i> aff. <i>fasciculatus</i> . Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (capa L1 hialina, L2 laminada y L3 flexible) (40x). Escala 30 µm.	91
Figura 2.22. <i>Glomus</i> sp 1. A) Espora globosa, color café claro (10x); B) Hifa de sostén en forma recta (H) (20x). Escala 30 µm.	91
Figura 2.23. <i>Glomus</i> sp 2. A) Espora globosa, color café rojizo (10x); B) Hifa de sostén hialina en forma recta (H), pared gruesa y restos de pared evanescente (PE). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	91
Figura 2.24. <i>Glomus</i> sp 3. A) Espora globosa, color café (10x); B) Hifa de sostén hialina en forma recta (H), pared gruesa (PG) (20x). Escala 30 µm y 50 µm respectivamente.	92
Figura 2.25. <i>Acaulospora</i> sp 1. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Restos del sáculo (S), pared gruesa (PG), parte de la cicatriz (C) (20x). Escala 30 µm.	92
Figura 2.26. <i>Acaulospora</i> sp 2. A) Espora rota globosa, color amarillo, restos del sáculo (S) (10x); B) Pared de la espora (L1, L2, L3) (20x). Escala 50 µm.	92

Figura 2.27. <i>Acaulospora</i> sp 3. A) Espora globosa, color amarillo claro (10x); B) Pared de la espora (LI, L2, L3) (40x). Escala 50 μ m.	93
Figura 2.28. <i>Acaulospora</i> aff. <i>rehmii</i> . A) Espora rota globosa, color amarillo (10x); B) ornamentación cerebriforme de la espora, presencia de capa hialina evanescente (CH) (20x). Escala 30 μ m.	93
Figura 2.29. <i>Septogloium</i> aff. <i>constrictum</i> . A) Espora globosa, color café oscuro (10x); B) Hifa de sostén (H) en forma recta y constriñida, pared con dos capas (evanescente y laminada), (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.	93
Figura 2.30. <i>Glomus</i> sp 1. A) Espora globosa color café oscuro (10x); B) hifa de sostén (H) en forma recta, la capa externa de la espora presenta un peridium (P) (40x). Escala 30 μ m.....	94
Figura 2.31. <i>Glomus</i> sp 2. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared gruesa (PG) con una capa evanescente e hifa recta bifurcada (H) (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.....	94
Figura 2.32. <i>Glomus</i> sp 3. A) Espora globosa, color café oscuro (10x); B) Pared gruesa (PG) con restos de la capa evanescente (40x). Escala 50 μ m y 30 μ m, respectivamente.....	94
Figura 2.33. <i>Glomus</i> sp 4. A) Espora subglobosa, color miel, hifa sustentora recta (H) (10x), B) Pared gruesa de la espora (PG). Escala 30 y 50 μ m, respectivamente.	95
Figura 2.34. <i>Entrophospora</i> sp. A) Espora globosa, color naranja (10x); B) Presencia de ornamentación superficial (OS) y un manto alrededor de la espora (M) (40x). Escala 30 μ m.....	95
Figura 2.35. <i>Acaulospora</i> aff. <i>scrobiculata</i> . A) Espora globosa, color amarillo (40x); B) Presencia de ornamentación superficial (OS) (60x). Escala 30 μ m.	95
Figura 2.36. <i>Acaulospora</i> sp 1. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared de la espora, presencia de un peridium (P) (40x), escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.	96

Figura 2.37. <i>Acaulospora</i> sp 2. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared de la espora, presencia de un peridium (P) (40x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.	96
Figura 2.38. <i>Rhizophagus</i> aff. <i>fasciculatus</i> . A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Acercamiento de la pared de la espora, presencia de tres capas (L1, L2 y L3), (40x). Escala 30 µm y 50 µm, respectivamente.....	96
CAPÍTULO III	
Figura 3.1. Obtención de inóculo bacteriano (A) e inoculación de las plantas con las cepas bacterianas (B).	106
Figura 3.2. Eliminación de brote principal dejando de 2 a 3 nudos en la primera poda (A) y eliminación de parte superior de las ramificaciones en la segunda poda (B).	107
Figura 3.3. Área foliar de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = <i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5, B = <i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35, P= <i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias ± error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, α = 0.05), n = 5.....	111
Figura 3.4. Volumen radical de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = <i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5, B = <i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35, P= <i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias ± error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, α = 0.05), n = 5.	114
Figura 3.5. Desarrollo radical de <i>Euphorbia pucherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118 días después del trasplante y con fertilización de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18 (0%, 50% y 100%). Simbología: S/I = Sin, MIX = Mezcla de bacterias.	115
Figura 3.6. Contenido relativo de clorofila en <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118	

días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5..... 116

Figura 3.7. Fluorescencia máxima (Fm) en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5..... 120

Figura 3.8. Área foliar de hojas y brácteas en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5..... 122

Figura 3.9. Desarrollo radical de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante y con fertilización de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18 (0%, 50% y 100%). Simbología: S/I = Sin, MIX = Mezcla de bacterias. 127

Figura 3.10. Volumen radical de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78., MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5..... 128

- Figura 3.11. Contenido relativo de clorofila en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5. 131
- Figura 3.12. Amplitud de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 10. 135
- Figura 3.13. Número de ramificaciones de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 10. 137
- Figura 3.14. Número de brácteas de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P= *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 10. 138

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>E. cyathophora</i> (Mayfield, 1997).....	7
Cuadro 2. Metabolitos y actividad en especies de la familia Euphorbiaceae (Mwine y Van Damme, 2011; Vimal y Das, 2015; Gyuris <i>et al.</i> , 2009; Ramezani <i>et al.</i> , 2008; Goyal, <i>et al.</i> , 2012; Shi <i>et al.</i> , 2008; Liu <i>et al.</i> , 2014; Le Dang <i>et al.</i> , 2010; Sakakura <i>et al.</i> , 2002; Geng <i>et al.</i> , 2011; Samidurai <i>et al.</i> , 2014; Hua <i>et al.</i> , 2017; Ashraf <i>et al.</i> , 2015; Munro <i>et al.</i> , 2015; Majid <i>et al.</i> , 2015; Villanueva <i>et al.</i> , 2015).....	16
Cuadro 3. Función de los componentes del medio de cultivo (Ponmurugan y Suresh, 2012).....	19
Cuadro 4. Antibióticos producidos por RPCV (Matilla y Krell, 2017).....	27
Cuadro 5. Efectos de rizobacterias promotoras del crecimiento en especies vegetales (Ahemad y Kibret, 2014).....	31

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1. Variables morfológicas de embriones de <i>Euphorbia cyathophora</i> en luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) en condiciones <i>in vitro</i>	44
Cuadro 1.2. Número y longitud de raíces de <i>Euphorbia cyathophora</i> crecidas en medio de cultivo MS adicionado con cuatro reguladores de crecimiento y condiciones de luz (CL) y con estímulo oscuridad (OL).....	48
Cuadro 1.3. Respuesta morfogénica vía indirecta (formación de callo) de <i>Euphorbia cyathophora</i> en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL).....	52

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Población de microorganismos cultivables cuantificados en la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i> (UFC x g ⁻¹ suelo seco).....	66
Cuadro 2.2. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram de bacterias productoras de AIA aisladas de la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i>	68
Cuadro 2.3. Concentración de AIA por rizobacterias productoras de índoles en los tres sitios de muestreo (µg mL ⁻¹).....	70

Cuadro 2.4. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram en rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	72
Cuadro 2.5. Evaluación de los halos de solubilización (cm) producidos por rizobacterias aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	74
Cuadro 2.6. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram en rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de <i>Euphorbia cyathophora</i>	78
Cuadro 2.7. Porcentaje de colonización micorrízica, géneros y especies de hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de <i>Euphorbia cyathophora</i>	86

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1. Variables evaluadas en dos fechas de muestreo, durante la producción de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de <i>E. cyathophora</i>	108
Cuadro 3.2. Peso seco de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118 días después del trasplante.....	112
Cuadro 3.3. Contenido de CO ₂ del mesófilo (Ci), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g _s) y tasa fotosintética (Pn) de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 118 días después del trasplante.....	118
Cuadro 3.4. Emisión de fluorescencia de clorofila en <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a 118 días después del trasplante.....	121
Cuadro 3.5. Tasa de crecimiento relativo (TRC) en <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 236 días después del trasplante.....	124
Cuadro 3.6. Peso seco en <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 236 días después del trasplante.....	126

Cuadro 3.7. Análisis foliar de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> a los 236 días después del trasplante.....	129
Cuadro 3.8. Contenido de CO ₂ del mesófilo (C _i), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g _s) y tasa fotosintética (P _n) de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a los 236 días después del trasplante.....	133
Cuadro 3.9. Emisión de fluorescencia de clorofila en <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> , a 236 días después del trasplante.....	134
Cuadro 3.10. Color de hojas y brácteas de <i>Euphorbia pulcherrima</i> inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de <i>E. cyathophora</i> y tres niveles de fertilización.	139

INTRODUCCIÓN GENERAL

México junto con Brasil, Colombia e Indonesia, ocupa el primer lugar mundial en riqueza de reptiles, el segundo en mamíferos y el cuarto en anfibios y plantas (SEMARNAT, 2007). De acuerdo a sus variadas condiciones climáticas, consecuencia de su posición geográfica en el Hemisferio Norte, sus diferencias en latitud, sus numerosos accidentes geográficos, y la existencia de mares que circundan gran parte del territorio, se tienen varios ambientes para el florecimiento de abundante número de especies de plantas, razón por la cual el país posee una de las biotas más diversas, además de ser considerado como uno de los 17 países mega diversos del mundo (Martínez *et al.*, 2014).

Villaseñor (2016) calculó la riqueza florística de México, en 23,314 especies ocupando el cuarto lugar, detrás de Colombia (24,000 especies), China (29,000 especies) y Brasil (32,000 especies). Desafortunadamente, en nuestro país debido a la extracción ilegal de especies vegetales, 987 especies ornamentales se encuentran bajo protección especial de la PROFEPA (Alba, 2017). Adicionalmente, se tienen registros de aproximadamente 600 especies ornamentales que han sido mejoradas genéticamente fuera de nuestro territorio, reingresando a nuestra horticultura ornamental en forma de nuevas variedades y con registros extranjeros (Mejía y Espinosa, 2003; Lack, 2011). Ante tal problemática, es prioritario realizar investigaciones para conservar nuestros recursos genéticos y seleccionar especies silvestres con potencial ornamental que puedan ser mejoradas genéticamente. Por lo anterior, en el presente trabajo se seleccionó a *Euphorbia cyathophora* Murray, especie nativa con diversificación en México y con potencial ornamental.

Como primer objetivo, se planteó la propagación y conservación de la especie, por lo que se implementó la técnica de micropropagación de cultivos vegetales para lograr obtener plantas sanas. Así se utilizaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y luminosidad para conocer la respuesta morfogénica de esta especie.

Dada la adaptación de *E. cyathophora* a suelos someros y con alta pedregosidad, el segundo objetivo fue realizar el estudio de los microorganismos que habitan en la rizosfera de esta especie. Se documentaron las poblaciones nativas de microorganismos que habitan de forma natural y se aislaron aquellos microorganismos benéficos (hongos micorrízicos arbusculares y bacterias promotoras del crecimiento) para su uso como biofertilizantes en la horticultura ornamental. Lo anterior ya que los microorganismos pueden actuar como fitoestimulantes

(estimulan la germinación y enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias), biofertilizantes (incrementan la concentración de nutrimentos y ejercen acción sobre los ciclos biogeoquímicos), mejoradores del suelo (contribuyen a la formación de agregados estables para la estructura), biocontrol (desarrollan fenómenos de antagonismo entre microorganismos), biorremediadores (eliminan productos xenobióticos) y mejoradores ecofisiológicos (incrementan la resistencia al estrés) (Grageda *et al.*, 2012).

A pesar de la información anterior, en México poco se conoce sobre el efecto que tienen los microorganismos en la floricultura, ya que la mayor parte de los estudios están encaminados a granos, hortalizas, cítricos y cereales (Armenta *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2013; Zulueta *et al.*, 2014). Ante esta perspectiva, en esta investigación se seleccionaron las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) más eficientes de la rizosfera de *E. cyathophora* y se inocularon en *E. pulcherrima* (especie de la misma familia taxonómica y la más vendida en época navideña) donde su manejo agronómico incluye sustratos comerciales, altas dosis de fertilizantes, podas y aplicación de pesticidas para lograr la calidad de la planta. Así, los resultados servirán de precedente en la producción comercial de *E. pulcherrima*, por lo que se podría impactar en la reducción de los costos de producción y en la disminución de la contaminación al ecosistema.



OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

- Generar conocimiento para la conservación y micropropagación de *Euphorbia cyathophora* y evaluar los microorganismos rizósfericos de esta especie para su utilización en el desarrollo y producción de *E. pulcherrima*.

Objetivos particulares

- Generar un protocolo para la micropropagación de plantas de *Euphorbia cyathophora* y su conservación *ex situ*.
- Conocer las poblaciones microbianas de hongos filamentosos, actinobacterias, bacterias y hongos micorrízicos arbusculares que habitan la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* y aislar cepas de rizobacterias con características de promoción de crecimiento vegetal.
- Evaluar el efecto de la inoculación de las tres mejores cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento (RPCV) aisladas de *Euphorbia cyathophora* en la producción de *E. pulcherrima*.



Hipótesis general

- Se obtendrán plantas de *Euphorbia cyathophora* para su conservación, y microorganismos de la rizosfera de esta especie que serán utilizados con éxito como bioinoculantes para el desarrollo y producción de *E. pulcherrima*.

Hipótesis específicas

- Se desarrollará con éxito un protocolo para la micropropagación de *Euphorbia cyathophora* y se logrará obtener especies *ex situ*.
- En los tres sitios de muestreo, se encontrarán diferentes grupos de hongos filamentosos, actinobacterias, bacterias (productoras de índoles, solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno) y, hongos micorrízicos arbusculares de la rizosfera de *E. cyathophora*.
- La inoculación de las tres cepas de rizobacterias (*Enterobacter* sp. CPO 2.5, *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Pseudomonas* sp. CPO 2.78) aisladas de *Euphorbia cyathophora*, favorecerán el crecimiento y producción de *E. pulcherrima*.



REVISIÓN DE LITERATURA

La familia Euphorbiaceae

De acuerdo con Webster (2014), la familia Euphorbiaceae es una de las más abundantes a nivel mundial con 8,000 especies ubicadas en 317 géneros, y ocupa el sexto lugar en diversidad mundial después de las familias Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Cactaceae. En México, la familia Euphorbiaceae está representada por 44 géneros y 782 especies (más 32 taxa intraespecíficos; 8 subespecies y 24 variedades) lo que representa más de 3% de la flora vascular calculada para el país en 23,314 especies (Steinmann, 2002; Villaseñor, 2004, Villaseñor, 2016). El género *Euphorbia* presenta gran amplitud morfológica, y se reconocen vegetativamente por sus hojas generalmente alternas, estipuladas y frecuentemente con glándulas o apéndices, y por la presencia de látex (Martínez *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2010). En el país, se reportan 245 de las 2,160 especies en el mundo (Villaseñor, 2016; Horvath *et al.*, 2011).

De acuerdo a la última clasificación taxonómica realizada por Horn *et al.* (2012) y modificada por Yang *et al.* (2012), el género *Euphorbia* subg. *Chamaesyce* incluye grupos taxonómicos con origen en América del Norte y que fueron clasificados con anterioridad en varias secciones taxonómicas bajo los nombres de *Agaloma*, *Poinsettia* y *Chamaesyce*. Dicho género contiene 15 secciones (*Espinosae*, *Articulofructicosae*, *Cheirolepidium*, *Eremophyton*, *Scatorhizae*, *Denisiae*, *Bosseriae*, *Plagianthae*, *Frondosae*, *Tenellae*, *Gueinziae*, *Crossadenia*, *Anisophyllum*, *Poinsettia* y *Alectoroctonum*). Específicamente, la sección *Poinsettia* se divide en cuatro subsecciones (*Lacerae*, *Erianthae*, *Exstipulatae* y *Stormieae*). En la subsección *Stormieae* se agrupan 21 especies: *E. chersonesa*, *E. colorata*, *E. cornastra*, *E. cuphosperma*, *E. cyathophora*, *E. davidii*, *E. dentata*, *E. elliptica*, *E. heterophylla*, *E. hormorrhiza*, *E. kurtzii*, *E. pentadactyla*, *E. pinetorum*, *E. pulcherrima*, *E. pumicicola*, *E. radians*, *E. restiacea*, *E. schiedeana*, *E. strigosa*, *E. tubadenia*, y *E. zonosperma*.

Distribución de las Euphorbias

La distribución de las Euphorbias es subcosmopolita, y su representación va desde las regiones tropicales, subtropicales hasta las zonas templadas de ambos hemisferios (Pahlevani y Riina, 2011). En México, se encuentran desde el nivel del mar hasta los 3000 metros de altura, y están representadas en los principales tipos de vegetación reconocidos por Rzedowski (1991), con



una mayor concentración de especies en las regiones de selva baja caducifolia y en matorrales (Martínez *et al.*, 2002).

Distribución de *Euphorbia cyathophora*

Esta especie está ampliamente distribuida desde Estados Unidos hasta Brasil; sin embargo, tiene su diversificación y posible origen en México (Yang *et al.*, 2012; Steinmann, 2012; Rolim *et al.*, 2015). En la República Mexicana se ha registrado en Chiapas, Coahuila, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Baja California (Vibrans, 2009) (Figura 1). Schmidt *et al.* (2001) mencionaron la presencia de esta especie en las islas del Pacífico como hospedera de mosca blanca (*Bemisia tabaci*).



Figura 1. Distribución de *Euphorbia cyathophora* en la República Mexicana (Yang *et al.*, 2012; Steinmann, 2012; Rolim *et al.*, 2015).



La clasificación taxonómica de la especie se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *E. cyathophora* (Mayfield, 1997).

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Subfamilia:	Euphorbioideae
Tribu:	Euphorbieae
Subtribu:	Euphorbiinae
Género:	<i>Euphorbia</i>
Especie:	<i>Euphorbia cyathophora</i> Murray

Descripción de *Euphorbia cyathophora*

Esta especie es una herbácea anual con raíces pivotantes. Presenta tallos de 15 a 100 cm de alto, erectos o ascendentes, solitarios o ramificados, ramas alternas no aplanadas hacia la punta, de color verde o verde amarillento, glabros a esparcidamente piloso o puberulentos; hojas alternas de 15 a 150 mm de largo, variables en forma; lineares, lanceoladas, elípticas o panduradas, 4 lóbulos, márgenes subulados, glandularserrulados o esparcidamente glandular o subenteros, aplanados a revolutos (Figura 2). Castro *et al.* (2010) reportaron especímenes con ramificación caulinar monopodial, con hojas aserradas con lóbulos pinalobados, ápice cuspidado y acunado en la base. Las inflorescencias terminales en los extremos de las ramas, umbelas de 1 a 4 cm de ancho, con 5 a 75 ciatios por umbela, brácteas rosas en la base o pequeñas completamente coloreadas, ciatios glabros, glándulas usualmente solitarias; flores estaminadas 7 a 20 por fascículo. Pedicelo de 2 a 4 mm, ovarios glabros, verdes a escasamente rojizo; cápsulas deprimidas-esferoides a elipsoides, tricarpelares (Figura 3) (Mayfield, 1997; Yang *et al.*, 2012; Steinmann, 2012). Las semillas son cilíndricas a ovoides, de 2.3-3.1 mm de alto, 1.5-2.5 mm de ancho y 1.8 a 2.4 mm de espesor, superficie de color negro a gris, arrugada, con porosidades, el rafe un poco hundido que va de la parte superior a la inferior (Figura 3).



Figura 2. Inflorescencias y brácteas de *Euphorbia cyathophora*.

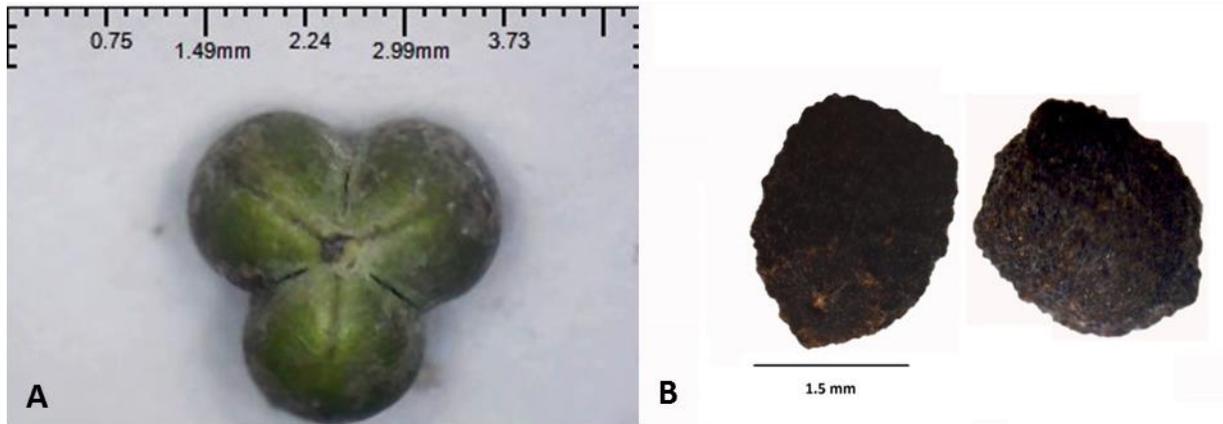


Figura 3. Cápsula (A) y semillas (B) de *Euphorbia cyathophora*.

Usos de *Euphorbia cyathophora*

La especie se presenta como maleza en vegetación secundaria y en ocasiones se utiliza como ornamental (Whistler, 1988; Rolim *et al.*, 2015). Es una especie potencialmente importante para mejoramiento genético ornamental por el dimorfismo que presenta en las hojas y brácteas (Figura 4) o bien por los metabolitos presentes en el látex de la planta que pueden tener usos medicinales, industriales o antioxidantes (Ramírez y Chávez, 2014; Chitra *et al.*, 2014; Gámez *et al.*, 2016).



Figura 4. Dimorfismo en brácteas y hojas de *Euphorbia cyathophora*.



Euphorbia pulcherrima Klotzsch

Esta especie es una planta originaria de México, distribuida de manera natural desde Sinaloa hasta Guatemala, y es conocida como cuetlaxóchitl, nochebuena, flor de navidad, estrella federal, o poinsettia (Lack, 2011). Esta especie es arbustiva con altura de hasta 5 m, presenta una flor femenina sin pétalos ni sépalos, rodeada por flores masculinas individuales que están contenidas en una estructura denominada ciatio (Ecke *et al.*, 2004). En México, se tienen registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), nueve variedades de nochebuena de sol (Amanecer navideño, Belén, Corona, Juan Pablo, Orejona, Rehilete, Tete, Valenciana, y Valsu). La mayoría de estas variedades se obtuvieron mediante la selección, la reproducción, y por modificación de nochebuenas criollas, llevadas a cabo por viveristas del Estado de Morelos (García, 2015; Colinas *et al.*, 2014) (Figura 5).



Figura 5. Variedades de sol registradas en México (A = Orejona, B = Juan Pablo, C = Valsu, D = Belén, E = Valenciana, F = Corona, G = Rehilete, H = Tete, I = Amanecer Navideño (Adaptado de Red de Euphorbias).



Las variedades que se cultivan son derivadas del mejoramiento genético realizado a partir de especímenes extraídos por Robert Poinsett en 1828; se estima que al menos se han generado más de 300 variedades que son producidas y comercializadas en todo el mundo (Trejo *et al.*, 2015). En el país, tan sólo en el 2017, la empresa Floraplant, ofertó dentro de su catálogo (2016-2017 esquejes), alrededor de 40 variedades de nochebuena para su siembra en macetas, siendo las más comercializadas las de color rojo. En el caso de la variedad que se utilizó en la presente investigación (Prestige Red), es de color rojo (Figura 6) y se considera una especie tardía (11 semanas de inducción a floración).



Figura 6. Nochebuena var. Prestige Red (Catálogo Floraplant 2016-2017).

Con respecto a las estadísticas de producción de nochebuena en México, se calcula una producción anual de 20 millones de plantas con un valor comercial de 700 millones de pesos, lo que genera más de 13 mil empleos dentro del país (México Produce, 2016). Adicionalmente, en Estados Unidos, las ventas anuales superan los 100 millones de dólares, generándose 3,000 empleos directos, y la venta de 20 millones de plantas (Canul *et al.*, 2015).

Metabolitos asociados al látex

El látex de las plantas es un polímero vegetal natural almacenado en células laticíferas y secretado por conductos de tejido laticífero (raíces, tallos, hojas, flores, inflorescencias y frutos) y, que fluye al exterior de la planta cuando hay una herida. Se tienen reportes de 20,000 especies de entre 40 familias de angiospermas que producen látex (Konno, 2011; Hua *et al.*, 2017). En la mayoría de las plantas, el látex es de color blanco, transparente, amarillo, anaranjado o rojo pero su color cambia después de la exposición al aire (Upadhyay, 2011).



Existen cuatro hipótesis que explican el objetivo por el cual las plantas secretan látex: 1) Producción de metabolitos de desecho, 2) Protección de tejidos dañados al cubrir la parte afectada, 3) Defensa contra herbívoros, y 4) Defensa contra insectos y patógenos (Konno, 2011; Hua *et al.*, 2017). Sin embargo, el principal objetivo de dicha síntesis es la defensa de la planta contra agentes externos (herbívoros, insectos y patógenos) (Konno, 2011). En general, los metabolitos de látex son productos finales que no vuelven a entrar en el metabolismo primario (Ramawat, 2007; Hagel *et al.*, 2008) (Figura 7).

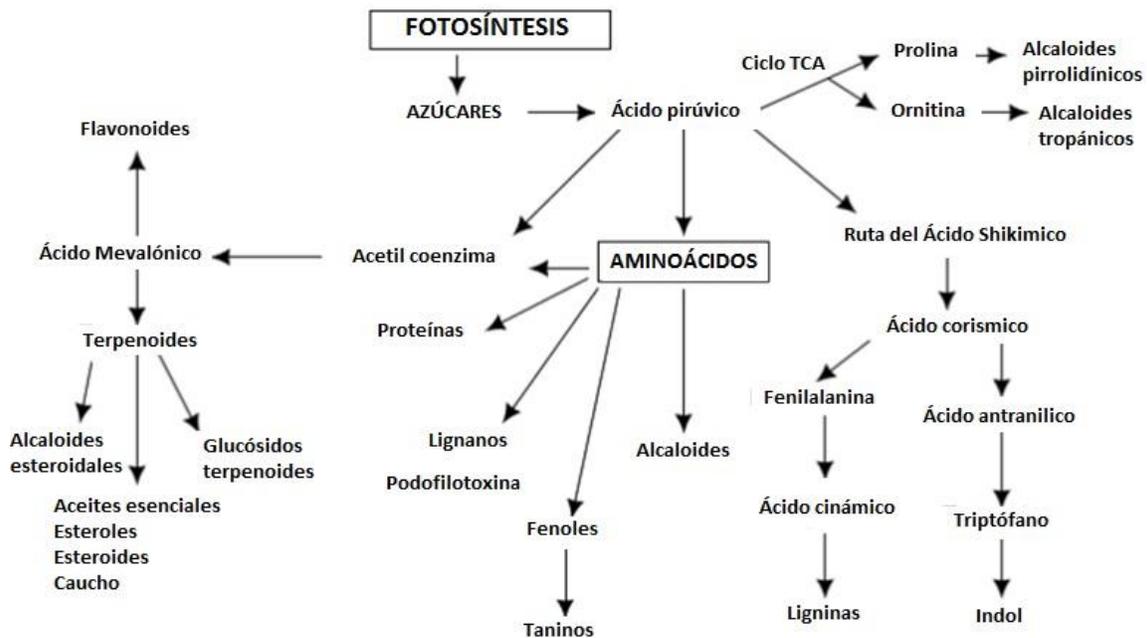


Figura 7. Síntesis de los principales metabolitos secundarios derivados de metabolitos primarios (Adaptado de Ramawat, 2007).

Muchos de estos productos son citotóxicos, y se ha sugerido que los laticíferos evolucionaron para encapsular los compuestos citotóxicos lejos de los tejidos vasculares (Konno, 2011; Ramawat, 2007). Los compuestos que se encuentran en el látex son alcaloides, almidón, azúcares, aceites, polifenoles, terpenoides, cardenólidos, lignanos, resinas, mucílagos y gomas; también contiene lectinas (glicoproteína), cisteína, fosfatasa, proteasas, profilinas y proteínas relacionadas con la quitina que actúan como enzimas catalíticas (Upadhyay, 2011; Konno, 2011;



Villanueva *et al.*, 2015). En el látex de la familia Euphorbiaceae los compuestos más frecuentes son:

1) Polifenoles, metabolitos secundarios que se distinguen por las siguientes características: a) solubilidad en agua, b) masa molecular (entre 500 a 5000), c) estructura y carácter polifenólico (12-16 grupos fenólicos y 5-7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa), d) complejación intermolecular (astringencia), y e) características estructurales (dos motivos estructurales mayores, proantocianidinas o taninos condensados y taninos hidrolizables, más un tercer grupo minoritario, los florotaninos (Haslam y Cai, 1994; Isaza y Hipólito, 2007). De acuerdo a Daglia (2012) los polifenoles pueden ser divididos en varios subgrupos de acuerdo a su estructura básica. Los flavonoides, con estructura básica C₆-C₃-C₆, incluyen a las antocianinas, los flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles (Crozier *et al.*, 2008) (Figura 8).

Número de carbonos		Clasificación	Ejemplo	Estructura básica
7	C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	Ácido gálico	
8	C ₆ -C ₂	Acetofenona	Acetofenona	
8	C ₆ -C ₂	Ácido fenilacético	Ácido 3-4 dihidroxifenilacético	
9	C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico	Acido p-coumárico	
9	C ₆ -C ₃	Coumarinas	Esculetina	
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	Juglona	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	Mangiferina	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estibenos	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	Naringenina	

Figura 8. Estructura de componentes fenológicos y polifenoles (Adaptado de Crozier *et al.*, 2008).



Otro subgrupo es el de los fenil propanoides que incluye a los derivados de ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-cumárico). También tienen importancia los estilbenoides (resveratrol) y los derivados del benzoico (ácido gálico y elágico, etc.) (Figura 8). Dentro de las propiedades atribuidas a estos compuestos se encuentran la actividad antioxidante, actividad estrogénica (fitoestrógenos), fijación de metales y proteínas, actividad bactericida, antifúngica, y antiviral (Scalbert, 1991; Tomás, 2003; Daglia, 2012).

2) Alcaloides, son compuestos que presentan las siguientes propiedades: a) contienen nitrógeno (la mayoría con anillos heterocíclicos), b) presentan sabor amargo, c) se precipitan con yoduros metálicos y sales solubles, y d) ocurren sólo en algunas plantas (Ramawat, 2007). Por su origen biogénico, los alcaloides se clasifican en cuatro grupos: i) alcaloides derivados de aminoácidos (arginina, lisina, histidina, fenilalanina/tirosina, triptófano, y del ácido antranílico y el ácido nicotínico), ii) alcaloides purínicos, iii) terpenos aminados, y iv) alcaloides policétidos. Dentro de sus funciones, la principal es la defensa química de la planta, por lo que presentan actividad en contra de herbívoros e insectos, antibacteriana, antifúngica y antihelmíntica; también se usan como analgésicos, narcóticos y con fines medicinales diversos (Loyola *et al.*, 2004; Mesía *et al.*, 2012; Roberts y Wink, 2013).

3) Terpenos y sesquiterpenos, son moléculas a base de carbono e hidrógeno, éstas proveen las estructuras químicas básicas, debido a la capacidad del átomo del carbono para formar ligaduras químicas con otros átomos de carbono. Los átomos de carbono, ligándose a sí mismos, determinan en gran parte la forma y tamaño de la molécula. Si el único elemento presente es el hidrógeno, las moléculas se llaman insustituídas, y constituyen los terpenos o los sesquiterpenos. Numerosos estudios han demostrado que los terpenos y sesquiterpenos tienen actividad antibacteriana, antifúngica, nematocida e insecticida (Konno *et al.*, 2011; Matias *et al.*, 2010).

4) Proteínas, son moléculas orgánicas nitrogenadas, donde las unidades monoméricas (aminoácidos) se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporcionan una correspondiente variedad de funciones (Devlin, 2004). En el látex se han encontrado peroxidasas, esterases, lipasas, glicoproteínas, isolectinas, peptidasas, entre otras (Pintus *et al.*, 2011; Palocci *et al.*, 2003; Villanueva *et al.*, 2015). Lynn y Clevette (1984) aislaron y caracterizaron una serina proteasa, llamada euphorbain 1, del látex de *E. lathyris* y una del látex de *E. pulcherrima*, llamada euphorbain p. En otro estudio, Villanueva *et al.* (2015) reportaron la presencia de lectinas (glicoproteínas) en *E. marginata*, *E. neriifolia* y *Sinadenium carinatum*;



además, purificaron e identificaron tres nuevas lectinas del látex de *E. trigona* capaces de inhibir la proliferación de varias líneas celulares cancerígenas en humanos.

5) Resinas, insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos. Una de las funciones principales es la de protección, ya que las resinas son ricas en esteroides, compuestos que los insectos no pueden sintetizar. De manera general, los aceites, resinas y algunas ceras difieren en sus propiedades físico-químicas, estructura y sitios de secreción; sin embargo, dichas sustancias pueden estar mezcladas con terpenoides (Ramawat, 2007). Si bien, los metabolitos encontrados en la familia Euphorbiaceae tienen usos favorables, también pueden provocar problemas de salud humana. Horvath *et al.* (2011) mencionaron que el látex contiene di o tri-terpenos que producen escoriación al contacto con la piel o las mucosas. Dichos compuestos pueden ser de 10,000 a 100,000 veces más fuerte que la capsaicina encontrada en *Capsicum* spp. Otros compuestos que se encuentran en el látex son ésteres de fórbol los que pueden ser carcinógenos y promotores tumorales (Varughese *et al.*, 2001). En el caso de *E. cyathophora*, esta especie produce látex de color blanco que puede provocar dolor o irritación cuando hay contacto con las membranas de las mucosas, principalmente en ojos, nariz y boca. Este látex se ha utilizado eficientemente para la inhibición de *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium*; mientras que no se encontraron efectos inhibitorios para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Gothandam *et al.*, 2010). Algunos metabolitos específicos encontrados en el látex de la familia Euphorbiaceae y su actividad biológica, se muestran en el Cuadro 2.



Cuadro 2. Metabolitos y actividad en especies de la familia Euphorbiaceae (Mwine y Van Damme, 2011; Vimal y Das, 2015; Gyuris *et al.*, 2009; Ramezani *et al.*, 2008; Goyal, *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014; Le Dang *et al.*, 2010; Sakakura *et al.*, 2002; Geng *et al.*, 2011; Samidurai *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2017; Ashraf *et al.*, 2015; Munro *et al.*, 2015; Majid *et al.*, 2015; Villanueva *et al.*, 2015).

Actividad	Especies	Compuestos químicos
Antibacteriano	<i>E. guyoniana</i>	Diterpenos
	<i>E. hirta</i>	Taninos, alcaloides y flavonoides
	<i>E. segetalis</i>	Coumarinas y esteroides
	<i>E. heterophylla</i>	Saponinas, flavonoides y taninos
	<i>E. lathyris</i>	Latiranos, kauranos y abietanos
	<i>E. helioscopia</i>	Flavonoides y taninos
Antiviral	<i>E. cotinifolia</i>	Diterpenos
	<i>E. thymifolia</i>	Alcaloides y triterpenos
	<i>E. kansui</i>	Triterpenos, esteroides y diterpenos
	<i>E. segetalis</i>	Triterpenos, lupenol, glutinol
Antifúngico	<i>E. hirta</i>	Taninos, diterpenos, flavonoides
	<i>E. nivulia</i>	Diterpenos
	<i>E. hirta</i>	Diterpenos y triterpenos
Nematicida	<i>E. antiqorum</i>	Alcaloides, fenoles, glucósidos cianogénicos, flavonoides y terpenos
	<i>E. caducifolia</i>	Triterpenos y diterpenos
	<i>E. pulcherrima</i>	Diterpenos
	<i>E. hirta</i>	Fenoles
	<i>E. kansui</i>	Diterpenos
Insecticida	<i>E. fischeriana</i>	Diterpenos
	<i>E. hirta</i>	Flavonoles
	<i>E. kansui</i>	Diterpenos
	<i>E. fischeriana</i>	Jolkinolido (Diterpeno)
Antioxidante	<i>E. lactea</i>	Sequiterpeno
	<i>E. peplus</i>	Terpenoides
	<i>E. gaillardotii</i>	Compuestos fenólicos
	<i>E. macroclada</i>	Polifenoles (ácido rosmarínico)
	<i>E. royleana</i>	Flavonoides
Uso medicinal	<i>E. tirucalli</i>	Proantocianidinas y flavonoides
	<i>E. dracunculoides</i>	Coumarinas y taninos
	<i>E. hirta</i>	Lacticina
	<i>E. lactea</i>	Tirucalol
	<i>E. trigona</i>	Isolectinas



Fundamentos e importancia de la técnica del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales consiste en aislar una porción de planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca y Mroginski, 1991). Las ventajas que presenta esta técnica es la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar en el campo, la conservación de germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o síntesis química y la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, herbicidas, etc. (Annis y Ahmad, 2016). De acuerdo a El-Esawi (2016) se reconocen cinco fases dentro del cultivo de tejidos:

Etapa 0: Selección y preparación de la planta a micropropagar. La calidad y la capacidad de respuesta de los explantes *in vitro* son afectados por la actividad fisiológica, estado fitosanitario y genotipo de la planta donante. Se recomienda que antes del establecimiento del cultivo aséptico, las plantas se mantengan en condiciones controladas (luz y temperatura), favoreciendo el crecimiento de la planta y disminuyendo la posibilidad de contaminación, la aparición de enfermedades y plagas (El-Esawi, 2016; Iliev *et al.*, 2010).

Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico. En esta fase se inicia y establece un cultivo aséptico, su éxito depende de la selección del explante, el procedimiento de esterilización adecuado y la observación de reacciones de hipersensibilidad de los tejidos. Es de suma importancia la inocuidad del explante, por lo que el proceso de esterilización del material y desinfección del explante se realizará con productos o reactivos químicos evitando la liberación de fenoles que oscurecen el medio de cultivo y pueden ocasionar toxicidad en el explante (El-Esawi, 2016).

Etapa 2: Multiplicación. El éxito de la micropropagación depende de la eficiencia de esta etapa. La multiplicación de los brotes puede llevarse a cabo mediante la regeneración de los brotes, la formación de brotes directos adventicios del explante y la ramificación axilar forzada (El-Esawi, 2016).



Etapa 3: Enraizamiento de brotes formados *in vitro*. En esta etapa se forman las raíces y se prepara a la planta para adaptarse a un ambiente *ex vitro* en condiciones controladas en el invernadero. La inducción de raíces adventicias puede lograrse *in vitro* o *ex vitro* en presencia de auxinas. Sin embargo, la principal ventaja del enraizamiento *ex vitro* es que la raíz no sufre daño durante la transferencia al suelo (Iliev *et al.*, 2010).

Etapa 4: Trasplante y aclimatación. Durante esta etapa, las plantas se adaptarán gradualmente a las condiciones ambientales naturales ya que un problema serio son las bajas tasas de supervivencia. Las plantas transferidas de *in vitro* a condiciones *ex vitro*, experimentan una modificación gradual de la anatomía y morfología foliar, y sus estomas empiezan a ser funcionales. Las plantas también forman una capa protectora de cera epicuticular sobre la superficie de sus hojas y gradualmente se van adaptando a su nuevo ambiente (Iliev *et al.*, 2010).

Medios de cultivo

Un medio de cultivo satisface las necesidades nutrimentales y fisiológicas de los explantes (Ponmurugan y Suresh, 2012), cuyos componentes son (Roca y Mroginski, 1991; Gamborg, 2002; Molnár *et al.*, 2011): 1) sales inorgánicas, 2) sustancias orgánicas, 3) compuestos no definidos de origen natural, 4) materiales inertes y de soporte y, 5) reguladores de crecimiento (Cuadro 3).

Existen diversos medios elaborados dependiendo de los propósitos de la experimentación; sin embargo, el más utilizado es el de Murashige y Skoog (1962). Dicho medio, fue elaborado para inducir callosidades en *Nicotiana tabacum*. Posteriormente, Linsmaier y Skoog (1965) mejoraron su composición orgánica aumentando la concentración de la tiamina de 0.1 mg L⁻¹ a 0.4 mg L⁻¹, y excluyendo la glicina, piridoxina y el ácido nicotínico; dicho medio es conocido como LS (González y Manzo, 2008).



Cuadro 3. Función de los componentes del medio de cultivo (Ponmurugan y Suresh, 2012).

Elementos	Función
Nitrógeno	El N forma parte de la clorofila y es convertido a aminoácidos y proteínas. Este compuesto se adiciona en forma de nitratos (20-25 mM) y en menor cantidad en amonio (2-20 mM). Se sabe que la combinación de ambos se prefiere por la mayoría de las especies. Puede adicionarse en formas orgánicas (caseína, prolina, glutamina, entre otras).
Potasio	Balancea las cargas de los iones negativos. La concentración en el medio es de 25-30 mM.
Fósforo	Forma parte de los ácidos nucleicos y la pared celular. Se agrega al medio en forma de PO_4^{3-} en una concentración de 0.3 mM.
Calcio	Es cofactor de muchas enzimas y es importante en la síntesis de la pared celular. Se adiciona en forma de cloruro de calcio o nitrato de calcio. Su concentración es de 1 a 3 mM.
Magnesio	Forma parte de la molécula de la clorofila. Se incorpora en forma de sulfato de magnesio a la concentración de 1 a 3 mM.
Azufre	Forma parte de los aminoácidos y participa en la estructura de las proteínas. Se adiciona al medio en forma de sulfato de magnesio, a una concentración de 1 a 3 mM.
Hierro	Esencial en la síntesis de clorofila y reacciones de óxido-reducción. Puede formar compuestos insolubles, por lo que se adiciona en forma de quelatos. El EDTA es el agente quelatante más popular,
Zinc	Es cofactor en las actividades enzimáticas. Se aplica al medio en forma de sulfato de zinc a una concentración de 5-30 μM .
Manganeso	Requerido en reacciones enzimáticas, particularmente en procesos de respiración y fotosíntesis. Se adiciona en forma de sulfato de magnesio de 5-30 μM .
Boro	Elemento involucrado en la síntesis de lignina y metabolismo de los ácidos fenólicos. Se incorpora al medio en forma de ácido bórico de 25 a 100 μM .
Cobre	Es cofactor de muchas enzimas, incluyendo la citocromo oxidasa. Se agrega al medio en forma de sulfato de cobre a 0.1 μM . Altas cantidades pueden ser tóxicas.
Molibdeno	Ayuda a la transformación de nitrato a amonio. Se aplica al medio en forma de molibdato de sodio a 1 μM .
Azúcar	Se agrega al medio como fuente de energía ya que en general los explantes no son autótrofos. Las fuentes más utilizadas son la sacarosa, glucosa, fructuosa y sorbitol. La concentración de estos azúcares es de 20-40 mg L^{-1} .
Vitaminas	Dentro de las vitaminas, la tiamina (vitamina B1) sirve para el metabolismo de carbohidratos y biosíntesis de aminoácidos. Otras como el ácido nicotínico, piridoxina, biotina, ácido fólico, ácido ascórbico, y tocoferol. Se adicionan al medio en bajas concentraciones para promover el crecimiento.
Myo-inositol	Es un azúcar-alcohol que participa en la promoción del crecimiento de las monocotiledóneas y algunas especies.
Agar	Agentes gelificantes que se utilizan en el medio para dar consistencia sólida o semisólida.



Reguladores de crecimiento vegetal

El éxito del empleo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* está muy influenciado por la composición química del medio de cultivo y los factores ambientales. Un componente importante en el medio de cultivo son los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas que se definen como compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas concentraciones fomentan, inhiben o modifican cualquier proceso fisiológico vegetal. También participan como mensajeros químicos producidos en una parte de la planta y tienen sus efectos en el mismo sitio o en otra parte de ésta (Ponmurugan y Suresh, 2012; Roca y Mroginski, 1991; Lira, 2008; González y Manzo, 2008). Las hormonas vegetales reconocidas son auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, brasinosteroides y jasmonatos (Taiz y Zeiger, 2006; Cheong y Choi, 2003).

Las auxinas

El término auxina proviene de la raíz griega *auxein* que significa incrementar o crecer (Srivastava, 2002). El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina natural más ampliamente distribuida en el reino vegetal, y está presente en dicotiledóneas, monocotiledóneas, gimnospermas y helechos. El AIA es un ácido orgánico débil que consiste en una estructura de anillo de indol plana, acoplada a una cadena lateral que alberga un grupo carboxilo terminal (Ljung, 2013).

El grupo carboxilo se protona a pH bajo, haciendo que la molécula sea menos polar (Ljung, 2013; Srivastava, 2002). Las auxinas son sintetizadas a partir del aminoácido triptófano mediante la vía del ácido shikímico o a partir de la triptamina principalmente en primordios, hojas jóvenes y semillas (Bidwell, 2002; Davies, 2010). El transporte del AIA es de célula a célula, principalmente en el cambium vascular y las cadenas procambiales, pero probablemente también en células epidérmicas. En la raíz, el transporte también implica el floema (Davies, 2010). Una vez que se descubrió el AIA, se sintetizaron diversos compuestos con actividades tipo auxina que se han utilizado ampliamente en la agricultura y en la horticultura como herbicidas (2,4-D, 2,4,5-T, picloram y dicamba) o como productos de enraizamiento (ácido indol butírico y el ácido α -naftalenacético). En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los



tejidos vasculares (Taiz y Zeiger, 2006). Otras funciones son la ampliación celular, la división celular en el cambium, la diferenciación del floema y el xilema, la iniciación de las raíces en los tallos, el retraso de la senescencia en las hojas, la abscisión hojas y frutos y promueve la floración (Davies, 2010).

Aplicación de auxinas en el cultivo de tejidos

Las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido *p*-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético) (Taiz y Zeiger, 2006). Las auxinas generalmente causan elongación de las células, división celular, formación de callo y la generación de raíces adventicias; además inhiben la formación de brotes adventicios y axilares, y frecuentemente promueven la embriogénesis en medios donde el explante se encuentra suspendido en el medio líquido (Pierick, 2012). De acuerdo con González y Manzo (2008), las auxinas se requieren en subcultivos, en tejidos aislados de plantas, y callosidades en concentraciones de 0.1 a 5.0 mg L⁻¹ de AIA, y para la diferenciación de órganos se ha señalado a menudo que es necesario reducir la concentración de auxinas; además, mencionan que el AIA o el ANA son mejores que el uso de 2,4-D para la inducción de la organización celular en callos *in vitro*.

Las citocininas

Las citocininas son derivados de la adenina, y promueven la división celular, el crecimiento y desarrollo vegetal (Sakakibara, 2010). La kinetina fue la primera sustancia identificada como una citoquinina, aislada del ADN del esperma del arenque (pez marino). Esta hormona, no se produce de forma natural y aún no se ha encontrado en las plantas. Análogamente, la *trans*-zeatina (tZ) se aisló del endospermo de maíz inmaduro a principios de los años sesenta y fue la primera citoquinina natural descubierta.

Las citocininas más comunes son BA (benziladenina) o 6BPA (bencilamino purina), cinetina, zeatina y 2-iP (*N*-isopentenil adenina). De acuerdo con Taiz y Zeiger (2006) las citocininas regulan la división celular en tallos y raíces, modifican la dominancia apical, promueven el crecimiento lateral de la yema, retrasan la senescencia en hojas, promueven el



movimiento de los nutrientes y el desarrollo de los cloroplastos, así como la expansión celular en hojas y cotiledones, y el crecimiento de tallos y hojas. En el cultivo de tejidos, las citocininas promueven la formación de órganos, el alargamiento y división celular. En altas concentraciones ($1-10 \text{ mg L}^{-1}$) inducen la formación de brotes adventicios pero inhiben la formación de las raíces; además, promueven la formación de brotes axilares y disminuyen la dominancia apical (Bidwell, 2002; Pierick, 2012).

Relación auxinas-citocininas en las plantas

En el cultivo de tejidos, la relación auxina y citocinina permite regular la organogénesis o la dediferenciación. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen brotes y con relaciones cercanas a 1, se producen callos (Sáenz *et al.*, 2010). Tigrano y Gray (2011) mencionaron que en altas concentraciones ($1-10 \mu\text{M}$), las citocininas inducen formación de brotes adventicios pero inhiben la formación de raíces. Adicionalmente, promueven la formación de brotes axilares por oponerse a la dominancia apical regulada por las auxinas.

De acuerdo con Curtis y Schnek (2008) existen algunos reportes donde las diferentes combinaciones de auxinas y citocininas afectan el desarrollo de las células indiferenciadas en el cultivo de tejidos. Cuando ambas hormonas se encuentran en concentraciones aproximadamente iguales, las células permanecen indiferenciadas y forman una masa amorfa de tejido (callo). Por el contrario, cuando las concentraciones de auxinas son mayores que las de citocininas, el tejido indiferenciado origina raíces organizadas; mientras que ante altas concentraciones de citocininas se forman yemas; sin embargo, los resultados son diferenciales dependiendo de la especie.

La rizosfera

La rizosfera comprende la región del suelo influenciada por las raíces de las plantas, donde crece una comunidad microbiana diversa y dinámica, cuya actividad se vincula con distintos procesos relacionados con el agua, la nutrición mineral, el intercambio de cationes y la producción de exudados, etc., que la hacen diferente del resto del suelo en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Bais *et al.*, 2006; Badri *et al.*, 2009; Jaramillo, 2011; Manchanda *et al.*, 2017).



Fageria y Moreira (2011) sugirieron que la capa del suelo cercana a la raíz se denomina ectorrizosfera, y la capa de la raíz colonizada por los microorganismos se llama endorrizosfera. Estas dos áreas están separadas por la superficie de la raíz conocida como rizoplano (Figura 9). Las raíces en crecimiento liberan diversos compuestos en la rizosfera (compuestos orgánicos de bajo peso molecular, materiales gelatinosos de alto peso molecular, compuestos volátiles, desechos de la cubierta de la raíz y compuestos procedentes de la autólisis de células epidérmicas viejas atacadas por microorganismos (Porta *et al.*, 2014; Faure *et al.*, 2009; Morel *et al.*, 2012).

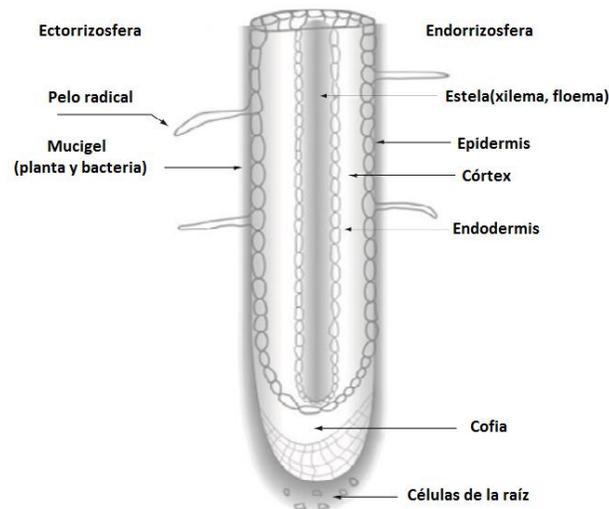


Figura 9. Sección de la raíz mostrando la ectorrizosfera y la endorrizosfera (Adaptado de Fageria y Moreira, 2011).

La exudación radical produce interacciones rizosféricas positivas y negativas. Las interacciones positivas implican interacciones mediadas por los exudados de las raíces con las rizobacterias ya que se producen señales químicas que atraen a las bacterias e inducen la quimiotaxis. Las interacciones positivas mediadas por exudados de raíz también incluyen reguladores de crecimiento que promueven el crecimiento de otras plantas y también realizan señalización entre especies con invertebrados. En contraparte, las interacciones negativas mediadas por exudados de raíces implican la liberación de compuestos antimicrobianos, fitotoxinas, nematocidas e insecticidas, alcaloides, esteroides, terpenoides, diterpenos y enzimas, las cuales protegen a la planta contra la invasión de fitopatógenos (Bais *et al.*, 2006; Banik *et al.*, 2016; Manchanda *et al.*, 2017).



Dentro de la influencia de la raíz también se incluyen propiedades físicas (temperatura, estructura y disponibilidad de agua) y químicas (potencial redox, pH, concentración de nutrimentos, exudados radicales, desintoxicación de Al y alelopatía) (Fageria y Moreira, 2011). Conjuntamente la presencia de organismos (bacterias, hongos, oomycetos, nematodos, protozoos, algas, virus, archeas y artrópodos) y de asociaciones simbióticas entre diferentes organismos (Mendes *et al.*, 2013).

Rizobacterias

Las rizobacterias que proporcionan beneficios a las plantas se dividen en dos tipos (Beneduzi y Passaglia, 2011): 1) Bacterias que establecen una relación simbiótica con la planta, y 2) Bacterias de vida libre que se encuentran cerca o dentro de la raíz de la planta. Usualmente, dentro del segundo grupo se incluye a las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV). Sin embargo, algunos autores incluyen a los rizobios (simbióticos de raíces de leguminosas) como parte de las RPCV (Beneduzi y Passaglia, 2011).

Las RPCV incluyen diferentes especies de bacterias que influyen directamente sobre el metabolismo vegetal, promoviendo la absorción de agua y nutrientes, el desarrollo del sistema radical y la estimulación del funcionamiento de otros microorganismos benéficos presentes en la rizosfera (Bashan *et al.*, 2007; Bais *et al.*, 2006; Grageda *et al.*, 2012). Entre las bacterias más conocidas son aquellas pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*. Las RPCV se clasifican en dos grupos:

a) Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno atmosférico), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la absorción de agua y nutrimentos), mejorando el desarrollo radical, incrementando la actividad enzimática de la planta, o bien, “colaborando” con otros microorganismos benéficos para que actúen eficientemente sobre las plantas (Bashan *et al.*, 2007; Aguado *et al.*, 2012).

b) Rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta y suprimen a los fitopatógenos (Bashan *et al.*, 2007; Aguado *et al.*, 2012). Las RPCV como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*,



Burkholderia, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pantoea*, tienen la capacidad de solubilizar fosfatos. Los mecanismos involucrados en la solubilización-mineralización microbiana de las diferentes formas de fosfato insoluble incluyen procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio, producción de ácidos y acción enzimática (Figura 10) (Rashid *et al.*, 2004; Restrepo *et al.*, 2015).

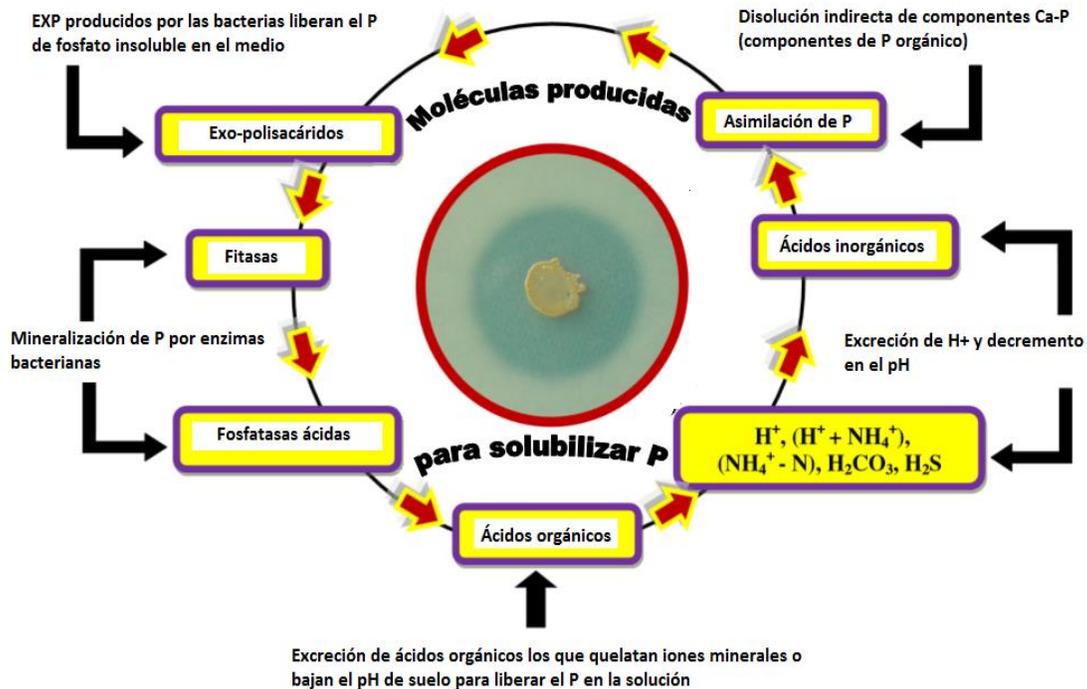


Figura 10. Mecanismos de solubilización de fósforo (P) por RPCV (Adaptado de Ahemad y Kibret, 2014).

En las RPCV, se estima que el 80% de las bacterias aisladas de la rizosfera pueden sintetizar ácido indolacético (AIA) (Spaepen y Vanderleyden, 2011), destacando algunos géneros como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Streptomyces*. El AIA bacteriano estimula la formación de los pelos radicales al tiempo que aumenta el número y la longitud de las raíces laterales y primarias cuando se encuentra dentro de un rango de concentración ideal. Sin embargo, a concentraciones más altas, el AIA bacteriano también puede inhibir el crecimiento de raíces primarias. EL AIA es una molécula recíproca de señalización en las interacciones planta-microorganismo, manteniendo incluso, la relación simbiótica que ha evolucionado entre ciertas plantas y sus microsimbiontes. El AIA está presente en los exudados de la raíz y suele sintetizarse mediante cinco diferentes vías a partir del



aminoácido triptófano exudado (Spaepen y Vanderleyden, 2011; Grageda *et al.*, 2012; Duca *et al.*, 2014).

Algunas RPCV (*Acinotobacter*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, entre otras), poseen la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, que degrada el ACC, el cual es el precursor del etileno en las plantas. La presencia de dicha enzima se asocia a la reducción de la concentración del etileno en condiciones de estrés (salinidad, sequía, radiación, metales pesados, ataque de patógenos, alta intensidad lumínica, inundación, y contaminación por hidrocarburos (Ahemad y Kibret, 2014). Otros reguladores de crecimiento producidos por las bacterias son citocininas (*Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*), giberelinas (*Rhizobium*), ácido abscísico y compuestos fenólicos, entre otros (Faure *et al.*, 2009; Hussain y Hasnain, 2009; Hussain y Hasnain, 2011; Banik *et al.*, 2016).

Con respecto a RPCV capaces de fijar nitrógeno atmosférico, se ubica a los rizobios cuya actual taxonomía incluye subclases de la α -proteobacteria (*Devosia*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Shinella* y *Phyllobacterium*), y β -proteobacteria (*Burkholderia*, *Herbaspirillum* y *Cupriavidus*) (Morel *et al.*, 2012; Weir, 2016). En total, se tienen reportes de 98 especies distribuidas en 14 géneros; sin embargo, la taxonomía es muy variable por el descubrimiento de nuevas especies. Como beneficios que obtienen las plantas asociadas a este tipo de bacterias, se tiene la posibilidad de establecerse en suelos deficientes de nitrógeno, estimular la densidad y longitud de las raíces primarias y secundarias, promover el desarrollo, mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas y, producir reguladores de crecimiento (Andrews y Andrews, 2017; Dardanelli *et al.*, 2010).

Otra cualidad de las RPCV es la capacidad de producir sideróforos; en dicho mecanismo, las bacterias secuestran el hierro al formar un complejo Fe^{3+} -sideróforo, mediante un receptor específico localizado en la membrana bacteriana, lo cual ocasiona que este metal no se encuentre disponible para otros microorganismos que carezcan del sistema de asimilación específico para reconocer dicho complejo. De esta manera, al utilizar todo o la mayoría del hierro disponible en el suelo, se suprime o inhibe el crecimiento de otros microorganismos patógenos (o benéficos) presentes en la rizosfera (Aguado *et al.*, 2012).



Finalmente, otros beneficios asociados a la presencia de las RPCV son la producción de sustancias que inducen la resistencia sistémica (jasmonatos y etileno), la síntesis de sustancias con actividad para el control de patógenos (enzimas que hidrolizan la pared de hongos patógenos, HCN, fenazinas, pirrolidina, pirrolnitrina, viscosinamida y 2,4-diacetilfloroglucinol), y la producción de antibióticos (Cuadro 4) (Bach y Díaz, 2008; Ahemad y Kibret, 2014; Matilla y Krell, 2017).

Cuadro 4. Antibióticos producidos por RPCV (Matilla y Krell, 2017).

Antibiótico	Tipo	Función	RPCV productora
Andrimid	Híbrido PQ/PSNR	Antibacteriano	<i>Serratia plymuthica</i> A153
Bacillaene	PQ	Antibacteriano	<i>Bacillus amyloliquefacie</i> FZB42
Difficidin	PQ	Antibacteriano	<i>Bacillus amyloliquefacie</i> FZB42
Oocydin A	PQ	Antibacteriano y antioomyceto	<i>Serratia plymuthica</i> A153
Pyoluteorin	PQ	Antifúngico y antioomyceto	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5
Rhizoxin	Híbrido PQ/PSNR	Antifúngico	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5
Zeamine	Híbrido PQ/PSNR	Antibacteriano y nematocida	<i>Serratia plymuthica</i> A153
Zwittermicin	PSNR	Antifúngico	<i>Bacillus cereus</i>

Poliquétidos (PQ) y Péptidos de síntesis no ribosómica (PSNR).

Matilla y Krell (2017) mencionaron que los poliquétidos (PQs) y los péptidos de síntesis no ribosómica (PSNRs), son los principales metabolitos secundarios con actividades antibióticas sintetizados por las RPCV. La síntesis de estos metabolitos es regulada por la planta y depende de las condiciones ambientales adversas (temperatura o aireación); se producen generalmente durante la fase estacionaria de crecimiento y el coste energético derivado de su producción suele ser elevado. Además, es necesaria la presencia de compuestos químicos específicos para su producción (Scherlach y Hertweck, 2009).



Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)

El origen de la simbiosis entre plantas terrestres y los HMA se remonta al periodo Devónico temprano, el cual data de más de 400 millones de años atrás (Morgan y Connolly, 2013; Prasad *et al.*, 2017). Se estima que el 80% de todas las plantas puede formar asociaciones con algún tipo de hongo; sin embargo, los HMA son los más distribuidos entre las diversas familias del reino vegetal (alrededor de 200,000 plantas). Los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota, representado por 250 especies que son definidas por la morfología de sus esporas (Redecker, 2008; Salmerón *et al.*, 2015; Lenoir *et al.*, 2016).

Los HMA se desarrollan en el interior de la raíz de la planta hospedera (células corticales) y en la rizosfera por un micelio externo que explora gran superficie del suelo (Teotia *et al.*, 2017). A través de las hifas, los HMA transportan varios elementos del suelo al interior de la planta, entre ellos fósforo, zinc y cobre, cuya disponibilidad para las plantas es limitada. Además, en comparación con la raíz, el área de la superficie por unidad de volumen de las hifas de los HMA es aproximadamente 100 veces más; así la cantidad de hifas varía dependiendo del ecosistema y se calcula desde 0.5 a 20 m de hifa por gramo de suelo (Teotia *et al.*, 2017; González-Chávez, 2004) (Figura 11).

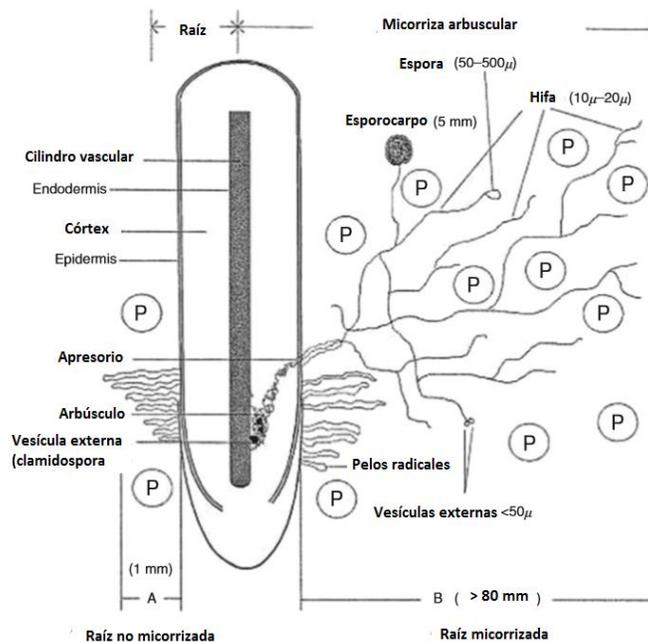


Figura 11. Vías de absorción de nutrientes en raíces no micorrizadas y micorrizadas (Adaptado de Teotia *et al.*, 2017).



Análogamente, las plantas micorrizadas presentan mayor desarrollo y crecimiento, así como un incremento en el intercambio gaseoso (conductancia estomática de las hojas y fotosíntesis neta). Sin embargo, parámetros como contenido de clorofila, potencial osmótico de las hojas, concentración de enzimas antioxidantes y producción de ácido abscísico son dependientes del simbionte así como de la especie micorrízica (Koltai y Kapulnik, 2010; Reyes y Valery, 2007).

Cuando existen condiciones de estrés, los HMA promueven mecanismos bioquímicos y moleculares dentro de la planta (Lenoir *et al.*, 2016):

1) Sistemas antioxidantes. Son encargados de reducir las especies reactivas de oxígeno e inmovilizar a los radicales libres. Otras moléculas que funcionan como antioxidantes, son el glutatión, la vitamina B6, C, E y las metalotioneínas.

2) Modificación de los lípidos de la membrana. Se sabe que los fosfolípidos, lípidos y esteroides son afectados por diversos contaminantes. Sin embargo, un mecanismo para la regeneración de la membrana, es la activación de la biosíntesis de triacilglicerol (TAG) el que promueve la síntesis de esqueletos carbonados y energía necesaria para la regeneración.

3) Secuestro. En las esporas y en la pared de las hifas de los HMA se produce una glicoproteína (glomalina) capaz de inmovilizar a los elementos tóxicos evitando la toxicidad a las plantas.

4) Transportadores. Se ha detectado la presencia de genes de acuaporinas como transportadoras de elementos tóxicos en plantas inoculadas. Además, se han aislado genes específicos para el transporte de As, Cu, Fe, Zn y Cd.

5) Transformación química. Especies de HMA han reducido u oxidado elementos xenobióticos con la finalidad de reducir la toxicidad. Esto se ha relacionado con la presencia de citocromo P450 monooxigenasas en el genoma de *Rhizopagus irregularis*.

6) Proteínas de acompañamiento. Los HMA favorecen la producción de proteínas de acompañamiento para evitar el plegamiento o agregación de las proteínas en condiciones de estrés abiótico. Algunas proteínas presentes son las de la familia 14-3-3 y la proteína BiP.

Por otra parte, los HMA también pueden actuar de forma negativa o antagónica por



ejemplo, en la presencia de microorganismos se producen compuestos antibióticos que suprimen los patógenos, y la competencia por nutrientes con el patógeno, la liberación de sideróforos, la inducción de mecanismos de defensa del hospedero y el desarrollo de una barrera mecánica (Das y Varma, 2009).

Uso de microorganismos en la agricultura

El uso de microorganismos en la agricultura moderna constituye la base para la sostenibilidad del sistema agrícola, ya que al reducir la cantidad de plaguicidas y fertilizantes, se evita el deterioro del ecosistema y problemas derivados para la salud humana (Matilla y Krell, 2017). Además, el uso de HMA y de RPCV en cultivos agrícolas, incrementa la producción y la tolerancia ante condiciones bióticas y abióticas (Baez *et al.*, 2017). En el Cuadros 5 se muestran algunos efectos positivos de RPCV en cultivos agrícolas.

Desafortunadamente, las investigaciones sobre al aislamiento de RPCV en plantas nativas de México son escasas; en contraste, Alarcón *et al.* (2012) detectaron varias especies de HMA en agroecosistemas y ecosistemas naturales de México: *Acaulospora delicata*, *A. denticulata*, *A. excavata*, *A. foveata*, *A. kentinensis*, *A. lacunosa*, *A. laevis*, *A. mellea*, *A. morrowiae*, *A. rehmi*, *A. scrobiculata*, *A. spinosa*, *A. undulata*, *Ambispora appendicula*, *Am. leptoticha*, *Claroideoglobus claroideum*, *C. etunicatum*, *Entrophospora infrequens*, *Funneliformis constrictum*, *F. geosporum*, *F. mosseae*, *Glomus albidum*, *Gl. ambisporum*, *Gl. macrocarpum*, *Gl. microaggregatum*, *Gl. pustulatum*, *Gl. tenebrosum*, *Gl. tortuosum*, *Gigaspora decipiens*, *G. gigantea*, *G. ramisporophora*, *Pacispora chimonobambusae*, *Paraglobus occultum*, *Racocetra gregaria*, *Rhizophagus fasciculatus*, *Redeckera fulvum*, *Sclerocystis clavisporea*, *S. coremioides*, *S. rubiformis*, *S. sinuosa*, *Scutellospora biornata*, *Sc. calospora*, *Sc. dipapillosa*, *Sc. dipurpurascens*, *Sc. pellucida*, y *Sc. Scutata*.



Cuadro 5. Efectos de rizobacterias promotoras del crecimiento en especies vegetales (Ahemad y Kibret, 2014).

RPCV	Planta	Beneficios
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i>	<i>Cynara scolymus</i>	Solubilización de fosfato, fijación de N, incremento en el crecimiento
<i>Pseudomonas</i> sp. PS1	<i>Vigna radiata</i> L.	Incremento en peso seco, número de nódulos, clorofila, contenido de N y P en tallos y semillas
<i>Bradyrhizobium</i> MRM6	<i>Vigna radiata</i> L.	Incremento en desarrollo de la planta cuando se aplicó herbicidas
<i>Pseudomonas</i> sp. A3R3	<i>Alyssum serpyllifolium</i> , <i>Brassica juncea</i>	Incremento en biomasa y contenido de Ni
<i>Pseudomonas</i> sp.	Soya, trigo	Incrementa la actividad enzimática en el suelo, la productividad y la absorción de nutrimentos
<i>Psychrobacter</i> sp. SRS8	<i>Ricinus communis</i> , <i>Helianthus annuus</i>	Incrementan la acumulación de Ni en tejido y aumentaron variables como biomasa, clorofila y contenido de proteínas
<i>Rhizobium</i> cepa MRP1	Pea (<i>Pisum sativum</i>)	Incrementaron el crecimiento y la cantidad de N y P en el tejido
<i>Rhizobium phaseoli</i>	<i>Vigna radiata</i> L.	En presencia de triptófano, <i>Rhizobium</i> disminuye los efectos de la salinidad en la planta
<i>Achromobacter xylooxidans</i> strain Ax10	<i>Brassica juncea</i>	Aumenta la absorción de Cu e incrementa el desarrollo de la planta
<i>Mesorhizobium</i> strain MRC4	Chickpea (<i>Cicer arietinum</i>)	Aumento en el contenido de N y P en raíces y tallos, nodulación y leghemoglobina
<i>Pseudomonas putida</i> KNP9	Frijol mungo	Reduce la absorción de Pb y Cd, Favorece el crecimiento de la planta
<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Xanthomonas</i> sp. RJ3 <i>Azomonas</i> sp. RJ4	Pimienta	Incrementa biomasa Incrementa la acumulación de Cd y el crecimiento



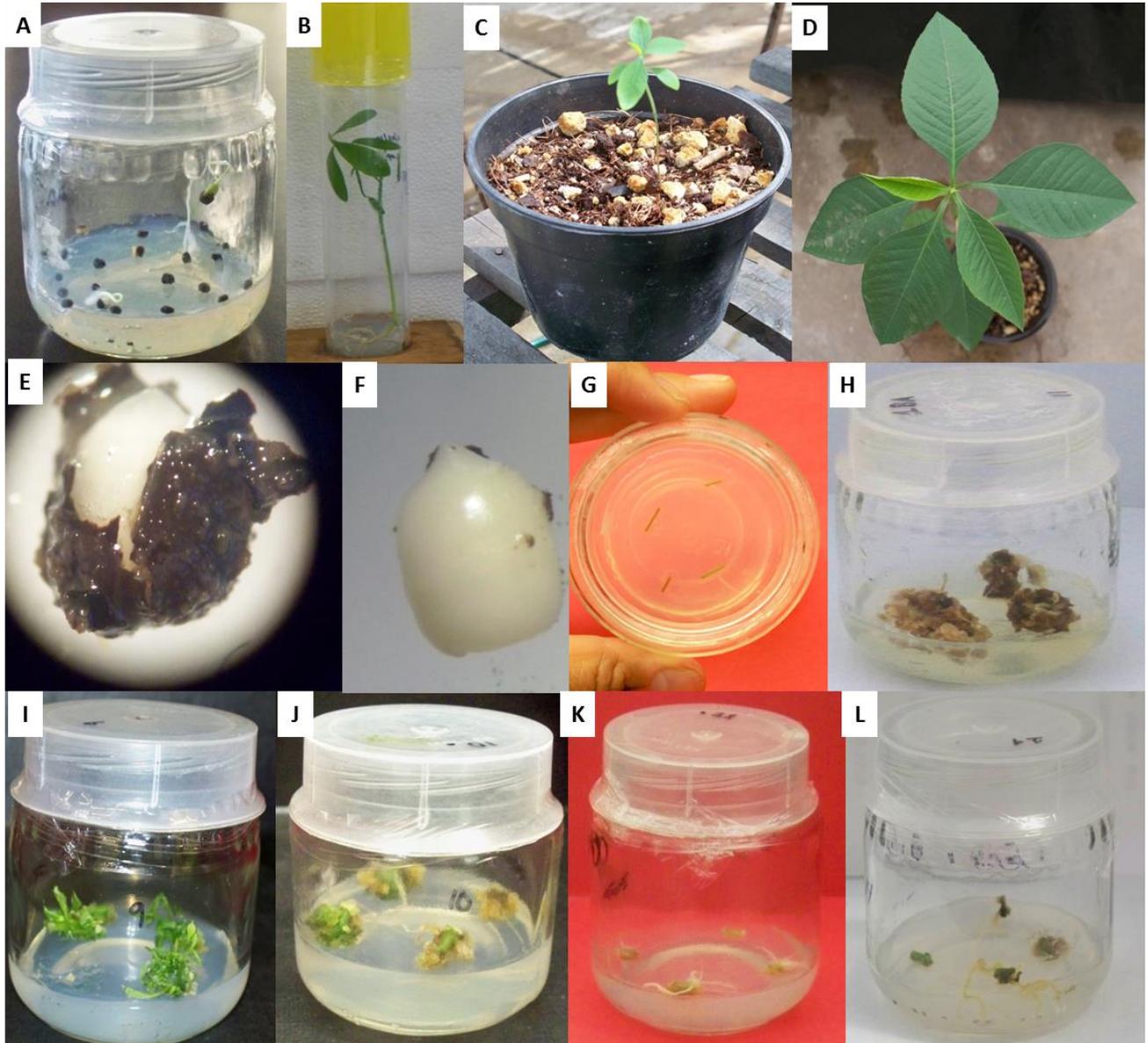
Discusión general de la revisión de la literatura, y justificación de la investigación

México tiene una riqueza florística de 23,314 especies, siendo las familias Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Cactaceae las más representadas. Desafortunadamente, investigadores de otros países (Japón, Holanda, Estados Unidos, entre otros) han colectado y mejorado genéticamente muchas especies silvestres, reingresándolas al país con patentes y debiendo pagar las regalías correspondientes. Una especie silvestre con potencial ornamental y que tiene su origen y diversificación en el país, es *E. cyathophora* que está incluida como especie prioritaria de conservación por la Red de Euphorbias del SNICS, SINAREFI. En el estado de Tamaulipas, esta especie se caracteriza por crecer en suelos someros y pedregosos sin presentar síntomas de deficiencia o problemas en la nutrición. No obstante, no existe información referente a su propagación (sexual o asexual), manejo agronómico, compuestos presentes en el látex, usos o aprovechamiento y desarrollo biotecnológico; por lo que el estudio de dicha especie constituye una oportunidad no sólo para conocer estos aspectos, sino para estudiar los microorganismos benéficos que habitan en la rizosfera de dicha especie.

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) y los hongos micorrízicos arbusculares participan activamente en la nutrición de las plantas y en su adaptación a factores bióticos y abióticos al utilizar esta biotecnología en la producción de especies vegetales (granos, hortalizas, frutales y ornamentales), se reduce la cantidad de insumos agrícolas (fertilizantes y reguladores de crecimiento). Con referencia a las especies ornamentales, *Euphorbia pulcherrima* es la más comercializada en el mundo, lo que propicia que se utilicen elevadas cantidades de fertilizante al buscar el mejoramiento de la calidad de la planta. Ante esta situación, el uso de microorganismos provenientes de una planta de la misma familia taxonómica, constituye una opción viable para mejorar la calidad de *E. pulcherrima*, y con ello, contribuir a la reducción de la contaminación del ecosistema.



CAPÍTULO I. MICROPROPAGACIÓN DE *Euphorbia cyathophora* Murray: UNA ESPECIE CON POTENCIAL ORNAMENTAL



Portada. A = Semillas de *E. cyathophora*, B = Desarrollo de *E. cyathophora* en cultivo *in vitro*, C y D = Emergencia y desarrollo de *E. cyathophora* creciendo en sustrato, E = Eliminación de testa del embrión, F = Embrión de *E. cyathophora*, G = Segmentos de tallo, H = Oxidación de tejidos, I = Brotes, J = Callo, K = Raíces y L = Raíces y callo en condiciones *in vitro*.



CAPÍTULO I. MICROPROPAGACIÓN DE *Euphorbia cyathophora* Murray: UNA ESPECIE CON POTENCIAL ORNAMENTAL

1.1 RESUMEN

Euphorbia cyathophora Murray es una especie silvestre con potencial ornamental cuya propagación y cultivo *in vitro* es desconocida; por lo que en el presente trabajo se realizaron dos experimentos para evaluar la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas, y otros dos experimentos para conocer el efecto de la luz y la mejor combinación de cuatro reguladores de crecimiento (benzilaminopurina, kinetina, 2-isopenteniladenina y thidiazurón) en combinación con ácido naftalenacético (ANA) y el efecto de ambas condiciones de luz. Las semillas de *E. cyathophora* presentaron baja germinación (10% en sustrato y 12% en medio de cultivo). El tratamiento con oscuridad y luz (OL) no promovió el crecimiento de hojas, cotiledones y altura de las plántulas. En contraste, el tratamiento con luz (CL) generó un sistema radical más desarrollado con aparición temprana de raíces terciarias. Con respecto a la interacción de los reguladores y el efecto de la luz, sólo el tratamiento con 1 mg benzilaminopurina (BAP) L⁻¹ + 0.1 mg ANA L⁻¹ generó brotes en ambas condiciones de luminosidad (OL y CL). El estímulo de oscuridad (OL) favoreció el número y longitud de raíces en casi todos los explantes en las cuatro fechas de muestreo (10, 20, 40 y 70 días) en comparación con los explantes en CL. El estímulo de oscuridad (OL) también generó mayor respuesta morfogénica vía indirecta (formación de callo) y mayor desarrollo; mientras que en CL se obtuvo menor crecimiento y desarrollo de callo en los explantes. Este estudio provee información básica de la germinación de semillas, y de la generación de callo, brotes, y raíces durante la micropropagación de *E. cyathophora*; además, esta investigación logró establecer un protocolo para propagar plantas de esta especie.

Palabras clave: Euphorbiaceae, germinación, explante, cultivo *in vitro*, fitohormonas



CHAPTER IV. MICROPROPAGATION OF *Euphorbia cyathophora* MURRAY: A WILD PLANT WITH ORNAMENTAL POTENTIAL

1.2 ABSTRACT

Euphorbia cyathophora Murray is a plant species with ornamental potential but whose *in vitro* propagation is unknown. Two experiments were carried out to evaluate seed germination and seedling growth in two substrates. In addition, two further experiments were performed to know 1) the effect of light (WL) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ luminous intensity, or darkness at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, for the first 20 days and subsequent placement in light (DKL) as previously described, and 2) the best combination of plant growth regulators: benzyl amino purine (BAP), kynetin (KIN), 2-isopentenyl adenine (2iP) and thidiazuron (TDZ) in combination with naphthalene acetic acid (NAA) and the effect of both light conditions. Seeds showed low germination (10% in substrate, and 12% in a growth medium). The DKL treatment did not promote the growth of leaves, cotyledons, or plantlet height. Contrastingly, WL produced a more developed root system with early appearance of tertiary roots. In regards to the interaction of plant regulators and light effect, only the treatment with 1 mg BAP L^{-1} and $0.1 \text{ mg NAA L}^{-1}$ generated shoots in both light conditions (DKL and WL). Darkness (DKL) favored the number and length of roots in almost all the explants in the four sampling dates (10, 20, 40, and 70 d), when compared to explants at WL. The darkness stimulus (DKL) also generated indirect greater morphogenic responses (callus formation) and greater development, while in WL conditions there was lower growth and callus development by explants. This study gives basic information about seed germination, and proliferation of callus, shoots, and roots during micropropagation of *E. cyathophora*; in addition, this research obtained an efficient protocol for propagating this plant species.

Key words: Euphorbiaceae; seed germination; explants; *in vitro* culture; phytohormones



1.3 INTRODUCCIÓN

La familia Euphorbiaceae es una de las más diversas y cosmopolitas, representada por alrededor de 8,000 especies vegetales (Webster, 2014). Taxonómicamente, esta familia se compone de cinco subfamilias y 320 géneros; y en México se reportan 250 especies del género *Euphorbia* de las 2,160 presentes en el mundo (Mayfield y Steinmann 2010; Horvath *et al.*, 2011).

De acuerdo con Rzedowski (1991), en México, muchas especies de este género pueden utilizarse con fines medicinales, forrajeros y ornamentales; desafortunadamente, pocas especies como *E. fulgens*, *E. cotinifolia* y *E. leucocephala*, se han aprovechado desde el punto de vista ornamental. Al menos 10 especies se han mejorado genéticamente fuera de nuestro territorio nacional, mismas que reingresan en forma de nuevas variedades y con registros extranjeros, como por ejemplo, *E. pulcherrima* (Villaseñor, 2016; Trejo *et al.*, 2015).

Una de las especies silvestres con potencial ornamental que se distribuye en México es *E. cyathophora* Murray, la cual presenta brácteas coloridas, dimorfismo en hojas (ovadas, lanceoladas o sublineares, enteras o dentadas, glabras o con pelos escasos), y semillas cilíndricas u ovoides de color negro (Dressler, 1961). Esta especie, es considerada como prioritaria de conservación por la red de Euphorbias del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (Colinas *et al.*, 2014). Sin embargo, poco se sabe de las características de las semillas con base en su capacidad de germinación ya que al ser una especie silvestre, no ha existido interés para propagarla o aprovecharla. Esto constituye una oportunidad para el país ya que la horticultura ornamental demanda cada año, nuevas especies para su comercialización y desafortunadamente, en la literatura no existe investigación referente al manejo agronómico, usos y metabolitos secundarios de esta planta. En relación a lo anterior, en el presente capítulo se evaluó la propagación sexual de *E. cyathophora*, así como la propagación asexual mediante la técnica de micropropagación, como alternativa para lograr el crecimiento y propagación de plántulas.



1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Obtención de material vegetal

Con base en registros de herbarios nacionales se identificaron los sitios de distribución de algunas *Euphorbias* con potencial ornamental, y se eligió a *E. cyathophora* como objeto de investigación. Se escogieron seis sitios de muestreo en el Ejido La Libertad, Sabino y Misión Unidos, Municipio de Victoria, Estado de Tamaulipas, México, donde se recolectaron plantas y semillas de esta especie para su propagación en el laboratorio (Figura 1.1).

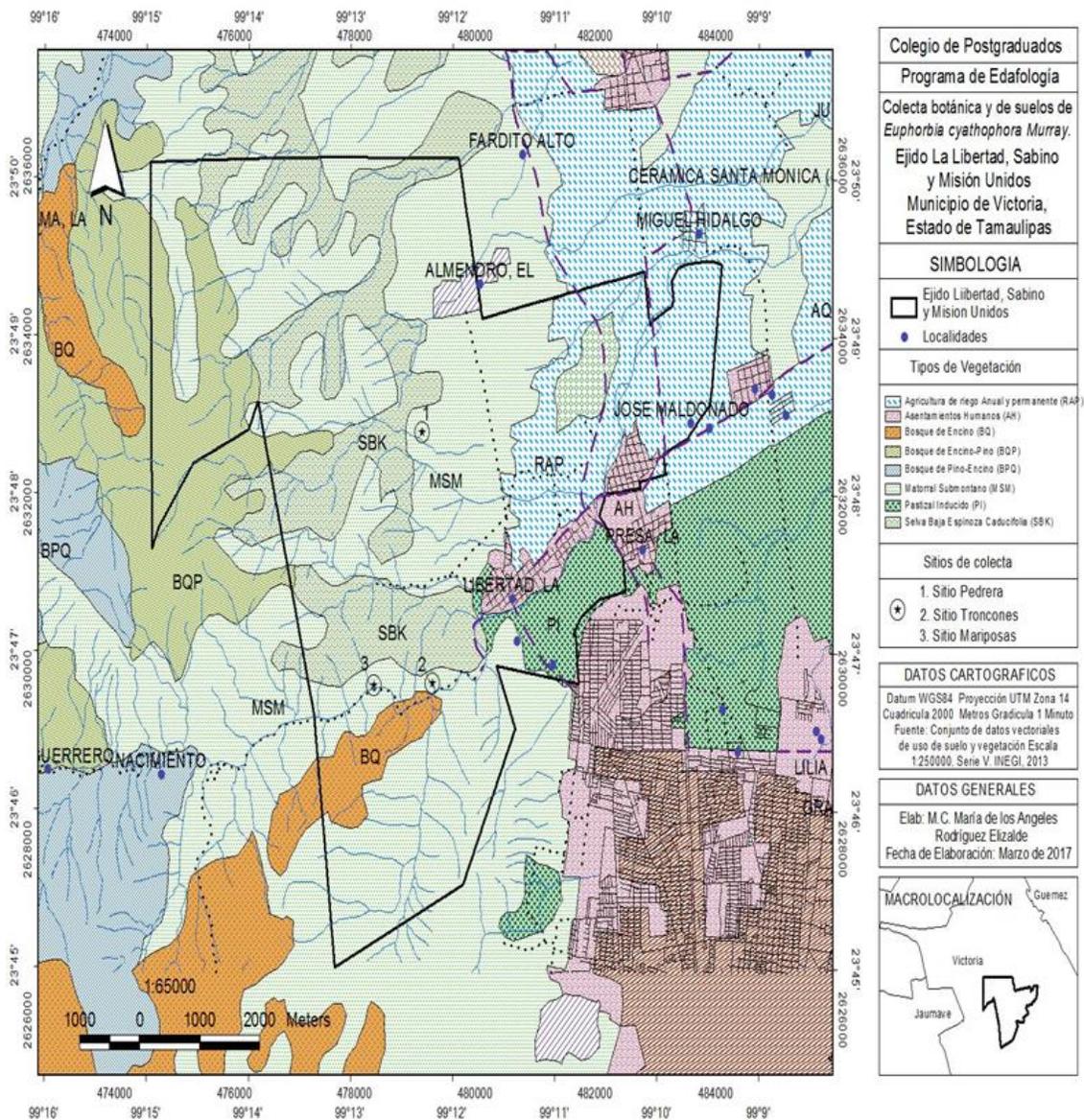


Figura 1.1. Mapa de localización de los sitios de colecta de material vegetal y suelo rizosférico de *Euphorbia cyathophora*.



1.4.2 Establecimiento, condiciones y variables para los experimentos 1 y 2

Se realizaron dos experimentos que consistieron en: 1) identificar las características de las semillas, y 2) evaluar el proceso de germinación y crecimiento de plántulas. Para lo anterior, se desinfectaron y sembraron 50 semillas en sustrato estéril (tierra de hoja + tepojal en relación 2:1 v/v), y 50 semillas en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962). Las semillas sembradas en el sustrato se mantuvieron en condiciones de invernadero (temperatura máxima de $35.7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5.4$, y mínima de $12.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.5$); las semillas sembradas en medio MS se mantuvieron a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $20\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica en un área de incubación. En ambos tratamientos se evaluó el porcentaje de germinación a partir de la siembra.

1.4.3 Establecimiento, condiciones y variables evaluadas para el experimento 3

Con base en los resultados obtenidos en el experimento 2, se propuso un tercer experimento que consistió en remojar la semilla por 24 h en una solución de ácido giberélico (AG_3) a una concentración de 200 mg L^{-1} más fungicida comercial Captan® (0.5 g L^{-1}). Posteriormente, se eliminó la testa de la semilla con bisturí bajo microscopio estereoscópico y se identificó el embrión y el endospermo. Los embriones se colocaron en frascos con medio MS sin reguladores de crecimiento, siete embriones bajo condiciones de luz (CL) a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $20\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ de intensidad lumínica. Otros siete embriones se expusieron a oscuridad (OL) a $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante los primeros 20 días y posteriormente, estos embriones se colocaron en las condiciones de luz antes descritas, para igualar condiciones de crecimiento (Figura 1.2).

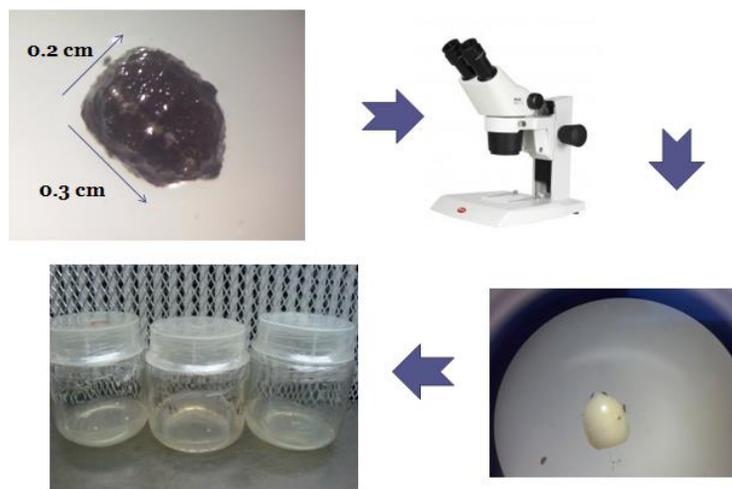


Figura 1.2. Eliminación de la testa de semillas de *Euphorbia cyathophora*.



Además de determinar el porcentaje de germinación en CL y OL, también se evaluó la altura, el crecimiento de la raíz, la longitud radical, el largo y ancho de cotiledones, el largo y ancho de hojas, y el número de hojas, en nueve fechas de muestreo (3, 5, 8, 12, 15, 19, 26, 41 y 48 días) después de la siembra *in vitro*.

1.4.4 Establecimiento, condiciones, tratamientos y variables para el experimento 4

Se realizó un cuarto experimento utilizando los explantes obtenidos del ensayo anterior. El experimento incluyó un testigo y 12 tratamientos consistentes de tres concentraciones de benzilaminopurina (BAP) (0.05, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹), tres de kinetina (KIN) (0.05, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹), tres de 2-isopenteniladenina (2iP) (0.05, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹), tres de thidiazurón (TDZ) (0.05, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹), y una concentración de ácido naftalenacético (ANA) (0.1 mg L⁻¹) aplicado para todos los tratamientos y el testigo.

Cada tratamiento consistió de seis frascos, y en cada uno de ellos se colocaron seis segmentos de tallo (explantes) de aproximadamente 0.5 cm de largo. Una vez sembrados los explantes, tres de los frascos se colocaron en condiciones de OL, y tres en CL, como se describió previamente.

Las variables evaluadas fueron tipo de expresión morfológica (diferenciación del tejido), respuesta morfogénica vía indirecta (formación de callo), número de brotes, longitud de brotes, número y longitud de raíces a los 10, 20, 40 y 70 días. Para la variable tipo de expresión morfológica, por ser no cuantificable, se asignaron los siguientes valores: 0 = sin respuesta, 1 = presencia de callo, 2 = producción de raíces, 3 = generación de brotes, 4 = producción de callo y raíz, y 5 = presencia de raíz, callo y brotes. De manera similar, a la variable respuesta morfogénica vía indirecta, se le asignaron valores, donde, 0 = sin desarrollo de callo, 1 = desarrollo inicial de callo, 2 = presencia de callo, 3 = callo en crecimiento, 4 = callo diferenciado, y 5 = callo con respuesta morfogénica (Hill, 2006; Pérez *et al.*, 2007; Ha *et al.*, 2016).

1.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico

En el primer y segundo experimentos se utilizó un diseño completamente al azar donde cada semilla fue una repetición. En el tercer experimento se consideró un diseño completamente al azar y se utilizaron 7 repeticiones por tratamiento.

Para el cuarto experimento se efectuaron análisis individuales para cada fecha de muestreo usando un diseño como parcelas divididas, donde las parcelas grandes correspondieron



a las condiciones de luz, mientras que en las parcelas chicas se aplicaron los tratamientos. Además, se realizaron análisis combinados considerando simultáneamente todas las fechas, condiciones de luz y los tratamientos, para lo cual se utilizó un modelo de diseño de parcelas subdivididas, donde las parcelas grandes fueron las fechas, las parcelas medias las condiciones de luz, y las parcelas chicas los tratamientos.

Como primera etapa del análisis se realizaron pruebas de bondad de ajuste de las variables respuesta para determinar la mejor estrategia de análisis y el modelo estadístico apropiado correspondiente a la distribución empírica de cada variable. Así, se consideró apropiado realizar los análisis con el procedimiento del modelo lineal general (GLM) de SAS (SAS Institute, 2015) y pruebas de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$).



1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Porcentaje de germinación en sustrato y medio de cultivo

En los dos primeros experimentos, se observó baja germinación (10% en sustrato, y 12% en MS) (Figura 2.3). La germinación de las semillas ocurrió a partir del décimo día después de la siembra (dds), y la última plántula en emerger en el sustrato fue hasta los 180 dds.

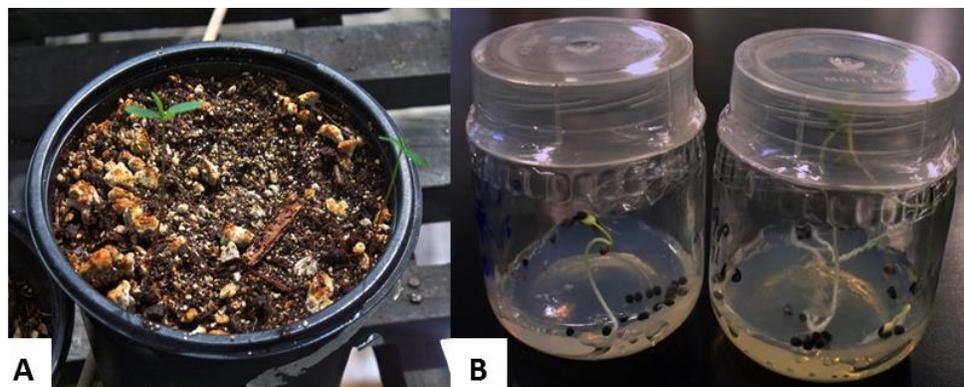


Figura 1.3. Germinación de semillas de *Euphorbia cyathophora* en sustrato (A) a los 45 días después de la siembra, y en medio de cultivo (B) a los 15 días después de la siembra.

Los resultados anteriores, muestran baja germinación de las semillas tanto en condición *in vitro* como en sustrato, indicando que éstas contienen inhibidores de la germinación, cuya presencia es común en la testa de semillas de algunos géneros ornamentales de familias botánicas como Polygonaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Linaceae, Lamiaceae, Portulacaceae, Ranunculaceae y Violaceae (Geneve 1998; Hepher y Roberts, 1985; Richmond y Ghisalberti, 1994) por lo que algunas semillas requieren de un tratamiento específico para favorecer su germinación. Por ejemplo, Baskin y Baskin (1994) removieron la testa de la semilla de *Delphinium tricorne* (familia Ranunculaceae) con lo que lograron incrementar el porcentaje de germinación. Análogamente, Hepher y Roberts (1985) removieron la testa de la semilla manualmente pero aplicaron giberelinas, logrando mejorar la germinación de *Trollius ledebourii* (familia Ranunculaceae). En otro trabajo, Sun *et al.* (2006) demostraron que al aplicar una solución de NaOH 14.4 M durante 20 h a 7 °C, se favoreció la germinación de semillas de *Iris láctea* (familia Iridaceae).



Los inhibidores presentes en semillas de plantas ornamentales son compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos). Los fenoles se disuelven en agua de imbibición presente en la cubierta de la semilla y al mismo tiempo que capturan el oxígeno presente, se oxidan en su presencia, con lo que impiden la llegada de este gas al embrión. Este proceso impide la germinación del embrión en tanto no se hayan oxidado y eliminado todos los fenoles presentes (Gendreau y Corbineau, 2009; Quirós *et al.*, 2006).

1.5.2 Porcentaje de germinación bajo condiciones de luz

En el tercer experimento, la aplicación de 200 mg kg⁻¹ AG₃ y la eliminación de la testa de las semillas resultaron en 85% de germinación en CL, y 72% en OL (Figura 1.4).

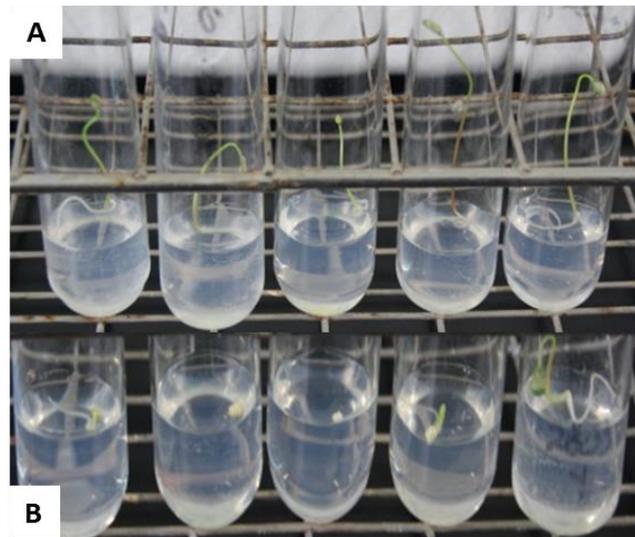


Figura 1.4. Embriones en luz (A) y oscuridad (B) a los 7 días después de la siembra en MS sin reguladores de crecimiento

El desgaste físico o eliminación de la testa de las semillas permite la entrada de agua y oxígeno, y elimina o disminuye el efecto de los inhibidores de la germinación (Raven *et al.*, 1992). En algunas especies ornamentales (*Iris lactea* e *I. sanguinae*) se requiere de la extracción de la testa y de la incisión en el endospermo para promover la germinación (Lee *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 1990).

Las giberelinas están implicadas directamente en la promoción de la germinación de las semillas (Saldívar *et al.*, 2010). Estas fitohormonas son sintetizadas en muchas partes de la



planta, especialmente en áreas de crecimiento activo como los embriones o los meristemos (Miyashima *et al.*, 2013). Por ejemplo, el ácido giberélico (AG₃) induce la síntesis de α -amilasa, enzima que desdobla reservas de almidón durante la germinación de las semillas, por lo que se considera como promotor o inductor de la germinación (Tibagu y Oden, 2001; Koornneef *et al.*, 2002). Lo anterior explica en parte, cómo el AG₃ puede romper la latencia de las semillas de *E. cyathophora*, y reemplazar con ello, la necesidad de estímulos ambientales tales como la luz y la temperatura.

1.5.3 Crecimiento de plantas en condiciones de luz (CL) y oscuridad (OL)

Los embriones en OL presentaron cotiledones menos anchos comparados con aquellos en CL; sin embargo, sólo se observaron diferencias significativas a los 41 y 48 días. La longitud de cotiledones no mostró diferencias significativas entre OL y CL (Cuadro 1.1). En condiciones de luz, los explantes mostraron mayor número de hojas con respecto a aquellos en oscuridad, en todas las fechas evaluadas. Además en CL, las hojas emergieron cuatro días antes (Cuadro 1.1). El ancho y la longitud de las hojas fue menor en OL en comparación con las hojas que se desarrollaron en CL. Además, la altura de los explantes en CL fue numéricamente mayor que aquella obtenida en condiciones de OL en todas las fechas evaluadas; pero sólo a los 8 días, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 1.1).

Si bien las variables evaluadas no mostraron diferencias estadísticas, el aspecto y tamaño de los explantes en condiciones de luz fue superior numéricamente que aquellos en oscuridad (Cuadro 1.1). En la micropropagación, la modificación de la intensidad lumínica o irradiación favorece la morfogénesis y la diferenciación de órganos en algunas especies vegetales (Hughes, 1981). Dicha modificación también disminuye la oxidación del explante, y favorece el desarrollo de la lámina foliar, la diferenciación del mesófilo, la división celular, el desarrollo de estomas, y la síntesis de clorofila (Thorpe *et al.*, 2012; Isah, 2015; De Melo *et al.*, 2011). En el presente experimento, las condiciones de oscuridad, no promovieron la aparición temprana de hojas en *E. cyathophora* o el crecimiento de explantes ya que los cotiledones y hojas fueron menores (Cuadro 1.1). Martin *et al.* (2005) encontraron resultados similares en explantes de *E. nivula* expuestos a condiciones de oscuridad, quienes encontraron inhibición de la morfogénesis en dicha especie.



Cuadro 1.1. Variables morfológicas de embriones de *Euphorbia cyathophora* en luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) en condiciones *in vitro*.

Variables	Tratamiento	Días						
		8	12	15	19	26	41	48
Ancho de cotiledón (cm)	CL	0.00	0.10 a	0.24 a	0.26 a	0.39 a	0.50 a	0.51 a
	OL	0.00	0.05 a	0.17 a	0.21 a	0.21 a	0.21 b	0.21 b
	DMS	0	0.176	0.210	0.244	0.280	0.267	0.265
Longitud de cotiledón (cm)	CL	0.00	0.19 a	0.57 a	0.67 a	0.83 a	0.87 a	0.87 a
	OL	0.00	0.08 a	0.31 a	0.59 a	0.63 a	0.66 a	0.66 a
	DMS	0	0.319	0.436	0.605	0.583	0.600	0.600
Número de hojas	CL	0.00	0.00	1.00 a	1.00 a	2.00 a	4.00 a	5.71 a
	OL	0.00	0.00	0.00 b	0.43 a	1.14 a	1.86 a	2.57 a
	DMS	0	0	0.824	0.934	1.607	2.623	3.544
Ancho de hojas (cm)	CL	0.00	0.00	0.11 a	0.16 a	0.27 a	0.41 a	0.64 a
	OL	0.00	0.00	0.00 b	0.11 a	0.20 a	0.24 a	0.27 b
	DMS	0	0	0.100	0.173	0.255	0.283	0.354
Longitud de hojas (cm)	CL	0.00	0.00	0.11 a	0.63 a	0.91 a	1.09 a	1.29 a
	OL	0.00	0.00	0.00 b	0.13 a	0.39 a	0.44 a	0.54 b
	DMS	0	0	0.100	0.510	0.676	0.701	0.737
Altura (cm)	CL	2.71 a	3.64a	4.39 a	5.73a	7.86 a	10.71 a	13.00 a
	OL	0.59 b	1.33 a	1.83 a	2.64 a	3.41 a	4.86 a	5.64 a
	DMS	1.99	2.65	3.15	3.82	4.75	6.81	7.73

DMS = Diferencia Mínima Significativa; letras diferentes en el mismo parámetro y columna muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) entre condiciones de luz (L) y con estímulo de oscuridad (OL), $n = 7$.

Las plantas que crecieron en CL mostraron mayor cantidad de raíces que aquellas que crecieron en OL (Figura 1.5A), pero sólo se encontraron diferencias estadísticas en el tercer día. La longitud radical no presentó diferencias significativas hasta los 26 días; sin embargo, a los 41 y 48 días las plantas que crecieron en CL, superaron estadísticamente a aquellas en OL (Figura 1.5B).



Es importante señalar que las condiciones de luz favorecieron la generación de raíces de tercer orden a los 19 días; en contraste, las plantas en condiciones de oscuridad generaron raíces de tercer orden hasta los 48 días. Además, las plantas que se establecieron bajo luz en todo el periodo, generaron un sistema radical más desarrollado que se manifestó en la aparición temprana de raíces terciarias. En este sentido, un mayor desarrollo radical favorece mayor absorción de nutrientes y agua, lo que promoverá un mejor crecimiento y desarrollo (Fageria, 2012). Bidarigh y Azarpour (2013) reportaron que un estímulo de oscuridad de 24 h combinado con 5 mg L^{-1} AG₃ promovió la longitud de raíces en *E. pulcherrima*.

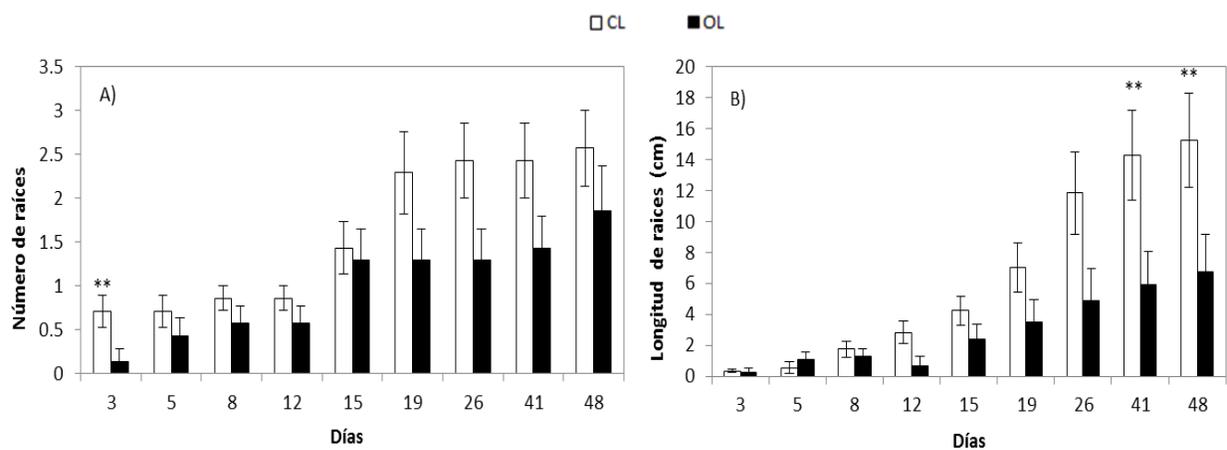


Figura 1.5. Número de raíces (A) y longitud de raíces (B) de *Euphorbia cyathophora* en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL), durante 48 días. Medias \pm error estándar. Análisis estadísticos individuales por fecha y los asteriscos muestran significancia entre tratamientos de condiciones de luz (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 7$.

1.5.4 Crecimiento *in vitro* de explantes (Experimento 4)

La Figura 1.6A muestra que únicamente el tratamiento con 1.0 mg L^{-1} BAP generó brotes en ambas condiciones de luz. La aparición de brotes inició a partir de los 10 días en CL, mientras que en OL inició a los 40 días. Además, la longitud de los brotes en CL superó estadísticamente a los que crecieron en OL (Figura 1.6B). La concentración de 1.0 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} ANA promovió el crecimiento de brotes especialmente bajo condiciones de luz (Figura 1.7).

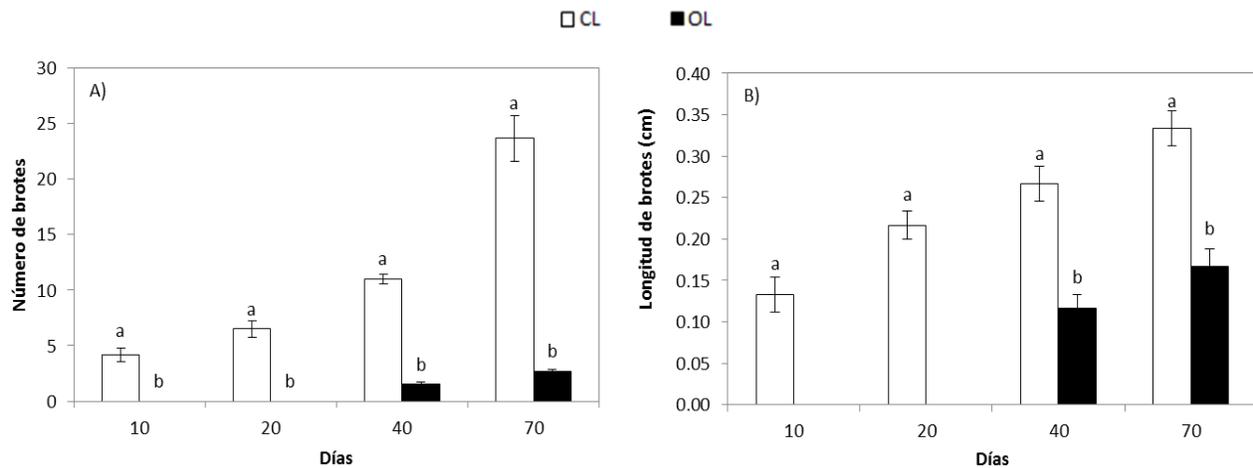


Figura 1.6. Número de brotes (A) y longitud de brotes (B) de *Euphorbia cyathophora* en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) obtenidos únicamente en el tratamiento con 1.0 mg L^{-1} BAP + 0.1 mg L^{-1} ANA, durante 70 días. Letras distintas muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$), Medias \pm error estándar, $n = 18$.

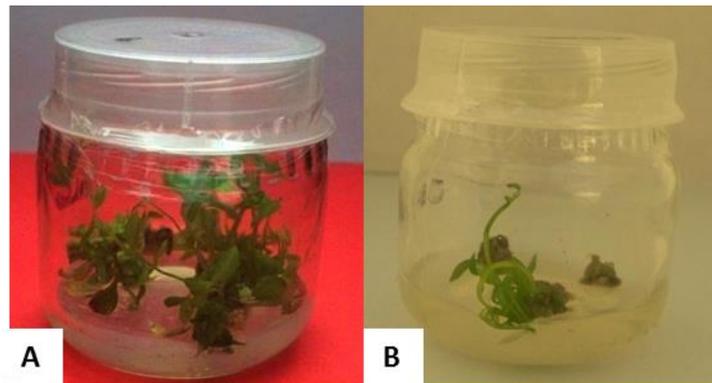


Figura 1.7. Brotes de *E. cyathophora* crecidas en medio MS enriquecido con 1.0 mg L^{-1} BAP en condiciones de luz (A) y, oscuridad (B), a los 90 días después de la siembra.

Royero *et al.* (2007) reportaron mayor número de brotes en *Dioscorea alata* (familia Dioscoreaceae) al incrementar gradualmente la dosis de BAP (0.2 , 0.5 y 1.0 mg L^{-1}). Luna *et al.* (2014) obtuvieron mayor crecimiento de brotes en *Agave americana* al probar cinco dosis de BAP; sin embargo, la aplicación de 6 mg L^{-1} BAP, resultó en brotes más pequeños y escaso desarrollo de raíces. Esto demuestra que los efectos benéficos de BAP en los explantes, están en función de la especie vegetal, el tipo de explante y la concentración utilizada. Por ejemplo, la



aplicación de 2.2 μM fue la dosis óptima de BAP para incrementar el número y longitud de tallos en *Cleistanthus collinus* (Euphorbiaceae) (Quraishi *et al.*, 1996), mientras que la combinación BAP con AIA y AIB, promovió la formación de brotes adventicios en *E. nivula* (Martin *et al.*, 2005). A los 10 días, el tratamiento con 0.1 mg L^{-1} TDZ en OL produjo mayor número de raíces; en contraste, a los 20, 40 y 70 días, el tratamiento con 1.0 mg L^{-1} BAP en OL mostró significativamente mayor número raíces que el resto de los tratamientos (Cuadro 1.2).

El tratamiento con 0.05 mg L^{-1} TDZ en OL produjo raíces de mayor longitud a los 10 y 20 días (Cuadro 1.2). A los 40 días, los tratamientos con 0.05 mg L^{-1} TDZ y 1.0 mg L^{-1} 2iP en OL, produjeron mayor longitud de raíces; mientras que a los 70 días, los tratamientos con 0.05 mg L^{-1} TDZ en OL, y el testigo (0.1 mg L^{-1} ANA) en CL, generaron mayor longitud de raíces (Cuadro 1.2).

El estímulo de oscuridad en combinación con las concentraciones de 0.1 mg L^{-1} TDZ, o de 1.0 mg L^{-1} BAP, favoreció la morfogénesis de raíces de *E. cyathophora*; mientras que la longitud de raíces fue mayor a las concentraciones 0.05 mg L^{-1} TDZ en condiciones de OL. Resulta importante señalar que entre estas variables se observó un efecto inversamente proporcional; es decir, a mayor cantidad de raíces, menor longitud de éstas. Comúnmente, el AIB se utiliza para generar raíces en explantes de especies ornamentales como *Ficus carica*, *F. benjamina*, *Gerbera jamesonii*, *Yucca aloifolia*, *Dracaena sanderiana*, *Jatropha curcas*, *Glochidion multiloculaire*, *Euphorbia antisyphilitica*, y *E. pugniformis* (Rout *et al.* 2006; Kondamudi *et al.* 2009; Aslam *et al.* 2013). Sin embargo, se tienen reportes en donde el BAP sólo o en combinación con ANA, promueve eficientemente la generación de raíces en *G. jamesonii*, *Manihot esculenta*, y *Dieffenbachia amoena* (Nhut *et al.*, 2007; Aslam *et al.*, 2013; Elsheikh *et al.*, 2013).



Cuadro 1.2. Número y longitud de raíces de *Euphorbia cyathophora* crecidas en medio de cultivo MS adicionado con cuatro reguladores de crecimiento y condiciones de luz (CL) y con estímulo oscuridad (OL).

Variables	Días	Condiciones de luz	BAP (mg L ⁻¹)			KIN (mg L ⁻¹)			2iP (mg L ⁻¹)			TDZ (mg L ⁻¹)			Testigo*	DMS
			0.05	0.1	1.0	0.05	0.1	1.0	0.05	0.1	1.0	0.05	0.1	1.0		
Número de raíces	10	CL	1.16cd	0.00d	1.50bc	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	0.00d	1.33bcd	1.47
		OL	1.16cd	0.00d	0.00d	1.00cd	0.00d	0.00d	2.66ab	0.00d	0.00d	3.00a	4.00a	0.00d	0.00d	
	20	CL	1.66de	0.00e	1.50de	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	1.83d	0.00e	0.00e	1.50de	0.00e	2.00d	1.68
		OL	1.50de	0.00e	9.00a	2.16cd	0.00e	2.33cd	2.66cd	3.00cd	2.66cd	3.83be	5.00a	0.00e	0.00e	
	40	CL	2.00de	0.00f	1.50ef	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	1.83de	0.00f	0.00f	1.50ef	0.00f	2.00de	1.63
		OL	1.66e	0.00f	9.00a	2.50cde	0.00f	2.33de	2.66cde	3.33cd	3.33cd	4.00bc	5.00b	0.00f	0.00f	
Longitud de raíces	70	CL	2.00de	0.00f	1.50ef	0.00f	0.00f	0.00f	0.00f	1.83e	0.00f	0.00f	1.50ef	0.00f	2.00de	1.58
		OL	1.66e	0.00f	9.00a	2.50cde	0.00f	2.66cde	3.00cde	3.50bcd	3.50bcd	4.00bc	5.00b	0.00f	0.00f	
	10	CL	0.20cd	0.00e	0.20cd	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.00e	0.20cd	0.14
		OL	0.40b	0.00e	0.00e	0.10de	0.00e	0.00e	0.33bc	0.00e	0.00e	0.82a	0.23cd	0.00e	0.00e	
	20	CL	0.63b	0.00g	0.20ef	0.00g	0.00g	0.00g	0.00g	0.13fg	0.00g	0.00g	0.20ef	0.00g	0.23ef	0.18
		OL	0.45bcd	0.00g	0.28def	0.45bcd	0.00g	0.28def	0.50bc	0.23ef	0.50bc	0.91a	0.36cde	0.00g	0.00g	
40	CL	0.75bc	0.00g	0.20fg	0.00g	0.00g	0.00g	0.00g	0.16fg	0.00g	0.00g	0.20fg	0.00g	0.56cd	0.26	
	OL	0.66c	0.00g	0.28ef	0.50cde	0.00g	0.61cd	0.58cd	0.23efg	0.98ab	1.08a	0.36def	0.00g	0.00g		
70	CL	0.75bcd	0.00h	0.20fgh	0.00h	0.00h	0.00h	0.00h	0.16gh	0.00h	0.00h	0.20fgh	0.00h	1.26a	0.51	
	OL	1.16cd	0.00h	0.28defgh	0.55cdefg	0.00h	0.98abc	0.71bcde	0.23efgh	1.13ab	1.33a	0.71bcde	0.00h	0.00h		

Simbología: BAP = benzilaminopurina, KIN = kinetina, 2iP= 2-isopenteniladenina y TDZ = thidiazuron. *Testigo = MS + ANA 0.1 mg L⁻¹. DMS = Diferencia Mínima Significativa. Letras diferentes entre tratamiento, condiciones de luz y fecha, muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 18.



En la micropropagación, una proporción adecuada de citocininas y auxinas promueve tanto raíces como brotes; mientras que las dosis altas de citocininas inhiben la formación de raíces (Srivastava, 2002; Davies, 2010). Por ejemplo, Lezcano *et al.* (2010) encontraron que altas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo incrementaron la cantidad de brotes en *Paeonia* sp., pero inhibieron la formación de raíces. Así, dosis de $6.66 \mu\text{M L}^{-1}$ BAP, meta-topolina (MET), y meta-metoxi-meta-topolina (MetoxiMet) incrementaron los brotes de *Paeonia* sp. var. JuRo, pero inhibieron completamente la formación de raíces.

1.5.5 Expresión morfológica de los explantes

En lo que respecta a la expresión morfológica de los explantes, la generación de callo se obtuvo en los tratamientos con 0.1 mg L^{-1} BAP, 0.1 mg L^{-1} KIN, y 1.0 mg L^{-1} TDZ, en ambas condiciones de luminosidad (Figura 1.8).

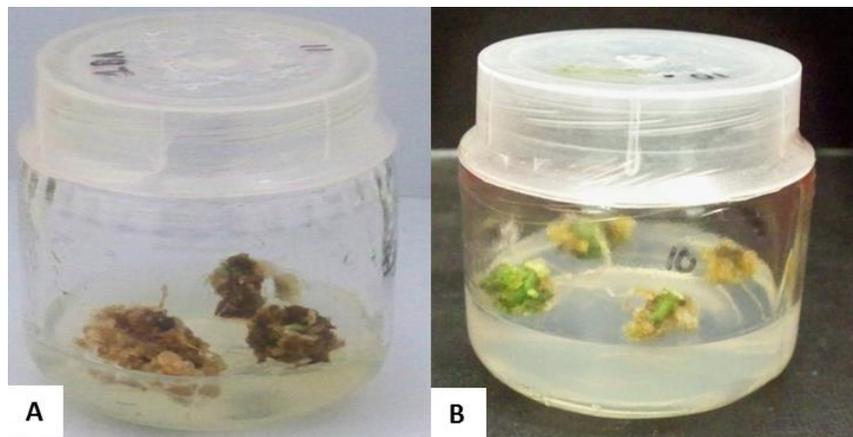


Figura 1.8. Formación de callo (expresión morfológica) en el tratamiento con 0.1 mg L^{-1} BAP en condiciones de luz (A) y oscuridad (B) a 90 días después de la siembra.

La Figura 1.9 muestra el tipo de expresión morfológica de los explantes en relación con los tratamientos en las cuatro fechas de muestreo.

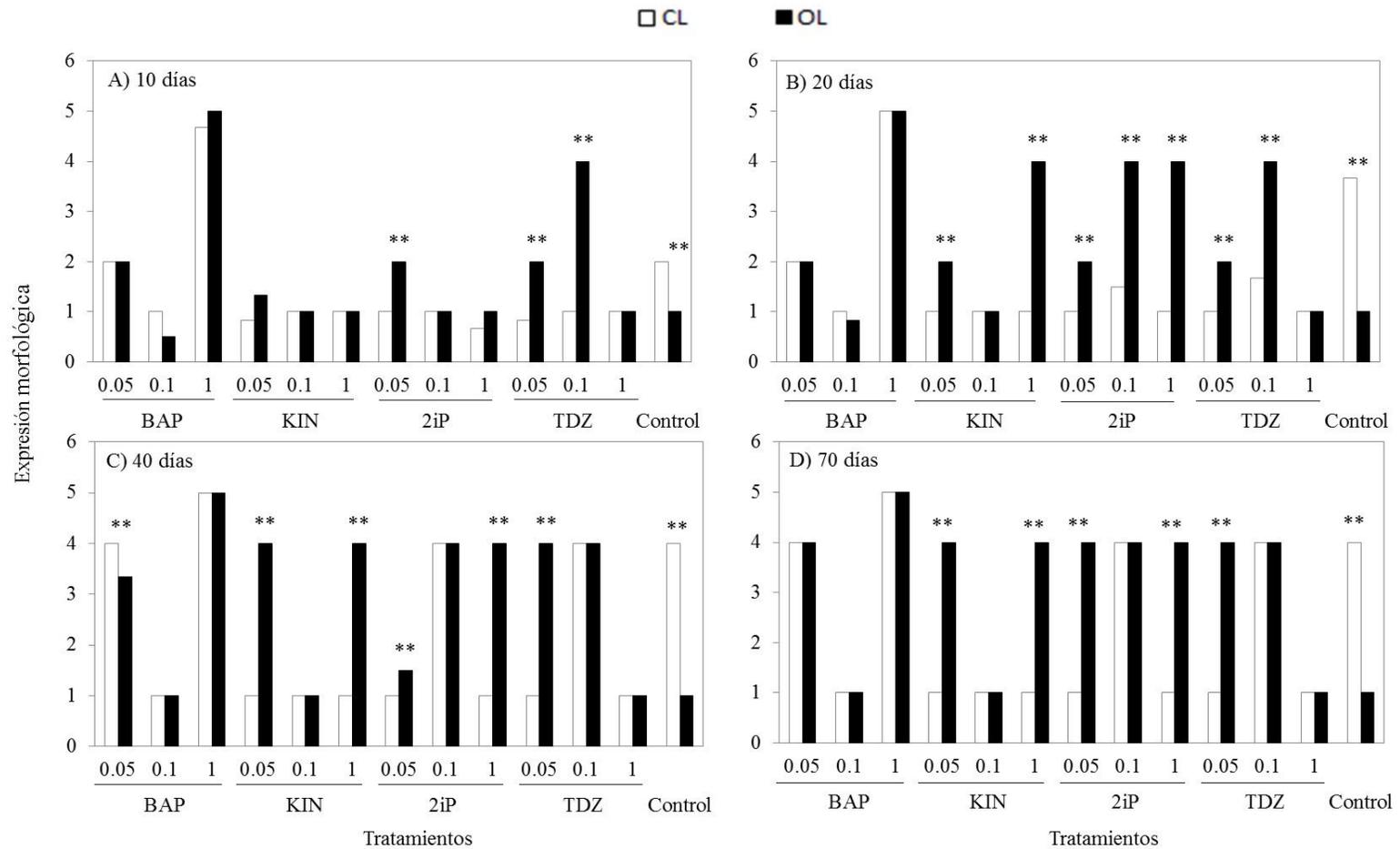


Figura 1.9. Expresión morfológica de *Euphorbia cyathophora* en función de la aplicación de reguladores de crecimiento, condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL) en cuatro fechas de muestreo. Simbología: BAP = benzilaminopurina, KIN = kinetina, 2iP = 2-isopenteniladenina y TDZ = thidiazuron. Análisis individuales por cada fecha; los asteriscos denotan significancia entre tratamientos de condiciones de luz (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 18$.



Lo anterior permite inferir que la condición de luminosidad determina la producción de callo en los explantes de *E. cyathophora*. Sin embargo, el proceso de callogénesis *in vitro*, es influido por varios factores como el tipo de explante, la especie vegetal, y la aplicación de fitohormonas en el medio de cultivo (Espinosa *et al.*, 2012).

Con el estímulo de oscuridad (OL), algunos tratamientos (0.05 mg L⁻¹ TDZ, 0.1 mg L⁻¹ TDZ, 0.05 mg L⁻¹ KIN, 1.0 mg L⁻¹ KIN, y 1.0 mg L⁻¹ 2iP) produjeron callos organogénicos donde se apreciaron raíces, en comparación con CL. Ikeuchi *et al.* (2013) mencionaron que la apariencia y el desarrollo de los callos (diferenciación y de-diferenciación) se relacionan con condiciones ambientales (temperatura y luz), y con el balance hormonal (auxinas-citocininas) en medio de cultivo. Así, una concentración intermedia de auxinas y citocininas puede inducir la formación de callo en varias especies vegetales (Krikorian, 1995). Sin embargo, en el caso de algunos miembros de la familia Euphorbiaceae, la respuesta para algunas especies ha sido variada; por ejemplo, para *E. esula* el uso de hipocótilos o callos generaron organogénesis, para *E. antisiphilitica* el uso de tallos favoreció la proliferación de más tallos, y para *E. esula* las células en suspensión generaron brotes enraizados (Kondamudi *et al.*, 2009).

1.5.6 Desarrollo de callogénesis

La callogénesis (formación de una masa de células no diferenciadas) a partir de tallos de *E. cyathophora* fue significativamente favorecida en condiciones de OL (Cuadro 1.3). A los 10 días, se observó la formación de callo verde y friable en ambas condiciones de luz. A los 20 días, OL produjo la oxidación de algunos callos; mientras que las condiciones de luz produjeron callos verdes. A los 40 días, los explantes en CL mostraron callos verdes con algunas secciones oxidadas, y en OL presentaron tallos verdes, oxidados e hiperhidratados. A los 70 días, la apariencia de los callos en CL fue verde con partes oxidadas; mientras que en OL, predominaron los callos oxidados. En general, la condición de OL generó mayor desarrollo de callo en todos los tratamientos; mientras que en CL los explantes mostraron menor callogénesis (Cuadro 1.3).



Cuadro 1.3. Respuesta morfogénica vía indirecta (formación de callo) de *Euphorbia cyathophora* en condiciones de luz (CL) y con estímulo de oscuridad (OL).

Tratamiento	Fechas de evaluación y apariencia de callos							
	10 días		20 días		40 días		70 días	
CL	1.55 b	Verde y friable	1.90 b	Verde	2.19 b	Verde y oxidado	2.57 a	Verde y pocos oxidados
OL	2.05 a	Verde y friable	2.67 a	Verde y oxidado	2.92 a	Verde, oxidado e hiperhidratado	2.86 a	Oxidado y pocos verdes
DMS	0.32		0.27		0.29		0.29	

DMS = Diferencia Mínima Significativa; Letras diferentes en cada fecha, muestran diferencias significativas (Tukey, $\alpha = 0.05$) entre condiciones de luz, n = 18.

Los reguladores de crecimiento que promovieron la callogénesis en *E. cyathophora*, fueron los siguientes: KIN (0.05, 0.1 y 1.0 mg L⁻¹), 2iP (0.05 y 1.0 mg L⁻¹), TDZ (0.05 y 1.0 mg L⁻¹) y BAP (0.1 mg L⁻¹) en CL; en contraste, la aplicación de BAP (0.1 mg L⁻¹), KIN (0.1 mg L⁻¹) y TDZ (1.0 mg L⁻¹) fueron más efectivas bajo OL. Algunas investigaciones corroboran la formación de callo en presencia de dichos reguladores; por ejemplo, la adición de 3.0 mg L⁻¹ KIN promovió la formación de callo en *Phyllanthus tenellus*, mientras que concentraciones de 1.25 a 5.0 μ M de KIN produjeron callogénesis al 100% en *P. stipulatus* (Victório *et al.* 2010). Por otra parte, la aplicación de bajas concentraciones de TDZ promueven la formación de callo en *Phaseolus lunatus*; además, las concentraciones mayores de 1.0 μ M de TDZ pueden estimular la formación de callos, tallos adventicios o embriones somáticos (Huetteman y Preece 1993). Los resultados obtenidos en la presente investigación, constituyen la base para la micropropagación de *E. cyathophora*; además, lo anterior puede contribuir significativamente en la conservación y en el mejoramiento genético de esta especie que tiene potencial ornamental y cuyos estudios de propagación son escasos.



1.6 CONCLUSIONES

Las semillas de *E. cyathophora* en sustrato o en condiciones *in vitro*, mostraron baja germinación (10% - 12%). Sin embargo, la aplicación de AG₃ y la eliminación de la testa, permitió obtener 85% de germinación de semillas en condiciones de luz, y 72% en condiciones de oscuridad.

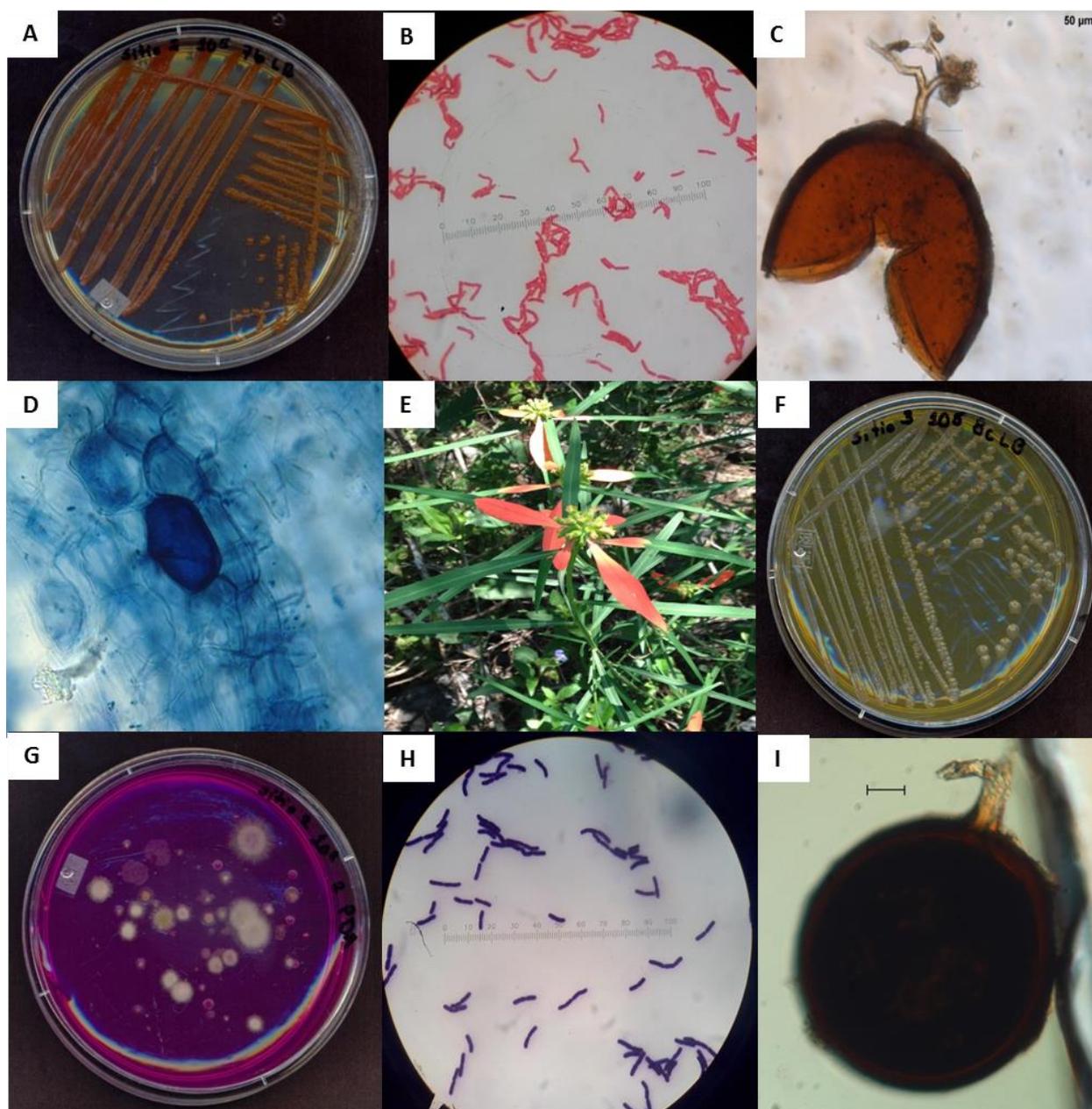
El estímulo de oscuridad (OL) en los embriones no promovió el crecimiento de cotiledones, hojas, y altura de las plantas. En contraste, la presencia de luz (CL) generó un sistema radical más desarrollado que se manifestó en la aparición temprana de las raíces terciarias.

En el cuarto experimento, la aplicación de 1.0 mg L⁻¹ BAP generó la formación de brotes en los explantes, iniciando a partir de los 10 días en CL, y a los 40 días en OL. El estímulo de oscuridad en los explantes resultó en mayor crecimiento y número de raíces. La interacción del estímulo de oscuridad en presencia de KIN, TDZ, BAP y 2iP generó mayor desarrollo de callo.

Este estudio provee información básica de la germinación de semillas, y de la generación de callo, brotes, y raíces durante la micropropagación de *E. cyathophora*. Adicionalmente, esta investigación estableció un protocolo para la obtención de plantas de esta especie silvestre con potencial ornamental.



CAPÍTULO II. MICROORGANISMOS CULTIVABLES CON POTENCIAL BENÉFICO AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE *Euphorbia cyathophora* Murray



Portada. A, F y G = Aislamientos de la rizosfera, B y H = Bacterias Gram (-) y Gram (+), D = Vesícula de hongo micorrízico arbuscular, C e I = Especies de *Glomus* y E= *Euphorbia cyathophora*.



CAPÍTULO II. MICROORGANISMOS CULTIVABLES CON POTENCIAL BENÉFICO AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE *Euphorbia cyathophora* Murray

2.1 RESUMEN

Esta investigación cuantificó microorganismos de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*, determinando características relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal. Se recolectó suelo rizósferico y raíces en tres sitios del Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas, y se cuantificaron hongos filamentosos, actinobacterias, bacterias solubilizadoras de fosfatos, bacterias productoras de índoles (AIA), y bacterias fijadoras de nitrógeno. Se seleccionaron 76 cepas bacterianas (24 cepas produjeron ácido indolacético, 30 cepas solubilizaron fosfato, y 22 cepas fijaron nitrógeno atmosférico); las bacterias se identificaron molecularmente, y se construyeron árboles filogenéticos. Además, se determinó la colonización micorrízica en raíces, y se aislaron e identificaron morfoespecies de hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Se obtuvo mayor población de bacterias en los tres sitios; sin embargo, la población de hongos filamentosos en los sitios Pedrera y Troncones fue menor. Las bacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno fueron *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (Sitio Mariposas), *Arthrobacter* sp. CPO 2.62 (Sitio Pedrera) y *Pseudomonas putida* CPO 2.68 (Sitio Troncones). Las cepas con mayor capacidad de solubilización de fosfatos fueron *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (Sitio Troncones) y *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Sitio Pedrera); en tanto que las mejores cepas productoras de AIA fueron *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Enterobacter* sp. CPO 2.33 (Sitio Pedrera) y, *Arthrobacter oryzae* CPO 2.46 (Sitio Troncones). Los géneros más representativos de HMA en los tres sitios fueron *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora*, y las especies *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* y *Septoglomus* aff. *constrictum*. Este trabajo permitió conocer la presencia de microorganismos cultivables de la rizosfera de *E. cyathophora*, permitiendo seleccionar cepas bacterianas prominentes, y conocer las morfoespecies de HMA, que tienen uso potencial como biofertilizantes en la horticultura ornamental.

Palabras clave: rizosfera, RPCV, HMA, Euphorbiaceas, poblaciones microbianas



CHAPTER II. ISOLATION OF CULTURABLE MICROORGANISMS WITH POTENTIAL BENEFITS FROM THE RHIZOSPHERE OF *Euphorbia cyathophora*

Murray

2.2 ABSTRACT

This research quantified microorganisms from the rhizosphere of *Euphorbia cyathophora*, by determining features related to the plant growth promotion. Rhizosphere soil and roots were collected from three locations at the Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas, and the filamentous fungi, actinobacteria, P-solubilizing bacteria, indole-producing bacteria, and nitrogen fixing bacteria. Seventy-six bacterial strains were selected (24 indole-producing strains, 30 P-solubilizing strains, and 22 nitrogen fixing strains); these bacteria were molecularly identified, and phylogenetic trees were constructed. Also, the root mycorrhizal colonization and the identification of morphospecies of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were determined. The three sites showed high bacterial population; however, the fungal population was low at Pedrera and Troncones sites. Bacteria with high potential for nitrogen fixation were *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (Site Mariposas), *Arthrobacter* sp. CPO 2.62 (Site Pedrera) and *Pseudomonas putida* CPO 2.68 (Site Troncones). Bacterial strains with high P-solubilizing capability were *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (Site Troncones) and *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Site Pedrera); whereas the most prominent indole-producing bacteria were *Bacillus megaterium* CPO 2.35 and *Enterobacter* sp. CPO 2.33 (Site Pedrera), and *Arthrobacter oryzae* CPO 2.46 (Site Troncones). The most representative AMF genera in the three sites were *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* and *Gigaspora*, and the morphospecies *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* and *Septoglomus* aff. *constrictum*. This study helped knowing the presence of culturable microorganisms in the rhizosphere of *E. cyathophora*, allowing the selection of prominent bacterial strains, and the identification of AMF morphospecies, which have potential utilization as biofertilizers for ornamental horticulture.

Key words: rhizosphere, PGPR, AMF, Euphorbiaceae, microbial populations



2.3 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos que habitan en la rizosfera influyen directamente en la nutrición de las plantas ya que promueven el crecimiento de las raíces mediante la producción de exudados como aminoácidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos, auxinas y flavonoides, lo que facilita la disponibilidad de elementos esenciales y agua (Dardanelli *et al.*, 2010; Calvo *et al.*, 2014). Específicamente, las bacterias promotoras del crecimiento (RPCV) actúan en la disponibilidad de macronutrientes y micronutrientes mediante la fijación biológica del N y la solubilización de minerales (P, Fe, Cu, Zn y Mn), intervienen en la aceleración de procesos de mineralización de insumos orgánicos, la síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas) y mejoran la tolerancia al estrés abiótico (sequía, salinidad y toxicidad por elementos tóxicos) (Niranjan *et al.*, 2005; Ahemad y Kibret, 2013). Algunas especies pueden suprimir el crecimiento de fitopatógenos por la producción de metabolitos inhibitorios (cianuro de hidrógeno, sideróforos o antibióticos) o por la inducción de resistencia natural de la planta (Vale *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2006).

En el caso de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), existen numerosos reportes sobre su contribución en la adquisición de elementos inmóviles (P, Zn y Cu) o de difícil acceso para las raíces de las plantas (Vaingankar y Rodrigues, 2012). Adicionalmente, las raíces micorrizadas y el micelio extraradical incrementan la superficie de absorción de las plantas hasta 90 m², lo que permite obtener agua de poros y grietas fuera de la matriz del suelo (Fortin *et al.*, 2009). Otro beneficio que aportan los HMA, es la capacidad de producir sideróforos (compuestos de bajo peso molecular con actividad quelatante) que atraen iones metálicos reduciendo la concentración en suelos contaminados con elementos tóxicos (Aguado *et al.*, 2012; Goltapeh *et al.*, 2008). Los beneficios agronómicos que se observan en las plantas inoculadas con HMA, incluyen el incremento en el peso seco y fresco de la planta, aumento del número y tamaño de las flores, aceleración de la floración y fructificación, promoción de la supervivencia durante el trasplante, poda y fase de vivero y, reducción de los daños producidos por patógenos del suelo (Hazarika y Ansari, 2007; Matysiak y Falkowski, 2010; Püschel *et al.*, 2014).

Euphorbia cyathophora Murray, es una especie silvestre con potencial ornamental que se distribuye desde Estados Unidos hasta Brasil. Sin embargo, tiene su diversificación y origen en México (Yang *et al.*, 2012; Steinmann, 2012; Rolim *et al.*, 2015) por lo que se considera una



especie prioritaria de conservación por la red de Euphorbias del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (Colinas *et al.*, 2014). En el estado de Tamaulipas, esta especie forma parte de la vegetación de selva baja caducifolia y de bosque de galería. Se adapta a suelos Leptosoles y Fluvisoles someros o superficiales, con alta pedregosidad y bajo contenido de materia orgánica, incluso puede desarrollarse en suelos menores de 5 cm de profundidad. Estas condiciones, la hacen idónea para el conocimiento y caracterización de los microorganismos que habitan en su rizosfera, por lo que en el presente trabajo se aislaron, identificaron y evaluaron bacterias cultivables con la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y producir reguladores de crecimiento; además del aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos arbusculares a partir de la rizosfera de *E. cyathophora*.



2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1 Descripción de los sitios de muestreo

De acuerdo a la distribución natural de *E. cyathophora*, se seleccionaron tres sitios de muestreo dentro del Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Municipio de Victoria, Tamaulipas.

Sitio 1. Pedrera. Se encuentra ubicado en la ladera con exposición Este (Figura 2.1). En este sitio, los suelos son leptozoles con presencia de caliza, someros y con alta pedregosidad. La vegetación es matorral submontano con vegetación secundaria, Tenaza [*Havardia pallens* (Benth.) Britton & Rose), Anacahuita (*Cordia boissieri* A.DC.) y como dominantes Mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd)], Huizache [*Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn].



Figura 2.1. Aspecto general del Sitio Pedrera, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.

Sitio 2. Troncones. Se encuentra ubicado dentro del parque ecológico, “Los Troncones”, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos (Figura 2.2). El tipo de vegetación corresponde a selva baja espinosa caducifolia y matorral submontano; las plantas se encuentran creciendo en suelos leptosoles rendzicos con menos de 10 cm de profundidad, presencia de material calizo y pendiente mayores de 45°. Especie asociada con Huizache [*Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn)], Huapilla (*Hechtia texensis* S. Watson), Huamúchil [*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth.] y Anacahuita (*Cordia boissieri* A. DC.).



Figura 2.2. Aspecto general del Sitio Troncones, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.

Sitio 3. Mariposas. Se encuentra ubicado dentro del parque ecológico, “Los Troncones”, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos (Figura 2.3).

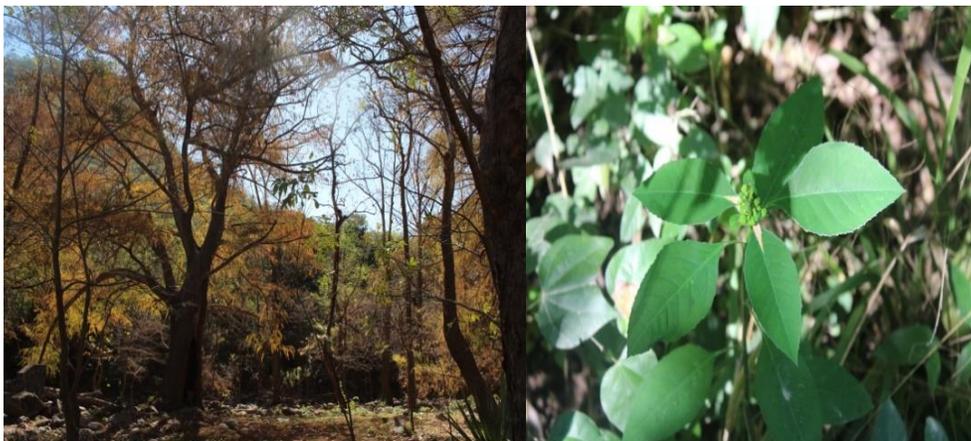


Figura 2.3. Aspecto general del Sitio Mariposas, Ejido Libertad-Misión Sabinos Unidos, Victoria, Tamaulipas.

La especie se ubica en el respaldo sur de una ladera, la cual da hacia el Río San Felipe, el cual corresponde a una corriente con flujo permanente, la vegetación donde crece es una mezcla entre Selva Baja Espinosa Caducifolia y Bosque de galería. Las plantas se encuentran creciendo en suelos calizos, someros y con alta pedregosidad. Especie asociada con Ahuehuate (*Taxodium mucronatum* Ten.), Álamo blanco [*Platanus mexicana* (Moric.)] Alamo (*Populus temuloides* L.), Huizache [(*Vachellia farnesiana* (L.)), especies del género *Opuntia*, nopales, Anacahuita (*Cordia boissieri* A.DC.), Chamal (*Dioon edule* Lindley.) y Jacubo [*Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck].



2.4.2 Muestreo del suelo rizosférico

Se recolectó suelo rizosférico y raíces de *E. cyathophora* de los tres sitios de muestreo; se colocó en bolsas de plástico y se conservaron a 4 °C hasta su transporte al laboratorio.

2.4.3 Aislamiento de microorganismos en medios específicos

Se prepararon seis medios específicos: Agar Nutritivo (Merck®, Darmstadt, Alemania), PDA + Rosa de Bengala, Czapeck, Pikovskaya (Nautiyal, 1999), Renni (Rennie, 1981) y Luria Bertanni (Bric *et al.*, 1991) para el crecimiento de bacterias totales, hongos filamentosos, actinobacterias, bacterias solubilizadoras de fosfato tricálcico, bacterias productoras de índoles, y bacterias fijadoras de nitrógeno, respectivamente. La metodología que se utilizó fue la de conteo en placa extendida y se colocó 0.1 mL de una solución de suelo y agua en relación 10 g en 90 mL de agua estéril. Una vez que se sembraron por triplicado las cajas de Petri, se colocaron en la cámara de incubación a 28 °C durante 48 h para hongos y actinobacterias, 72 h para bacterias totales, bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias productoras de índoles, y 5 días para las bacterias solubilizadoras de fosfato (Ramírez *et al.*, 2015).

Se determinó la población de microorganismos en el suelo y se procedió al aislamiento y purificación de tres grupos microbianos (bacterias solubilizadoras de fósforo, fijadoras de nitrógeno y productoras de índoles) ya que estos grupos tienen efectos benéficos en las plantas al interferir en su fisiología, sanidad y nutrición vegetal (Mendes *et al.*, 2013). Se describieron las características morfológicas de las colonias (forma, color, tamaño, borde, superficie, aspecto, elevación y consistencia) (Aquiuhatl *et al.*, 2012) y se realizó la técnica de tinción de Gram (Pirez y Mota, 2000) (Anexos 3, 4 y 5).

2.4.4 Determinación de índoles

Para las colonias de rizobacterias que crecieron en el medio Luria-Bertanni, la evaluación de índoles se efectuó primeramente por el método colorimétrico modificado de Bric *et al.* (1991) y posteriormente en aquellas que dieron positivo, la determinación se realizó por el método cuantitativo utilizando como revelador el reactivo de Salkowski y midiendo longitudes de onda en un espectrofotómetro (Synergy 2, Biotek®) a una absorbancia de 535 nm a los 24, 48 y 72 h (Gordon y Weber 1951; Hynes *et al.*, 2008).



2.4.5 Determinación de rizobacterias solubilizadoras de fósforo

Las colonias de rizobacterias que se seleccionaron del medio Pikovskaya, se caracterizaron por presentar un halo de solubilización alrededor de la colonia, el cual fue medido con un vernier (Mehta y Nautiyal, 2001). La metodología para cuantificar el fósforo liberado por la actividad bacteriana, consistió en la siembra de las cepas en medio líquido Pikovskaya considerando el fosfato de calcio tribásico como fuente de fósforo, el cual es insoluble. Cada una de las cepas se sembró en el medio líquido y se incubaron durante 5, 7 y 12 días a 28 °C. En cada fecha de incubación, se extrajo 1 mL de medio con cultivo bacteriano, se centrifugó a 3,999 g durante 10 min y el sobrenadante se filtró en papel Whatman No 1. Una vez filtrado, se tomaron alícuotas de 150 µL de sobrenadante y se colocaron en microplacas con 96 pozos. Se adicionó en cada pozo 50 µL de solución de vanadato de amonio (NH_4VO_3 0.25% en 35% HNO_3) y 50 µL de solución de molibdato ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ en 5% en agua). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Synergy 2, Biotek® a 420 nm, para lo cual se preparó una curva (20, 40, 60, 100, 150, 200, 250 y 300 µg mL⁻¹ de KH_2PO_4 a partir de una solución concentrada de 500 µg mL⁻¹ de fosfato de potasio monoamónico (KH_2PO_4) (Marinetti *et al.*, 1962).

2.4.6 Determinación de rizobacterias fijadoras de nitrógeno

Las cepas de rizobacterias que crecieron en el medio Rennie (1981) se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron por 48 h a 28 °C y 150 rpm. Posteriormente, las células se lavaron en tres ocasiones con solución isotónica de NaCl al 0.8%. Para la estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa, se realizó la prueba de reducción de acetileno (ARA) la que consistió en inocular 20 µL de las células bacterianas previamente lavadas en viales de 10 mL que contenían medio libre de N. Con una jeringa, se extrajeron 0.5 mL de aire y se inyectaron 0.5 mL de acetileno. Las muestras se incubaron por 24 h a 28 °C y al terminar este periodo, se observó el cambio de verde bromocresol a azul turquesa en algunas muestras.

Se evaluó la cantidad de etileno en las muestras que cambiaron de color en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Series II Modelo 5890, con un detector de ionización de flama, a una temperatura de 150 °C, columna Paraplot Q (25m / 0.32 mL), temperatura del horno 60 °C y temperatura del inyector 100 °C. El tiempo de retención del etileno fue de 4.5 min y se inyectaron 500 µL de la muestra comparándolo con un estándar de etileno de 20 mg kg⁻¹ (Hardy *et al.*, 1973).



2.4.7 Identificación molecular de las cepas de rizobacterias

Se aislaron y purificaron 76 cepas de rizobacterias en total (30 solubilizadoras de fósforo, 22 fijadoras de nitrógeno y 24 productoras de indoles), las que se identificaron en el Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados. La extracción de ADN se realizó mediante el método del CTAB 2% y acetato de sodio (Doyle, 1987) y la cuantificación del ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop modelo 2000c (Thermo Scientific, USA).

Se amplificó la subunidad pequeña del ADN ribosomal (16S rDNA) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con los primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Las amplificaciones se realizaron en un Thermal Cycler DNA Engine® (BioRad, México), con un ciclo inicial de desnaturalización de 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 2 min para desnaturalización a 95 °C, un alineamiento de 57 °C por 1 min, y una extensión a 72 °C por 1.3 min; y una extensión final a 72 °C por 2 min. Una vez que se realizaron las amplificaciones, se verificó el producto de PCR amplificado mediante electroforesis en un gel de agarosa.

Los productos de PCR correspondientes al 16S rDNA amplificados se limpiaron con las enzimas EXOSAP-IT (Affymetrix, USA) y posteriormente los productos se resolvieron por electroforesis capilar en un secuenciador modelo 3130 Genetic Analyser® (Applied Biosystem, USA). Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.1.3.0., creando una secuencia consenso para cada aislamiento.

La secuencia consenso se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias consenso se copiaron en un archivo Word en las que se incluyeron secuencias de referencia y una secuencia de una especie fuera de grupo (Arquea).



2.4.8. Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias consenso del archivo Word se seleccionaron y copiaron en el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016) con la opción de crear un nuevo alineamiento. Las secuencias se alinearon con el ClustalW incluido en el mismo programa. Para obtener secuencias de la misma longitud se cortaron en ambos extremos y los archivos se exportaron con extensión fasta (formato de fichero informático basado en texto, utilizado para representar secuencias de ácidos nucleicos y péptidos, los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra) y mega.

La construcción del árbol filogenético se realizó con inferencia bayesiana utilizando el programa MrBayes para lo cual se convirtió el archivo meg en archivo nexus, los archivos con esta extensión se abrieron en MrBayes versión 3.2.6 (<http://mrbayes.sourceforge.net/>) con la finalidad de obtener los árboles filogenéticos mediante inferencia Bayesiana, cuidando que la desviación estándar fuera < 0.01 . Finalmente, cada uno de los archivos se modificaron en el programa Fig Tree versión 1.4.3 (2016) y se editaron nuevamente en Mega 7 para obtener los árboles filogenéticos finales.

Debe mencionarse que las cepas de rizobacterias aisladas de *E. cyathophora* se enviaron para su conservación al CNRG para su depósito y resguardo.

2.4.9. Aislamiento e identificación de hongos micorrízicos (HMA)

Se extrajeron raíces finas de 15 plantas y se evaluaron mediante la técnica de clareo y tinción propuesta por Phillips y Hayman (1970). Para extraer las esporas, 10 g de suelo rizosférico se tamizó y decantó por la técnica de Gerdemann y Nicolson (1963). La identificación de los géneros y especies de los HMA se basó en la caracterización morfológica de las esporas (color, tamaño, ornamentaciones, número de capas de la pared celular), así como la forma de la hifa de sostén. Se realizaron preparaciones que contenían de 10 a 20 esporas, éstas se observaron en el estereoscopio (marca Leika EZ4D). Posteriormente, se tomaron fotos en el microscopio óptico Olympus, Modelo BX5, Japón. Las esporas se compararon con la base de datos del International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) (www.invam.wvu.edu) y del Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), *Endogone* and *Complexipes* species de la Universidad de Agricultura en Szczecin, Polonia (<http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/>).



2.4.10 Análisis estadísticos

Para las cepas de rizobacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo, productoras de índoles, el porcentaje de colonización micorrízica y vesículas, se realizaron análisis estadísticos individuales para cada uno de los sitios, así como análisis combinados a través de los sitios. Para la cuantificación de los microorganismos se realizaron análisis estadísticos individuales en cada sitio y combinados a través de los tres sitios. Además de los análisis de varianza también se realizaron comparaciones múltiples de medias usando la diferencia significativa honesta de Tukey ($\alpha = 5\%$). Todos los análisis se efectuaron usando el modelo lineal general mediante el procedimiento GLM del software Statistical Analysis System (SAS, Institute, 2015).



2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Población de microorganismos de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*

Las poblaciones de microorganismos de la rizosfera de *E. cyathophora*, se presentan en el Cuadro 2.1. La cuantificación de microorganismos en el sitio Pedrera, fue mayor para el número de bacterias totales y las bacterias fijadoras de nitrógeno. En contraste, la población de hongos fue menor estadísticamente comparada con los demás grupos de microorganismos. En el sitio Troncones, se encontró mayor población de bacterias productoras de índoles y bacterias fijadoras de nitrógeno; mientras que las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato fueron reducidas. Finalmente, para el sitio Mariposas, se observó mayor población de bacterias solubilizadoras de fósforo y menor cantidad de hongos y actinobacterias. Al realizar una comparación de los tres sitios, la población de bacterias, incluyendo a las fijadoras de nitrógeno y productoras de índoles, fue semejante en los tres sitios de muestreo; no obstante, se encontró menor población de hongos en los sitios Pedrera y Troncones (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Población de microorganismos cultivables cuantificados en la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* (UFC x g⁻¹ suelo seco).

Grupo microbiano cuantificado	Pedrera	Troncones	Mariposas	DMS
	UFC X 10 ^{exp}			
Bacterias totales	1.25 ⁶ b	8.74 ⁵ c	1.92 ⁶ a	182915
Hongos totales	8.15 ³ a	4.44 ³ b	1.08 ⁴ a	2951
Actinobacterias	6.25 ⁵ a	4.33 ⁵ b	1.25 ⁴ c	34005
Productores de índoles	1.09 ⁶ a	1.31 ⁶ b	2.36 ⁶ a	218240
Fijadoras de nitrógeno	1.25 ⁶ a	1.45 ⁶ a	4.19 ⁶ a	6.37 ⁶
Solubilizadoras de fosfatos	1.45 ⁵ b	8.57 ⁴ b	4.97 ⁶ a	616572

*UFC = Unidades formadoras de colonias. DMS = Diferencia Mínima Significativa, letras diferentes dentro de la misma fila significa que hay diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 3$.

El pH del suelo afecta las actividades de las comunidades microbianas y los procesos biogeoquímicos (Porta *et al.*, 2014) por lo que existe una fuerte evidencia de que el suelo es un factor determinante de la diversidad bacteriana y la estructura de la comunidad a escala global (Nicol *et al.*, 2008; Smith y Doran, 1996; Timmusk *et al.*, 2011). Por ejemplo, el pH en el cual se desarrollan las bacterias es de 5 a 9, siendo el óptimo de 7; mientras que el pH en el que se desarrollan los hongos es de 2 a 7, siendo el óptimo 5. Al respecto, el pH de los tres sitios fluctuó



de 7.3 a 7. Estos valores de pH, se relacionan con la baja población de hongos en los tres sitios, y una población de bacterias similar en los tres sitios.

Al comparar los microorganismos encontrados en cada sitio y los análisis químicos de los suelos (Anexo 1), se determinó que el sitio Mariposas presentó mayor contenido de materia orgánica (20.6%), carbono orgánico (11.9%), fósforo inorgánico (35.7 mg kg^{-1}), zinc (10 mg kg^{-1}) y magnesio ($3.14 \text{ Cmol (+) kg}^{-1}$) en comparación con los otros dos sitios. Además, la relación C/N se estimó en 24.48 y de acuerdo a los valores presentados por la NOM-021-SEMARNAT-2000, en dicho suelo existe un equilibrio del nitrógeno mineral y el liberado para las plantas. Lo anterior corrobora la mayor población de bacterias solubilizadoras de fosfatos y de hongos presentes en este sitio.

El sitio Pedrera mostró la mayor capacidad de intercambio catiónico (CIC) ($46.85 \text{ Cmol (+) kg}^{-1}$) y el mayor porcentaje de nitrógeno total en el suelo (0.660) (Anexo 1); mientras que la concentración de fósforo fue la más baja de los tres sitios (11.7 mg kg^{-1}), pero de acuerdo a los parámetros de fertilidad de suelos de la NOM-021-SEMARNAT-2000 para suelos neutros a alcalinos, los valores son clasificados como altos. El fósforo es un elemento poco disponible para las plantas debido a su baja solubilidad en el suelo (Alcantar *et al.*, 2012). Sin embargo, en la rizosfera es común encontrar bacterias solubilizadoras de fosfatos que participan activamente en la nutrición de las plantas al hacer disponible el fosfato (Corrales *et al.*, 2014). Lo anterior explica la población de solubilizadoras de fosfato presentes los tres sitios de muestreo. Martínez *et al.* (2008) indicaron que la CIC es una propiedad química del suelo estrechamente vinculada a su fertilidad que depende de los coloides inorgánicos (arcillas cristalinas, geles amorfos, óxidos y sesquióxidos de hierro y aluminio) y del contenido de materia orgánica. Al respecto, en el sitio Pedrera se encontraron valores altos de Na y K disponibles para las plantas y contenidos elevados de materia orgánica.

Finalmente, el sitio Troncones presentó los valores más bajos de materia orgánica (7.5%), N total (0.340%), CIC ($16.90 \text{ Cmol (+) kg}^{-1}$), Zn (2 mg kg^{-1}) y Mn (15 mg kg^{-1}) en comparación de los otros sitios. No obstante, de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 los valores de estas variables son clasificados de adecuados a altos.



2.5.2 Aislamiento de cepas de rizobacterias productoras de ácido indolacético de *Euphorbia cyathophora*

Entre las bacterias de la rizosfera de *E. cyathophora* se encontraron 24 cepas de rizobacterias productoras de AIA (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram de bacterias productoras de AIA aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio de aislamiento	Identificación y clave	Descripción microscópica	Tinción Gram
Pedrera	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.33	Diplobacilos con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Bacillus endophyticus</i> CPO 2.34	Bacilos largos en cadena	Gram (+)
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	Bacilos largos en cadena	Gram (+)
	<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 2.36	Estafilococos	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.37	Bacilos curvos con un extremo más fino	Gram (-)
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.38	Bacilos cortos, diplobacilos	Gram (+)
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.39	Bacilos curvos, diplobacilos	Gram (+)
Troncones	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.40	Bacilos largos en cadena	Gram (+)
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.41	Bacilos largos en cadena	Gram (+)
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.42	Bacilo largo en cadena, estreptobacilo	Gram (+)
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.43	Bacilos curvos, diplobacilo	Gram (+)
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.44	Bacilos cortos en cadena	Gram (-)
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.45	Bacilos cortos con extremo redondeado	Gram (+)
	<i>Arthrobacter oryzae</i> CPO 2.46	Bacilos curvos en forma de coma	Gram (+)
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.47	Bacilos cortos	Gram (-)	
Mariposas	<i>Bosea</i> sp. CPO 2.48	Bacilos delgados, un poco curvos	Gram (-)
	<i>Staphylococcus sciuri</i> CPO 2.49	Estafilococos	Gram (+)
	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.50	Bacilo con forma de V, con gránulos	Gram (+)
	<i>Acinetobacter</i> sp. CPO 2.51	Bacilo	Gram (-)
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> CPO 2.52	Bacilo	Gram (-)
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.53	Bacilo con extremo en punta	Gram (+)
	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.54	Bacilo con extremo redondeado	Gram (+)
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.55	Diplobacilos delgados y ligeramente curvos	Gram (+)
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.56	Diplobacilos	Gram (-)



De las 24 cepas de rizobacterias aisladas, se encontró mayor cantidad de cepas Gram (+). Francis *et al.* (2010) mencionaron que las bacterias Gram (+) tienen potencial en la agricultura ya que algunas especies de los géneros *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, *Streptomyces* y *Corynebacterium* promueven el desarrollo de las plantas al secretar auxinas que inducen la proliferación de raíces; mientras que *Bacillus* y *Rhodococcus* pueden inmovilizar metales tóxicos e incrementar la disponibilidad del hierro. En bacterias, la capacidad de sintetizar auxinas se conoce desde la época de los 90's; sin embargo, recientemente se conocieron las vías de biosíntesis y se estimó que el 80% de las bacterias sintetizan ácido indol-3-acético (AIA) siendo el triptófano el principal precursor (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

2.5.3 Cuantificación de ácido indolacético producido por rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*

Con respecto a la concentración de AIA producido a las 24 h por las 24 cepas bacterianas (Cuadro 2.3), se encontró que *Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Enterobacter* sp. CPO 2.33 (Sitio Pedrera) y *Arthrobacter oryzae* CPO 2.46 (Sitio Troncones) produjeron mayor cantidad de AIA que el resto de las cepas bacterianas. Este comportamiento se repitió a las 48 y 72 h. *Bacillus megaterium* CPO 2.35 fue la especie que produjo mayor concentración de ácido indolacético ($263.20 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante el experimento. Esta cantidad supera las concentraciones reportadas por Hynes *et al.* (2008) y Mohite (2013), lo que refleja la potencialidad del uso de esta cepa para futuras investigaciones.

Durante las tres evaluaciones, la producción de ácido indolacético no mostró una tendencia semejante ya que las bacterias se comportaron de manera diferencial. Especies como *Pseudomonas* sp. CPO 2.37, *Microbacterium oxydans* CPO 2.38 y *Microbacterium* sp. CPO 2.39 (Sitio Pedrera), *Bacillus megaterium* 2.40, *Microbacterium* sp. CPO 2.43, *Stenotrophomonas rhizophila* CPO 2.44, *Bacillus* sp. CPO 2.45 y *Bosea* sp. CPO 2.48 (Sitio Troncones), *Rhodococcus* sp. CPO 2.50, *Rhodococcus* sp. CPO 2.54 *Acinetobacter* sp. CPO 2.51 y *Acinetobacter lwoffii* CPO 2.52 (Sitio Mariposas) incrementaron paulatinamente la concentración de ácido indolacético a las 24, 48 y 72 h; en tanto que, *Enterobacter* sp. CPO 2.33, *Bacillus endophyticus* CPO 2.34 y *Bacillus megaterium* CPO 2.35 (Sitio Pedrera) y, *Arthrobacter oryzae*



CPO 2.46 (Sitio Troncones) incrementaron la concentración a las 48 h y disminuyeron a las 72 h. Otras especies como *Bacillus simplex* CPO 2.42, *Staphylococcus sciuri* CPO 2.49 y *Stenotrophomonas rhizophila* CPO 2.47 (Sitio Troncones), *Microbacterium* sp. CPO 2.53 y *Stenotrophomonas rhizophila* CPO 2.56 (Sitio Mariposas), presentaron una concentración alta que disminuyó en las evaluaciones restantes.

Cuadro 2.3. Concentración de AIA por rizobacterias productoras de índoles en los tres sitios de muestreo ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Sitio de muestreo	Identificación y clave	$\mu\text{g mL}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
Pedrera	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.33	104.70 b	137.54 b	93.19 b
	<i>Bacillus endophyticus</i> CPO 2.34	11.07 fghi	15.36 efghij	14.28 gh
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	225.80 a	263.20 a	243.17 a
	<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 2.36	0.21 i	0.21 j	2.38 hij
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.37	20.77 def	29.78 ef	43.09 de
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.38	15.72 fge	25.92 efghi	33.06 ef
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.39	5.49 ghi	6.11 fghij	16.77 g
Troncones	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.40	27.16 d	29.78 ef	50.70 d
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.41	0.00 i	0.74 j	0.00 j
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.42	7.56 ghi	1.92 j	0.34 ij
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.43	5.16 ghi	9.20 efghij	12.28 ghij
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.44	12.90 fgh	29.59 efg	64.96 c
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.45	1.95 ih	27.16 efgh	33.98 ef
	<i>Arthrobacter oryzae</i> CPO 2.46	94.50 b	104.11 c	97.58 b
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.47	1.26 i	0.00 j	0.00 j
	<i>Bosea</i> sp. CPO 2.48	0.28 i	14.11 efghij	30.47 f
	<i>Staphylococcus sciuri</i> CPO 2.49	0.41 i	0.00 j	0.00 j
Mariposas	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.50	0.00i	5.85 ghij	13.62 gh
	<i>Acinetobacter</i> sp. CPO 2.51	0.41i	3.10 j	12.87 ghi
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> CPO 2.52	4.77 ghi	5.79 ghij	11.03 ghij
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.53	6.57 ghi	5.66 hij	5.10 ghij
	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.54	6.54 i	6.61 efghij	15.00 g
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.55	25.19 de	31.03 e	33.72 ef
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.56	71.16 c	67.32 d	65.81 c
DMS	11.39	23.82	12.58	

DMS = Diferencia Mínima Significativa, letras diferentes dentro de la misma hora (columna) significa que hay diferencias estadísticas (Tuckey $\alpha = 0.05$), $n = 3$.



En la literatura científica, se ha mencionado la presencia de muchas especies bacterianas promotoras de crecimiento (*Rhizobium*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Arthobacter*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas* y *Acetobacter*). Al respecto, Schmidt *et al.* (2012) y Egamberdieva *et al.* (2016) reportaron a *Stenotrophomonas rhizophila* como una especie endófito y de vida libre capaz de habitar en la rizosfera de diversas especies como algodón, tomate, pimiento morrón, haba, chicharo, soya y frijol. Además, esta especie puede adaptarse a condiciones elevadas de salinidad en el suelo y promover el crecimiento vegetal al fijar nitrógeno y producir hormonas. Otra especie donde se ha reportado la promoción del crecimiento de plántulas de canola y tomate es *Pseudomonas putida* (Patten *et al.*, 2002). Dicha cepa puede producir ácido indolacético, sideróforos y reducir la producción de etileno debido a la síntesis del ácido aminociclopropan-1-carboxílico (ACC)-desaminasa.

Los rizobios, también pueden sintetizar AIA a través de diferentes vías, por lo que la presencia de esta hormona se relaciona en los procesos de formación de nódulos en las leguminosas, homeostasis de la planta y el transporte de nutrimentos a largas distancias (Spaepen y Vanderleyden, 2011).

2.5.4 Aislamiento de rizobacterias solubilizadoras de fosfato de *Euphorbia cyathophora*

En lo que se refiere a las bacterias solubilizadoras de fosfato, se aislaron 30 bacterias de la rizosfera de *E. cyathophora*. De éstas, 21 rizobacterias fueron Gram (-) y 9 Gram (+) (Cuadro 2.4).

Los géneros Gram (-) más representativos fueron *Pseudomonas* y *Enterobacter*; mientras que para las Gram (+) fue *Bacillus*. Respecto a la bibliografía consultada, las bacterias Gram (-) han sido mayormente estudiadas; así, el principal mecanismo de solubilización de fosfato es mediante la oxidación extracelular de la glucosa a través de la quinoproteína glucosa deshidrogenasa a ácido glucónico (Krishnaraj y Dahale, 2014).

Corrales *et al.* (2014) indicaron que el género *Bacillus* es el más representativo del grupo de solubilizadores de fosfato y se encuentra en el suelo, agua, vegetales y aire; además, posee diversos mecanismos de supervivencia como la formación de esporas centroméricas ante situaciones adversas, hasta encontrar las condiciones favorables para su crecimiento.



Cuadro 2.4. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram en rizobacterias solubilizadoras de fosfato aisladas de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio de aislamiento	Identificación y clave	Descripción microscópica	Tinción de Gram
Pedrera	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.1	Bacilo	Gram (+)
	<i>Pantoea</i> sp. CPO 2.25	Bacilo con extremo en punta	Gram (-)
	<i>Mycobacterium</i> sp. CPO 2.26	Diplobacilos largos, ligeramente curvos	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.28	Bacilo curvo	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.2	Bacilos con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Rhodococcus fascians</i> CPO 2.3	Bacilos con un extremo en punta,	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.4	Bacilos que se agrupan	Gram (-)
Troncones	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	Diplobacilos extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.6	Bacilo largo en cadenas	Gram (+)
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.7	Bacilo en cadena, con gránulos de PBH	Gram (+)
	<i>Pseudomonas putida</i> CPO 2.8	Bacilo	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.9	Bacilo corto	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.10	Bacilo en cadenas y extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CPO 2.11	Bacilo que forma cadenas de 2 y 3	Gram (-)
	<i>Curtobacterium</i> sp. CPO 2.29	Bacilos largos extremos redondeados	Gram (+)
	<i>Leclercia adecarboxylata</i> CPO 2.12	Estafilococos	Gram (-)
Mariposas	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.13	Bacilo corto	Gram (-)
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.14	Bacilo corto con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.15	Bacilo corto, extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.16	Bacilo en cadena, extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.17	Bacilo en cadena	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.18	Bacilo corto, extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.30	Diplobacilos delgados, extremo en punta	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.19	Bacilos con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.20	Bacilo corto, extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.21	Bacilo en forma de cadena	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.22	Bacilo curvo	Gram (-)
	<i>Mycobacterium septicum</i> CPO 2.31	Estafilococo	Gram (+)
<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.23	Bacilos	Gram (+)	
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.24	Bacilos	Gram (-)	

Sharma *et al.* (2013) mencionaron que dentro de la biodiversidad de bacterias solubilizadoras de fosfatos, es común encontrar especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Sin embargo, también se han reportado otras especies de los géneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Azotobacter*, *Xanthomonas*,



Enterobacter, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Xanthobacter*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azospirillum* y *Erwinia* (Sharma *et al.*, 2013; Paredes y Espinosa, 2010). En la presente investigación, además de las bacterias mencionadas por Sharma *et al.* (2013), también se encontraron especies de los géneros *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Leclercia* y *Stenotrophomonas*. Esto indica la variabilidad y coincidencia de aislamientos de microorganismos con respecto a otros trabajos.

El fósforo (P) es el segundo elemento esencial que las plantas requieren para su desarrollo ya que es componente de fosfolípidos, ADN, ARN y ATP. Desafortunadamente, en el suelo, el P es fácilmente convertido en complejos insolubles como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y de fosfatos de Ca o Mg en suelos alcalinos. Al respecto, las bacterias presentan mecanismos de solubilización de fosfatos como la liberación de compuestos complejantes o disolventes minerales (ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, CO₂), presencia de enzimas extracelulares y liberación de P durante la degradación del sustrato (Paredes y Espinosa, 2010; Sharma *et al.*, 2013; Oteino *et al.*, 2015).

Específicamente, las bacterias Gram (-) son muy eficientes para solubilizar fosfatos debido a que producen ácidos en el periplasma por una vía de oxidación directa de glucosa (DOPG, oxidación no fosforilante) (Oteino *et al.*, 2015). También se ha reportado que estas bacterias son eficaces y potencialmente importantes en la biotecnología por su cualidad de oxidación extracelular de glucosa a ácido glucónico mediante la vía enzimática (quinoproteína glucosa deshidrogenasa) (Rodríguez *et al.*, 2000).

2.5.5 Cuantificación de la solubilización de fosfatos por rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*

En el proceso de selección de cepas que solubilizan fosfato, la primera etapa es una evaluación en cajas Petri conteniendo medio Pikovskaya el cual tiene como fuente al fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂). En esta técnica, se seleccionan bacterias que son capaces de crecer utilizando este compuesto como fuente de energía y como consecuencia, producir un halo de solubilización sobre el medio sólido (Nautiyal, 1999; Anand *et al.*, 2016).

De las 30 rizobacterias que se aislaron *Pseudomonas* sp. CPO 2.18 y *Mycobacterium septicum* CPO 2.31 (Sitio Mariposas), presentaron los mayores halos de solubilización con respecto de las demás cepas aisladas, a los 5 y 12 días después de la siembra (Cuadro 2.5).


 Cuadro 2.5. Evaluación de los halos de solubilización (cm) producidos por rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio de aislamiento	Identificación y clave	Halos de solubilización (cm)	
		5 días	12 días
Pedrera	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.1	0.40 bcd	0.42 bc
	<i>Pantoea</i> sp. CPO 2.25	0.16 jkl	0.20 hi
	<i>Mycobacterium</i> sp. CPO 2.26	0.13 kl	0.1 j
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.28	0.10 l	0.15 ij
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.2	0.42 bc	0.42 bc
	<i>Rhodococcus fascians</i> CPO 2.3	0.29 defgh	0.45 bc
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.4	0.10 l	0.28 efgh
Troncones	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0.17 ijkl	0.22 ghi
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.6	0.43 bc	0.45 bc
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.7	0.33 bcdefg	0.37 cde
	<i>Pseudomonas putida</i> CPO 2.8	0.34 bcdf	0.40 cd
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.9	0.19 hijkl	0.23 fghi
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.10	0.28 efghi	0.32 def
	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CPO 2.11	0.40 bcd	0.44 bc
Mariposas	<i>Curtobacterium</i> sp. CPO 2.29	0.22 ghijk	0.27 fghi
	<i>Leclercia adecarboxylata</i> CPO 2.12	0.25 fghij	0.28 efgh
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.13	0.20 hijkl	0.28 efgh
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.14	0.24 fghij	0.31 defg
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.15	0.22 ghijk	0.29 efgh
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.16	0.24 fghij	0.32 def
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.17	0.35 bcdef	0.39 cd
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.18	0.58 a	0.64 a
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.30	0.20 hijkl	0.23 ghij
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.19	0.32 cdefg	0.37 cdef
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.20	0.10 l	0.20 hi
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.21	0.10 l	0.15 ij
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.22	0.15 jkl	0.20 hi
<i>Mycobacterium septicum</i> CPO 2.31	0.44 b	0.50 b	
<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.23	0.18 hijkl	0.20 hi	
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.24	0.38 bcde	0.43 bc	
	DMS	0.11	0.09

DMS = Diferencia Mínima Significativa. Letras diferentes dentro de la misma fecha de evaluación significa que hay diferencias estadísticas (Tukey $\alpha = 0.05$), $n = 3$.



A los 5 días, las rizobacterias con menores valores fueron *Pseudomonas* sp. CPO 2.20 y *Pseudomonas* sp. CPO 2.21 (Sitio Mariposas), *Pseudomonas* sp. CPO 2.28 y, *Pseudomonas* sp. CPO 2.4 (Sitio Pedrera); mientras que a los 12 días *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Sitio Pedrera) presentó los menores halos de solubilización con respecto de las demás cepas aisladas (Cuadro 2.5). Algunos estudios han catalogado al género de *Pseudomonas* como una excelente solubilizadora de fosfato. Sin embargo, Panhwar *et al.* (2012) reportaron que dependiendo de la especie la solubilización de fosfatos puede ser de 35 mg mL⁻¹ en *P. cepacia*, hasta 156 mg mL⁻¹ en *P. striata*. Incluso, en muchos artículos no se menciona la concentración de fosfato liberado.

Para la solubilización de fosfatos a los 5 y 7 días, se encontró que las cepas con significativamente mayor capacidad de solubilización fueron *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Sitio Pedrera), *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y, *Bacillus megaterium* CPO 2.6 (Sitio Troncones) con respecto al resto de las cepas bacterianas. A los 5 días, 21 cepas aún no presentaron actividad, siendo *Pseudomonas* sp. CPO 2.2, *Mycobacterium* sp. CPO 2.26, *Pantoea* sp. CPO 2.25 (Sitio Pedrera), *Bacillus megaterium* CPO 2.6 y *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (Sitio Troncones) las únicas que mostraron solubilización de fosfatos. A los 7 días con excepción de *Pseudomonas* sp. CPO 2.20 (Sitio Mariposas), todas las bacterias presentaron dicha actividad (Figura 2.4).

A los 12 días, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 superó estadísticamente a *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Sitio Pedrera) y a *Pseudomonas moraviensis* CPO 2.1 (Sitio Troncones). En contraste, los valores más bajos de solubilización se encontraron en *Pantoea* sp. CPO 2.25 y en *Pseudomonas* CPO 2.2 del Sitio Pedrera (Figura 2.4).

Al respecto, Anand *et al.* (2016) y Satyaprakash *et al.* (2017) indicaron que los géneros más citados, con mayor capacidad para solubilizar fósforo son *Enterobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, lo que refuerzan los resultados obtenidos.

Como se mencionó, el fósforo es un elemento esencial para las plantas; sin embargo, presenta problemas de solubilidad dependiendo del pH. Así, en suelos que presentan un pH de neutro a alcalino (presentes en los tres sitios de investigación) el P será fijado por los coloides del suelo y su solubilidad será reducida. Singh y Satyanarayana (2011) describieron que el P inorgánico (PO₄⁻) puede ser fijado por el calcio; por lo que un factor importante en la disponibilidad del P es el contenido de materia orgánica presente en el suelo, ya que ésta contiene componentes orgánicos (fosfolípidos, ácidos nucleicos, fitatos, fosfomonoésteres y



fosfodiésteres) los que deben ser hidrolizados a formas inorgánicas por la actividad bacteriana antes de ser absorbidos por las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999; Corrales *et al.*, 2014).

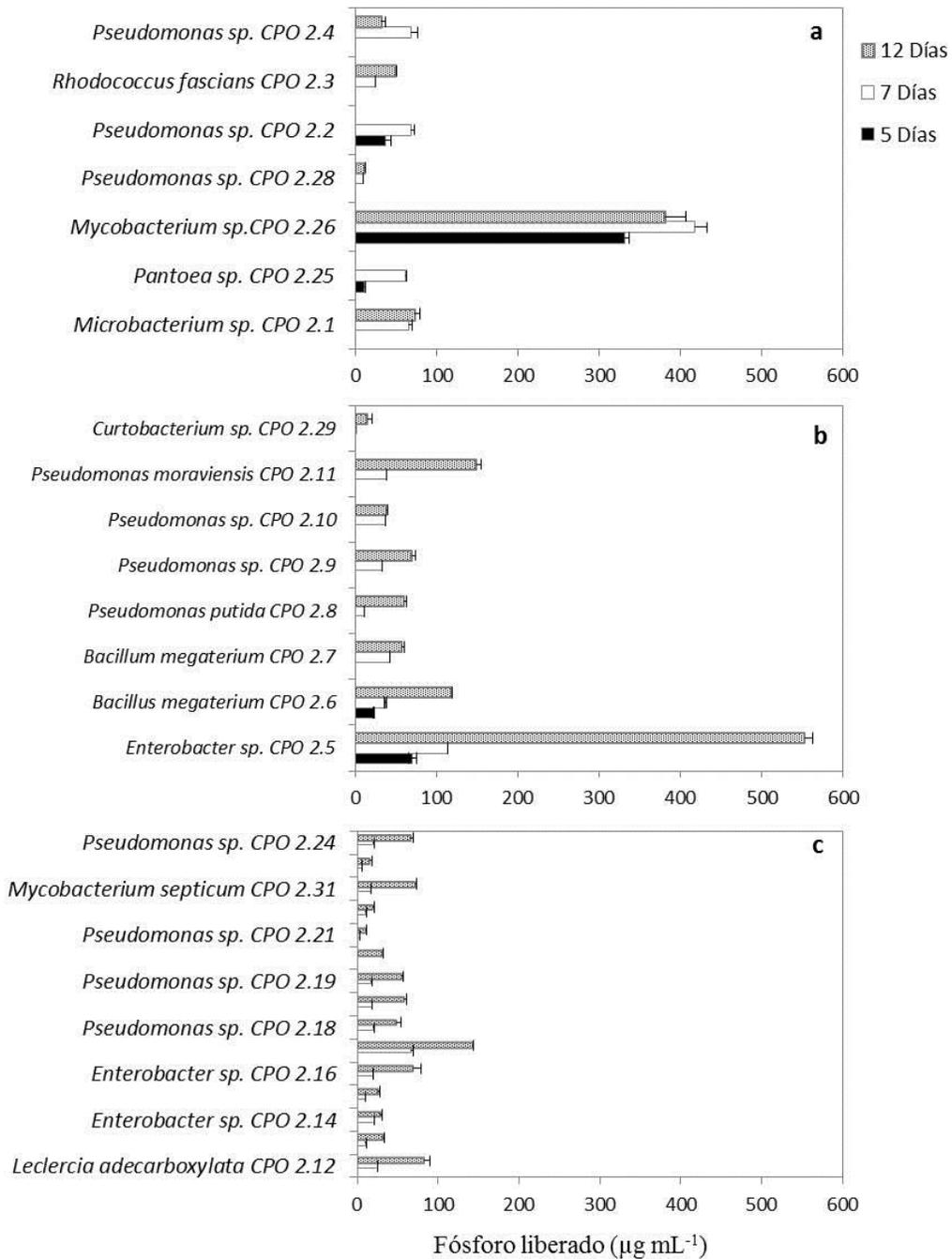


Figura 2.4. Capacidad de solubilización de fosfatos por rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*. Simbología: a = Sitio Pedrera, b = Sitio Troncones, c = Sitio Mariposas. Medias \pm error estándar. Comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$), $n = 4$.



La hidrólisis de la mayoría de los compuestos orgánicos que contienen fosfatos depositados en el suelo, se debe principalmente a las enzimas fosfatasas. Dicha actividad microbiana, se ha detectado en diferentes tipos de suelos y la rizosfera de maíz, avena, trigo, pastos, arroz y árboles. Las bacterias involucradas son *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Singh y Satyanarayana, 2011).

Al comparar el pH de los suelos colectados en la rizosfera de *E. cyathophora*, lo más lógico sería encontrar suelos deficientes en fósforo. No obstante, los suelos presentaron un contenido de fósforo que fluctuó entre adecuado a alto (11.7 a 35.7 mg kg⁻¹) (NOM-021-SEMARNAT-2000). Dicho nivel de fósforo se relaciona estrechamente con el elevado contenido de materia orgánica (7.5 a 20.6 %) y se deduciría que las cepas de rizobacterias descritas en el Cuadro 2.4 hidrolizan compuestos orgánicos.

En la bibliografía existen diversos métodos para seleccionar microorganismos solubilizadores de fósforo inorgánico aislados del suelo. Fernández *et al.* (2005) recomendaron que para la elección del método adecuado es necesario conocer que algunos microorganismos que solubilizan fosfato en condiciones de laboratorio, no son capaces de hacerlo en suelos vertisoles con pH alcalinos. Lo anterior, se debe a la baja secreción de ácidos orgánicos que producen los microorganismos en estas condiciones de alcalinidad. Además, es necesario incorporar soluciones amortiguadoras a los medios de cultivo para evitar errores en la investigación (Andersson *et al.*, 2015).

2.5.6 Rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Euphorbia cyathophora*

En el Cuadro 2.6 se describen las características microscópicas de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

De las 22 cepas de rizobacterias que se aislaron, 16 son Gram (-) pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Variovorax* y *Stenotrophomonas*; mientras que 6 son Gram (+), pertenecientes a los géneros son *Arthrobacter*, *Microbacterium* y *Gordonia*.

Cuadro 2.6. Descripción de la morfología microscópica y tinción de Gram en rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio de aislamiento	Identificación	Descripción microscópica	Tinción Gram
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.57	Diplobacilos	Gram (-)
Pedrera	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.58	Diplobacilos cortos con extremos redondeados	Gram (+)
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.60	Bacilos delgados en cadena y ligeramente curvos	Gram (-)
	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.62	Bacilos largos y curvos	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.63	Bacilos con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.64	Bacilos cortos, ligeramente curvos	Gram (+)
Troncones	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.65	Diplobacilos delgados, extremos redondeados, ligeramente largos	Gram (-)
	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.66	Bacilo corto, extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.67	Diplobacilos cortos	Gram (+)
	<i>Pseudomonas putida</i> CPO 2.68	Bacilos en cadena, delgados y agrupados	Gram (-)
	<i>Shinella</i> sp. CPO 2.69	Diplobacilos curvos y en cadena	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.70	Bacilos cortos	Gram (-)
	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.71	Bacilos curvos en forma de coma, en cadena de 2	Gram (-)
Mariposas	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.72	Bacilo corto en cadena	Gram (-)
	<i>Variovorax</i> sp. CPO 2.73	Bacilos largos con extremos redondeados	Gram (-)
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.74	Diplobacilos cortos en forma de punta	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.75	Diplobacilo delgado, ligeramente curvo	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.76	Diplobacilos, extremos redondeados, ligeramente delgados	Gram (-)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	Diplobacilos cortos	Gram (-)
	<i>Gordonia terrae</i> CPO 2.79	Bacilos delgados y curvos, agrupados	Gram (+)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.80	Bacilos agrupados en cadenas	Gram (-)
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.81	Bacilos largos, delgados y curvos	Gram (-)



Francis *et al.*, (2010) mencionaron que las bacterias Gram (-) son las más extensamente estudiadas ya que por décadas se consideró a *Rhizobium* como la única especie simbiótica formadora de nódulos radicales y capaz de fijar nitrógeno atmosférico para las plantas. Sin embargo, en la actualidad a dicho género se le han agregado diversas especies como *Burkholderia*, *Ensifer*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga* y *Ochrobactrum*, etc., lo que ha influido en su frecuente estudio (Willems, 2006; Andrews y Andrews, 2017). A partir de la década de los 80's, géneros como *Clostridium* y *Bacillus* (Gram +) y *Azotobacter* (Gram -), fueron objeto de investigación, y se comprobó la fijación de nitrógeno sin necesidad de formar una asociación con las plantas (Seldin *et al.*, 1983).

Las bacterias responsables de la fijación de nitrógeno son llamadas diazotróficas; éstas codifican la nitrogenasa, que es el complejo enzimático que cataliza la conversión del gas N₂ en amoníaco. Los procesos altamente específicos y más eficaces para la fijación del nitrógeno, implican la formación de nódulos radicales en leguminosas y no leguminosas (Seldin *et al.*, 1983; Santi *et al.*, 2013). Dentro de las rizobacterias diazotróficas que se han identificado se encuentran *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum* y *Glucenobacter* (Santi *et al.*, 2013).

En la literatura se reportan diversos métodos directos e indirectos para la medición de la fijación del N₂. Dentro de los métodos indirectos se tiene a la masa nodular, contenido de Leg-hemoglobina en nódulos, suministro de carbohidratos a la raíz, contenido de ureidos y la reducción de sustratos de N alternativos. El único método que permite distinguir la contribución relativa del nitrógeno del suelo, fertilizante y atmósfera al nitrógeno total de la planta son los análisis isotópicos del N¹⁵. Desafortunadamente, esta técnica a pesar de ser confiable y de que se obtienen valores cuantitativos e integrados del N₂ fijado, es onerosa por los altos costos del isótopo y los instrumentos para su detección (Grageda *et al.*, 2003).

2.5.7 Estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa en rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*

Una metodología que se utiliza con frecuencia es la estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa, es la prueba de reducción de acetileno (ARA) (Hardy *et al.*, 1973; Tindall *et al.*, 2007). El fundamento de esta técnica consiste en la semejanza de las enzimas involucradas en la fijación de nitrógeno en diferentes organismos y la habilidad de la enzima para reducir una amplia variedad de sustratos (cianuro, acetileno y compuestos con triples enlaces). La



metodología consiste en la reducción del acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4) llevada a cabo por la enzima nitrogenasa. La reducción es cuantificada con un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama. Este método se ha utilizado para determinar la fijación de nitrógeno *in situ* en muestras de suelo, bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas y bacterias de vida libre (Rice y Paul, 1971; Somasegaran y Hoben, 1985; Maness y Weaver, 2001; Husen, 2016; Knowles, 2013).

La Figura 2.5 muestra que las cepas que tuvieron significativamente mayor actividad de la enzima nitrogenasa fueron *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (Sitio Mariposas), *Arthrobacter* sp. CPO 2.62 (Sitio Pedrera) y *Pseudomonas putida* CPO 2.68 (Sitio Troncones); mientras que las cepas con menor actividad fueron *Arthrobacter* sp. CPO 2.58 y *Stenotrophomonas rhizophila* CPO 2.57 (Sitio Pedrera) y, *Pseudomonas* sp. CPO 2.76 (Sitio Mariposas).

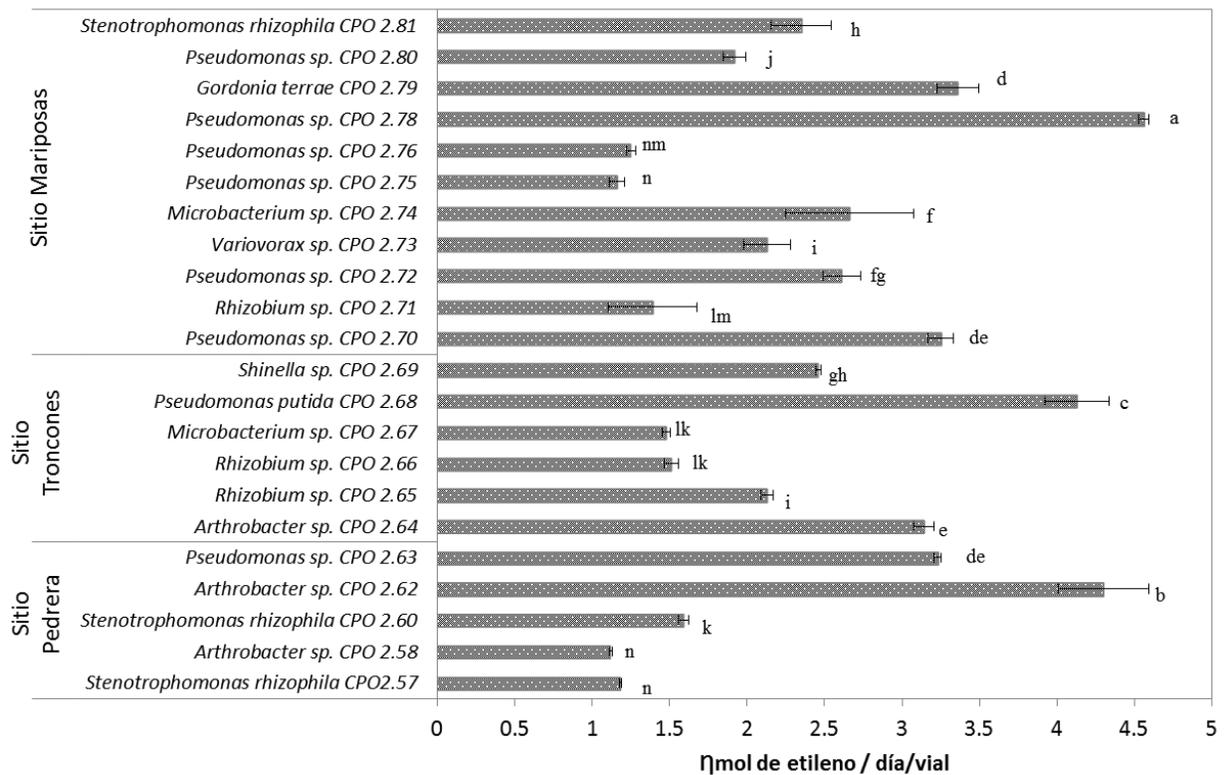


Figura 2.5. Estimación de la actividad de la enzima nitrogenasa en bacterias diazotróficas aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 4$.



Al respecto, Egamberdieva *et al.* (2016) indicaron que especies del género *Pseudomonas*, son altamente eficientes en la promoción del crecimiento de las plantas aún bajo condiciones de salinidad, por lo que en suelos con alto contenido de materia orgánica (como el caso de los tres sitios de esta investigación) su efecto será potencializado. De igual forma, Fernández *et al.* (2017) reportaron que el género *Arthrobacter* es muy común en la rizosfera de las plantas ya que promueven el crecimiento vegetal al fijar el N₂. Además, se tienen reportes que algunas especies bacterianas pueden degradar moléculas aromáticas, compuestos organoclorados y plaguicidas; incluso, el establecimiento y adaptación de *Arthrobacter* es altamente eficiente en suelos salinos o después de un incendio (Shi *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2017; Devers *et al.*, 2014).

En relación a las cepas de bacterias encontradas en los tres sitios, se verificó en fuentes bibliográficas, que las 22 cepas de rizobacterias pueden fijar N₂. Kumar *et al.* (2015) y Shin *et al.* (2016) reportaron la actividad nitrogenasa en *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Rhanella*, entre otras especies. Otras especies como *Gordonia*, *Shinella*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Variovorax* y *Microbacterium* también pueden fijar nitrógeno (Kayasth *et al.*, 2014; Bomfeti *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2001; Burns y Hardy, 2012; Palaniappan *et al.*, 2010).

2.5.8 Filogenia de las rizobacterias aisladas de *Euphorbia cyathophora*

Para la identificación de las cepas de rizobacterias del suelo, existen diversas técnicas basadas en propiedades bioquímicas (descripción de morfología celular, tinción de Gram, capacidad para crecer en condiciones aerobias o anaerobias y la determinación de requerimientos de sustratos especiales). Sin embargo, para la caracterización de especies, subespecies, serovariedades o cepas, se deben realizar técnicas más sensibles y específicas, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que identifica una secuencia única en el ADN el cual puede compararse en el GenBank y posteriormente, realizarse árboles filogenéticos (Moreno y Galvis, 2013). En el presente trabajo se identificaron molecularmente a las cepas bacterianas que se extrajeron de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* procediéndose a realizar el correspondiente árbol filogenético de acuerdo con los grupos fisiológicos de las bacterias (fijadoras de nitrógeno,



solubilizadoras de fosfato, y productoras de ácido indolacético). En cada árbol se separaron las rizobacterias de acuerdo a la tinción Gram y acompañando a la especie se adicionó un número que corresponde a la clave interna de registro del laboratorio (Figuras 2.6, 2.7 y 2.8). Adicionalmente, debajo de la especie se colocó la especie más cercana filogenéticamente de acuerdo a la base de datos del GenBank y para lograr contrastar el árbol se colocó una especie fuera de grupo (*Halobacterium rubrum*).

Debe mencionarse que al menos 10 cepas bacterianas sólo se identificaron a nivel género, por lo que en próximos trabajos se podrían realizar las pruebas necesarias para poder clasificar dichas especies.

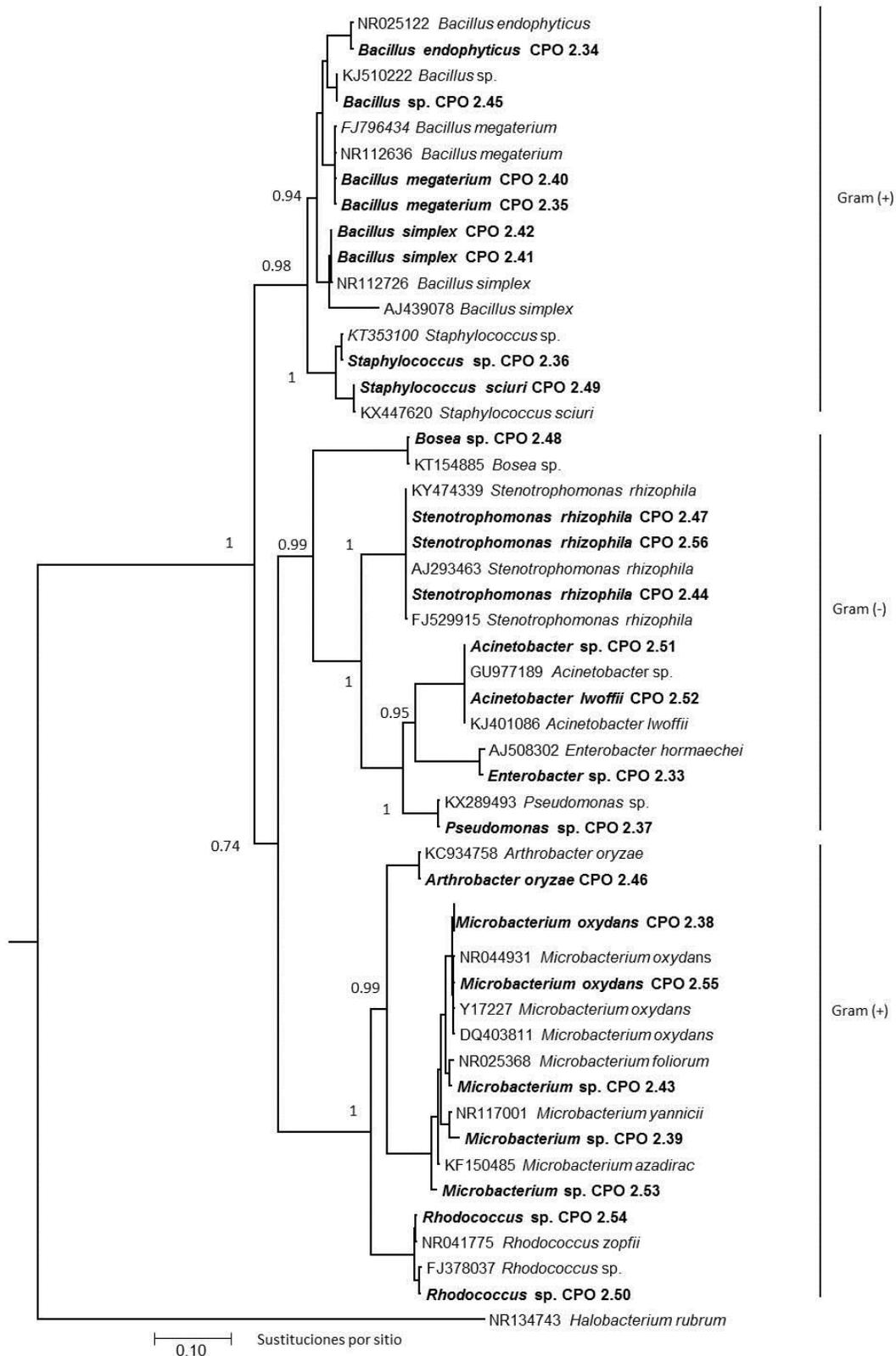


Figura 2.6. Árbol filogenético de las rizobacterias productoras de índoles aisladas de *Euphorbia cyathophora*. En negritas se encuentran las 24 rizobacterias aisladas en esta investigación.

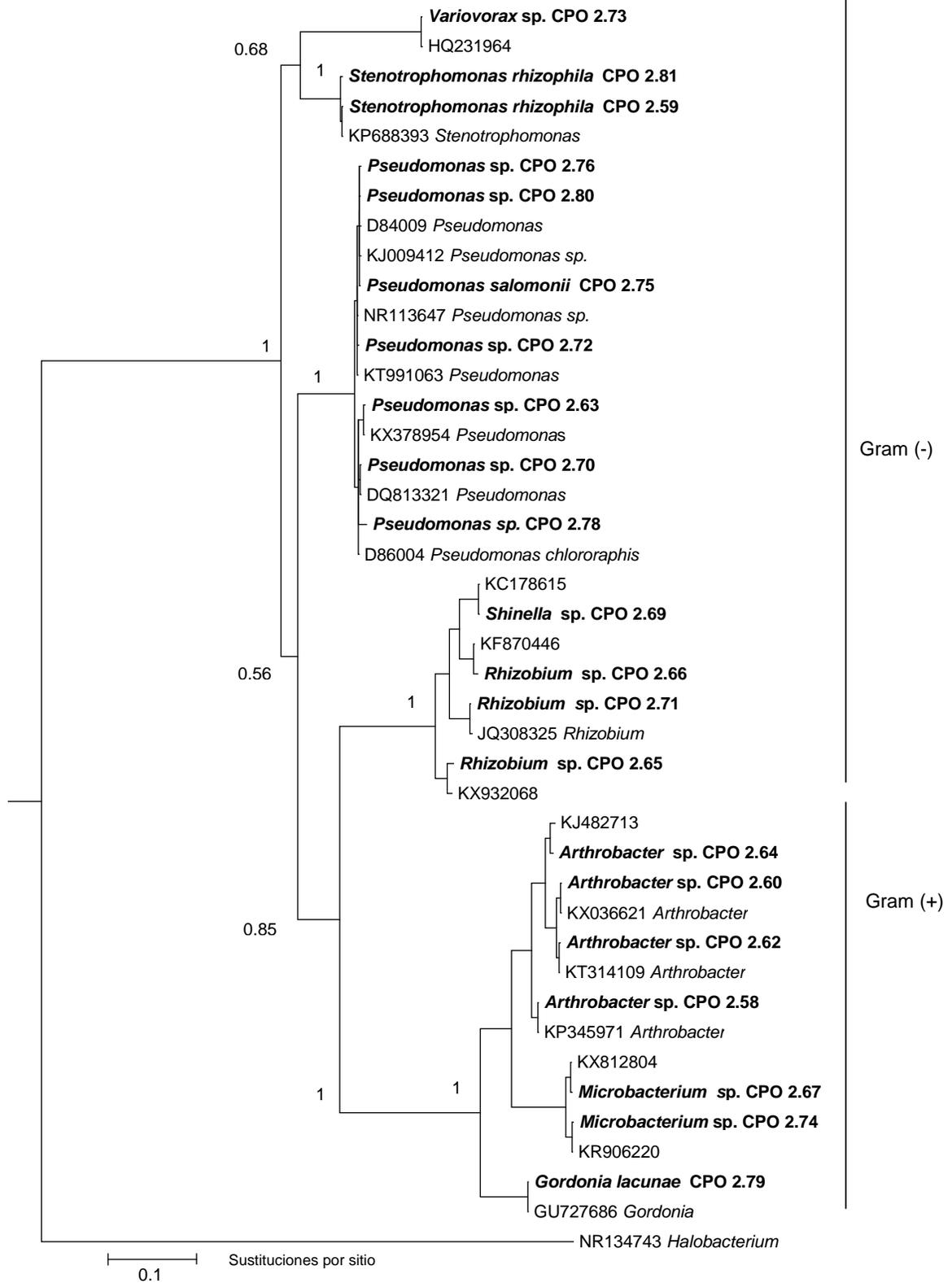


Figura 2.7. Árbol filogenético de las rizobacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Euphorbia cyathophora*. En negritas se encuentran las 21 rizobacterias aisladas en esta investigación.

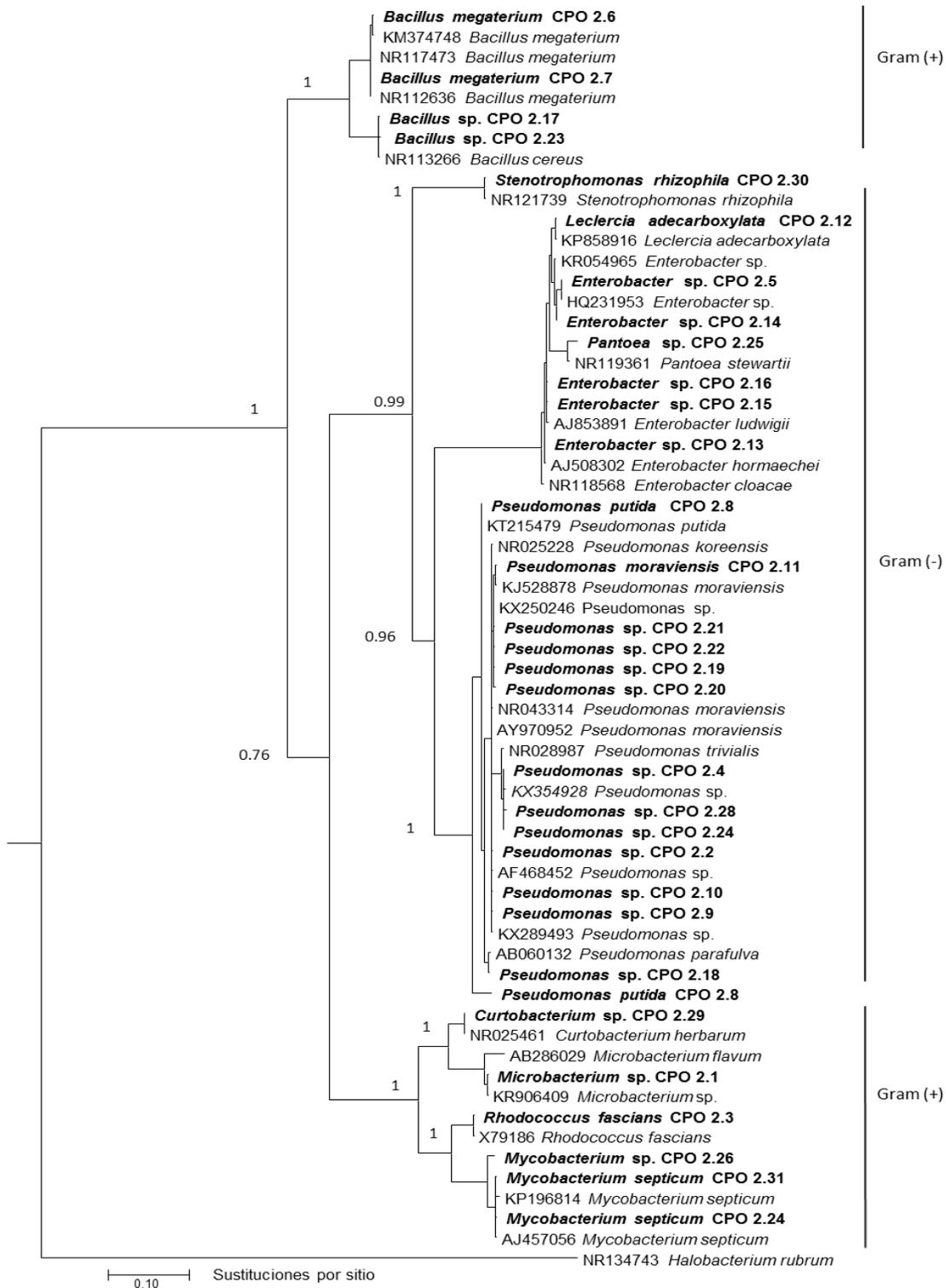


Figura 2.8. Árbol filogenético de las rizobacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de *Euphorbia cyathophora*. En negritas se encuentran las 32 rizobacterias aisladas en esta investigación.



2.5.9 Determinación del porcentaje de colonización y descripción de géneros y especies de hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*

Para el porcentaje de colonización micorrízica en los tres sitios de muestreo, no se observaron diferencias estadísticas ya que el porcentaje de colonización fue similar en los tres sitios. No obstante, el sitio donde se encontró mayor porcentaje de vesículas fue Mariposas; mientras el sitio con menor porcentaje fue en los Troncones (Cuadro 2.7).

En el Sitio Pedrera, se encontraron ocho especies de *Glomus* (Figuras 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15 y 2.16), tres especies de *Acaulospora* (Figuras 2.17, 2.18 y 2.19), una de *Gigaspora* (Figura 2.20) y la especie de *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* (Figura 2.21). En el Sitio Troncones, se obtuvieron tres especies de *Glomus* (Figura 2.22, 2.23 y 2.24), cuatro especies de *Acaulospora* (Figuras 2.25, 2.26, 2.27 y 2.28), y *Septoglomus* aff. *constrictum* (Figura 2.29). Finalmente, en el Sitio Mariposas se encontraron cuatro especies de *Glomus* (Figuras 2.30, 2.31, 2.32 y 2.33), una especie de *Entrophospora* (Figura 2.34), tres de *Acaulospora* (Figuras 2.35, 2.36 y 2.37) y la especie de *Rhizophagus* aff. *fasciculatus* (Figura 2.38).

Cuadro 2.7. Porcentaje de colonización micorrízica, géneros y especies de hongos micorrízicos arbusculares aislados de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio	Colonización %	Vesículas %	Géneros y especies
Pedrera	44.025a	15.250ab	<i>Glomus</i> sp. 1, sp. 2, sp. 3, sp. 4, sp. 5, sp. 6, sp. 7 y sp. 8. <i>Acaulospora</i> sp. 1, sp. 2 y sp. 3. <i>Gigaspora</i> sp. <i>Rhizophagus</i> aff. <i>fasciculatus</i> .
Troncones	44.38a	14.863b	<i>Glomus</i> sp. 1, sp. 2 y sp. 3. <i>Acaulospora</i> sp. 1, sp. 2 y sp. 3. <i>Acaulospora</i> aff. <i>rehmii</i> . <i>Septoglomus</i> aff. <i>constrictum</i> .
Mariposas	48.510a	17.963a	<i>Glomus</i> sp. 1, sp. 2, sp. 3 y sp. 4. <i>Entrophospora</i> sp. <i>Acaulospora</i> aff. <i>scrobiculata</i> <i>Acaulospora</i> sp. 1 y sp. 2. <i>Rhizophagus</i> aff. <i>fasciculatus</i>
DMS	5.886	3.032	

DMS = Diferencia Mínima Significativa, letras diferentes dentro de la misma columna significa que hay diferencias estadísticas (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 3$.

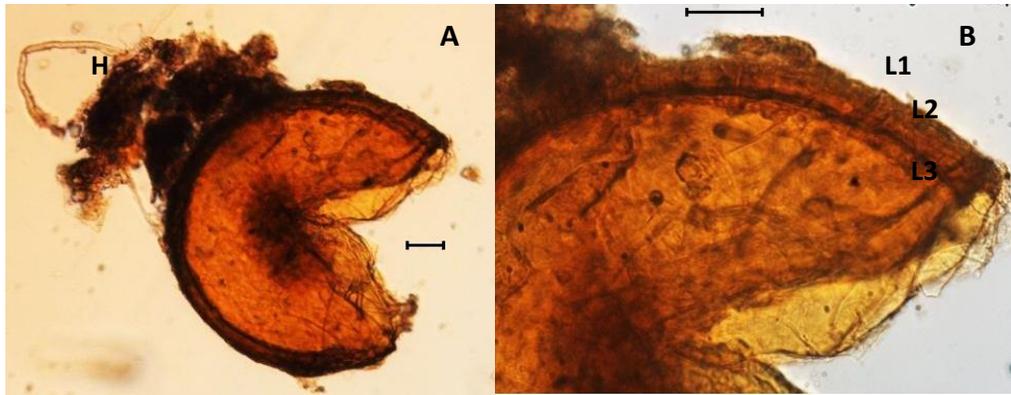


Figura 2.9. *Glomus* sp 1. A) Espora globosa, color café. Hifa (H) de sostén con residuos de materia orgánica (10x); B) Pared con tres capas (L1, L2, L3), (20x). Escala 30 μ m.

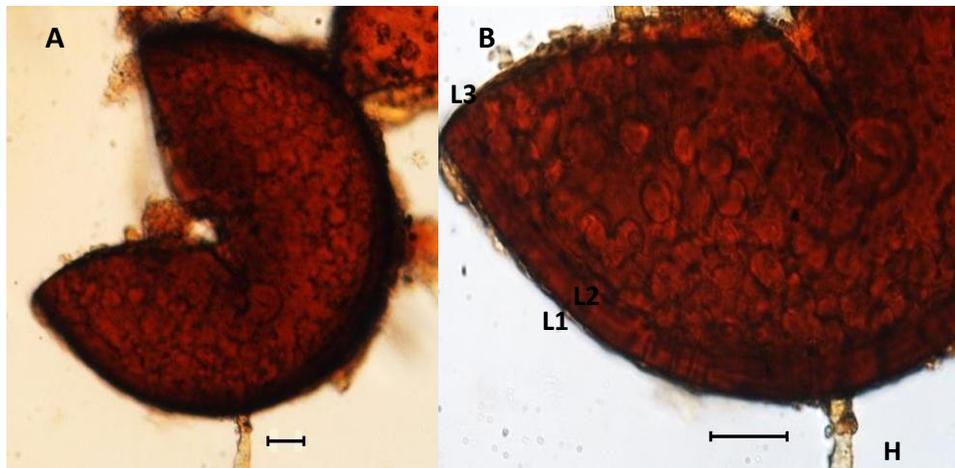


Figura 2.10. *Glomus* sp 2. A) Espora globosa, color café rojizo (10x); B) Hifa de sostén en forma recta (H), pared con tres capas (L1, L2, L3) (20x). Escala 30 μ m.

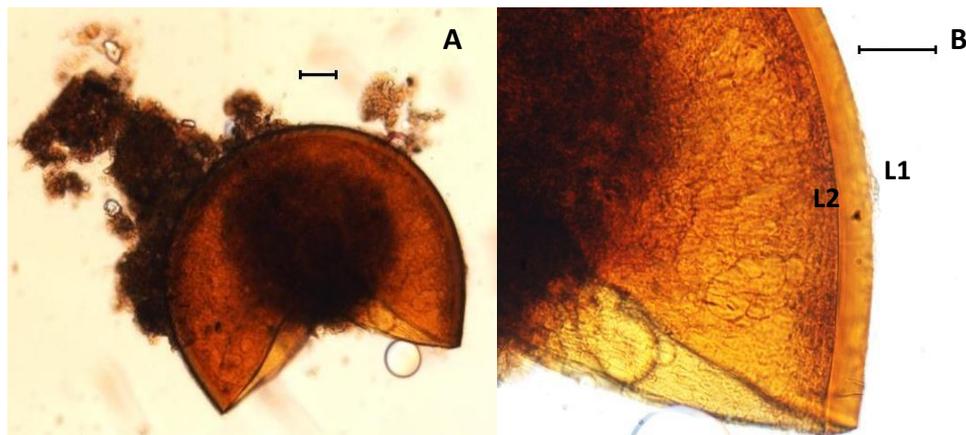


Figura 2.11. *Glomus* sp 3. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared con dos capas (L1 evanescente y L2 laminada) (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

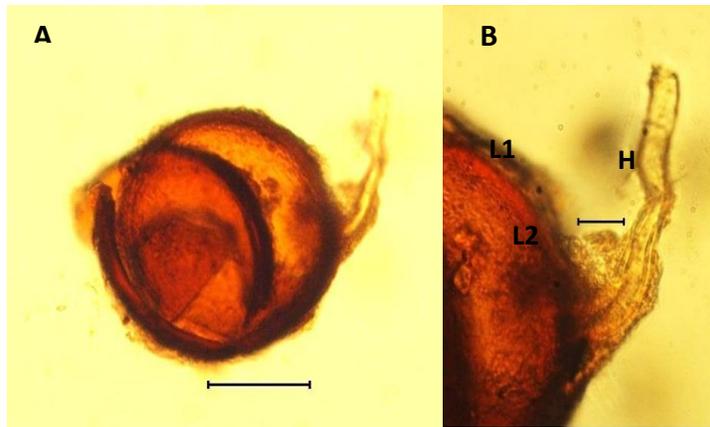


Figura 2.12. *Glomus* sp 4. A) Espora subglobosa, color café (10x); B) Hifa de sostén recta (H), pared (L1, L2 y L3) (20x). Escala 50 μm y 30 μm , respectivamente.

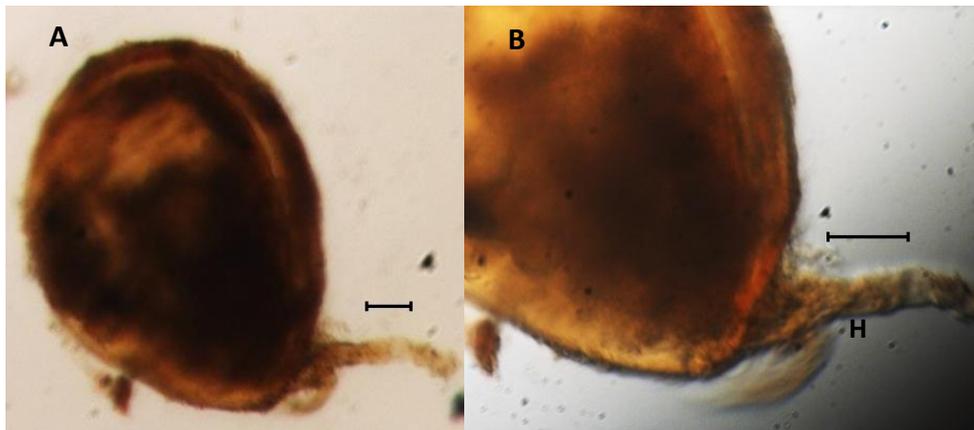


Figura 2.13. *Glomus* sp 5. A) Espora subglobosa, color café (10x); B) Hifa de sostén (H) (20x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.



Figura 2.14. *Glomus* sp 6. A) Espora subglobosa, color café (10x); B) Hifa de sostén recta (H), pared (capa L1 evanescente y L2 laminada) (20x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.

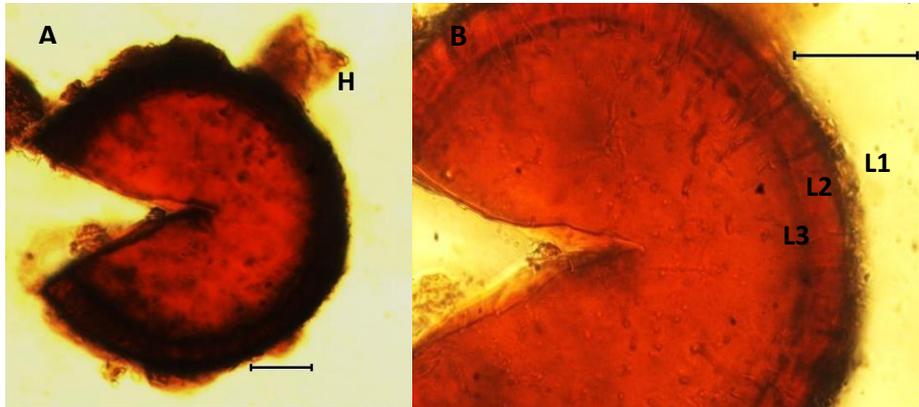


Figura 2.15. *Glomus* sp 7. A) Espora globosa, color naranja. Hifa de sostén (H) (10x); B) Pared (capa L1 evanescente, L2 laminada y L3 germinal) (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

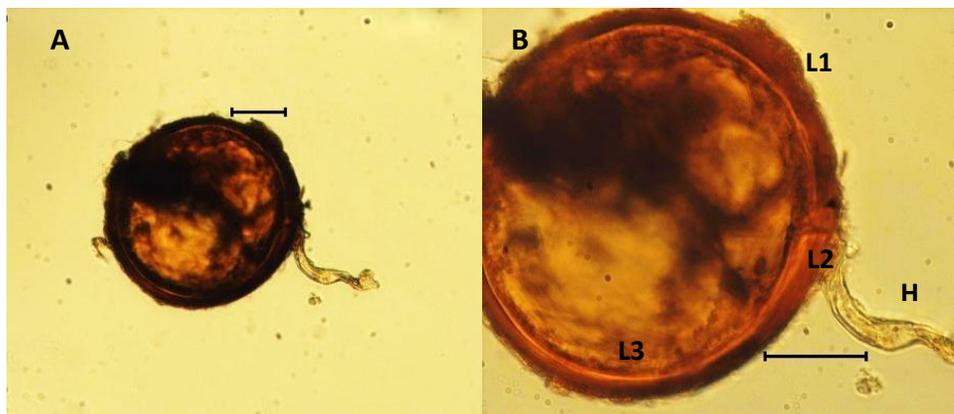


Figura 2.16. *Glomus* sp 8. A) Espora globosa, color café (10x); B) Hifa de sostén amarilla recta (H), pared (capa L1 evanescente, L2 unitaria y L3 germinal) (20x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.



Figura 2.17. *Acaulospora* sp 1. A) Espora globosa, color amarillo. Dos tubos germinativos (TG1 y TG2) (10x); B) Pared (L1, L2 y L3), (20x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

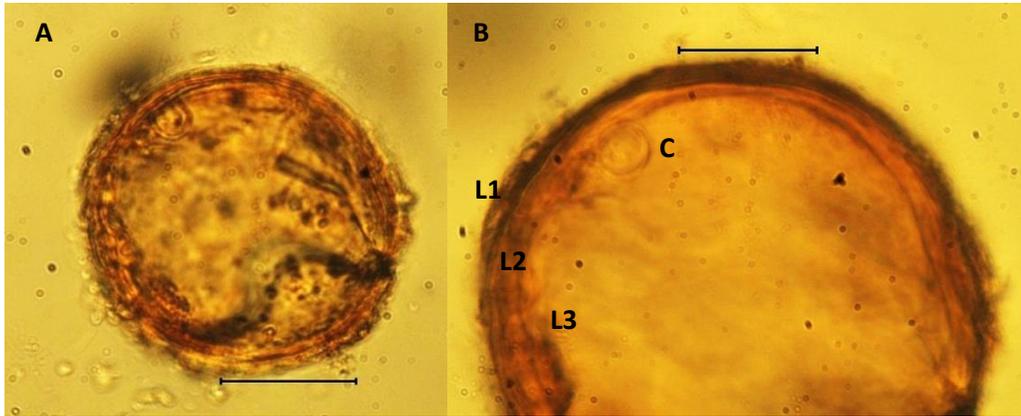


Figura 2.18. *Acaulospora* sp 2. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (L1, L2 y L3), presencia de cicatriz (C) (40x). Escala 30 μ m.



Figura 2.19. *Acaulospora* sp 3. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (L1 y L2) (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

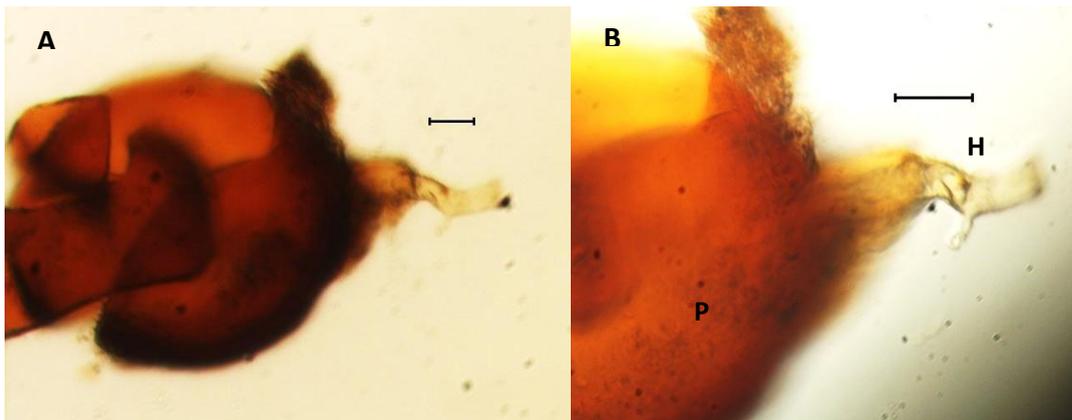


Figura 2.20. *Gigaspora* sp. A) Espora rota, color café (10x); B) Hifa de sostén color amarilla, presencia de papilas (P) en la superficie de la espora (20x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

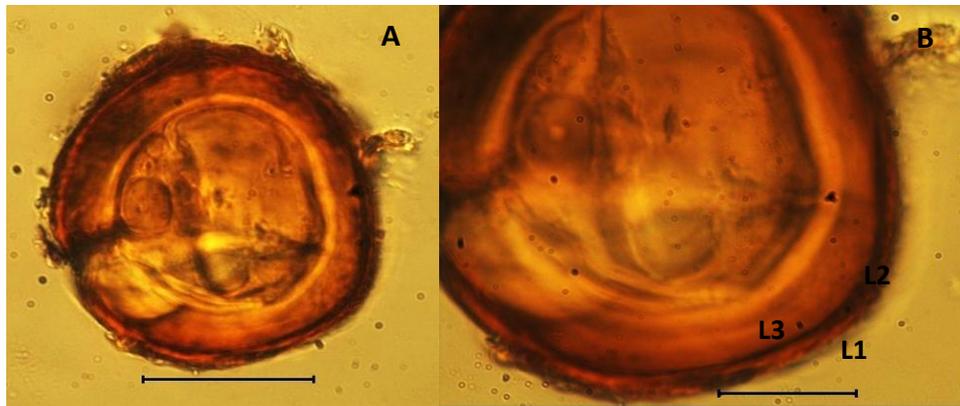


Figura 2.21. *Rhizophagus* aff. *fasciculatus*. Espora globosa, color amarillo (10x); B) Pared (capa L1 hialina, L2 laminada y L3 flexible) (40x). Escala 30 μ m.



Figura 2.22. *Glomus* sp 1. A) Espora globosa, color café claro (10x); B) Hifa de sostén en forma recta (H) (20x). Escala 30 μ m.

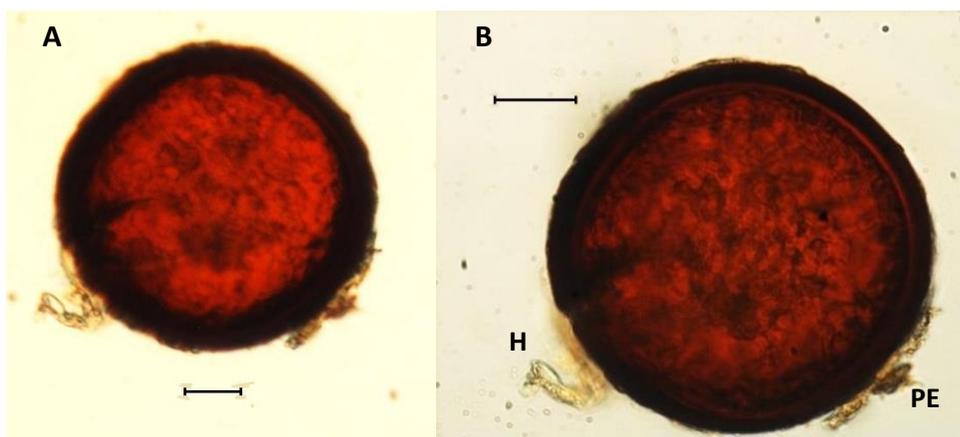


Figura 2.23. *Glomus* sp 2. A) Espora globosa, color café rojizo (10x); B) Hifa de sostén hialina en forma recta (H), pared gruesa y restos de pared evanescente (PE). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

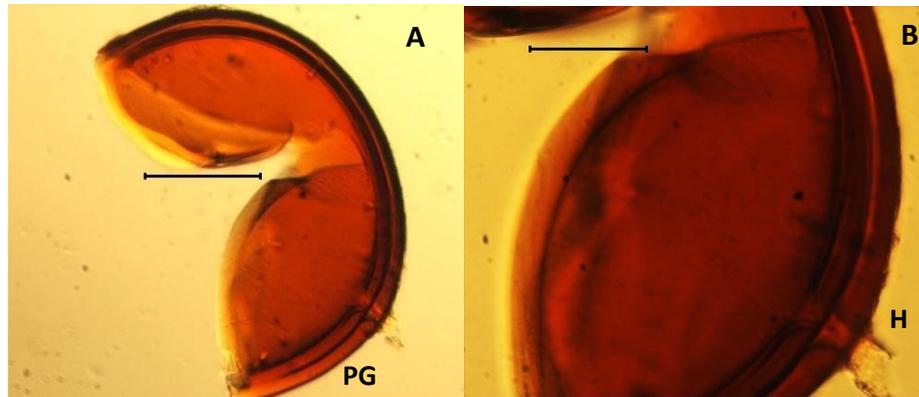


Figura 2.24. *Glomus* sp 3. A) Espora globosa, color café. Pared gruesa (PG) (10x); B) Hifa de sostén hialina en forma recta (H), (20x). Escala 30 μm y 50 μm respectivamente.



Figura 2.25. *Acaulospora* sp 1. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Restos del sáculo (S), pared gruesa (PG), parte de la cicatriz (C) (20x). Escala 30 μm .



Figura 2.26. *Acaulospora* sp 2. A) Espora rota globosa, color amarillo. Restos del sáculo (S) (10x); B) Pared de la espóra (L1, L2, L3) (20x). Escala 50 μm .

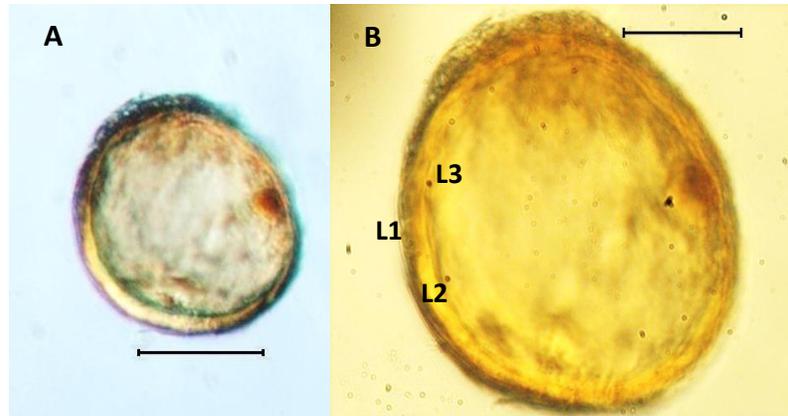


Figura 2.27. *Acaulospora* sp 3. A) Espora globosa, color amarillo claro (10x); B) Pared de la spora (L1, L2, L3) (40x). Escala 50 μ m.

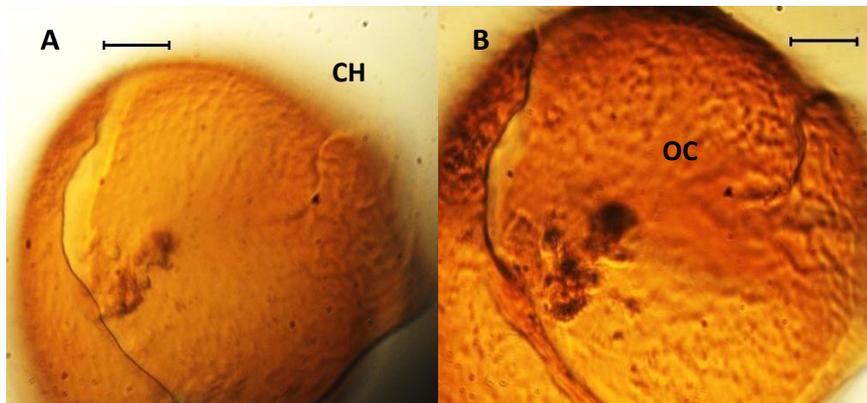


Figura 2.28. *Acaulospora* aff. *rehmi*. A) Espora rota globosa, color amarillo. Presencia de capa hialina evanescente (CH) (10x); B) Ornamentación cerebriforme de la spora (OC) (20x). Escala 30 μ m.

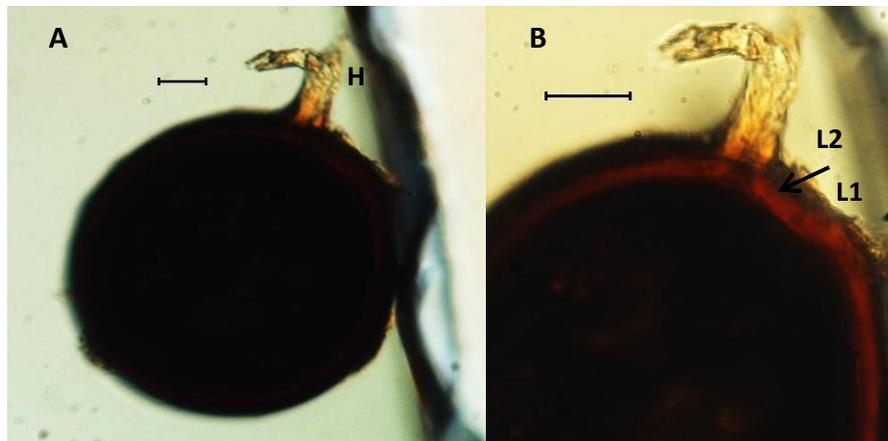


Figura 2.29. *Septoglo mus* aff. *constrictum*. A) Espora globosa, color café oscuro. Hifa de sostén (H) en forma recta y constricta (10x); B) Pared con dos capas, L1 (evanescente) y L2 (laminada), (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

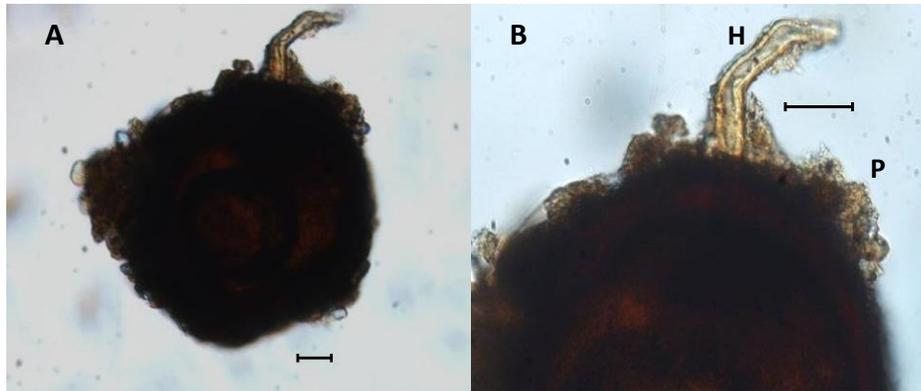


Figura 2.30. *Glomus* sp 1. A) Espora globosa color café oscuro (10x); B) hifa de sostén (H) en forma recta, la capa externa de la espora presenta un peridum (P) (40x). Escala 30 μ m.

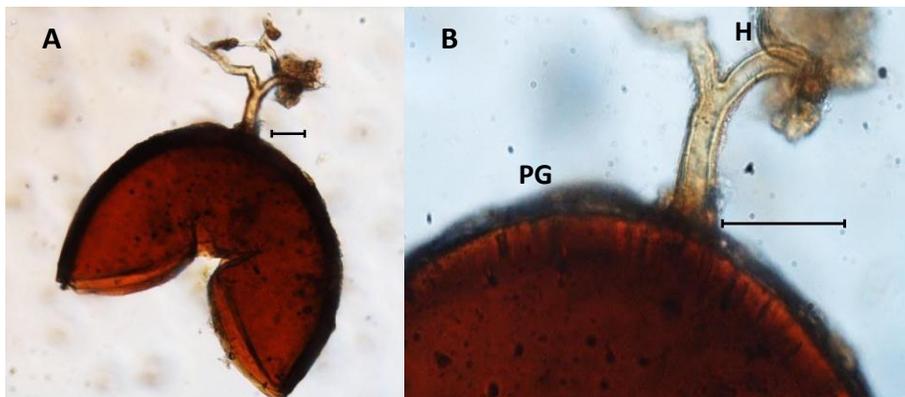


Figura 2.31. *Glomus* sp 2. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared gruesa (PG) con una capa evanescente e hifa recta bifurcada (H) (40x). Escala 30 μ m y 50 μ m, respectivamente.

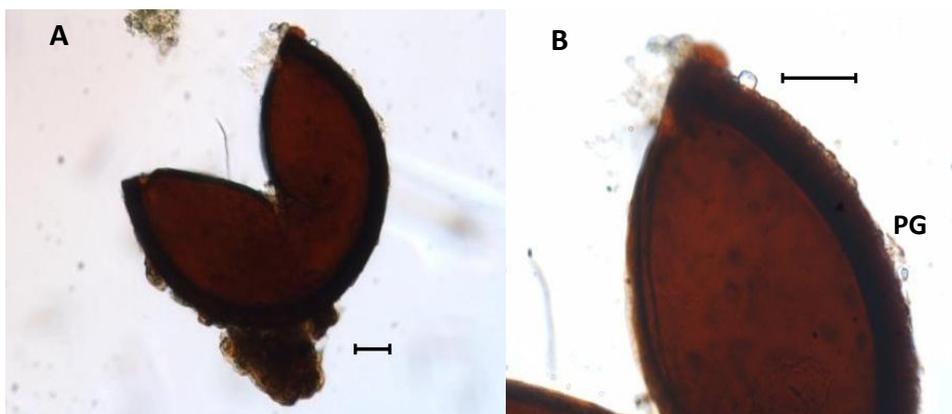


Figura 2.32. *Glomus* sp 3. A) Espora globosa, color café oscuro (10x); B) Pared gruesa (PG) con restos de la capa evanescente (40x). Escala 50 μ m y 30 μ m, respectivamente.

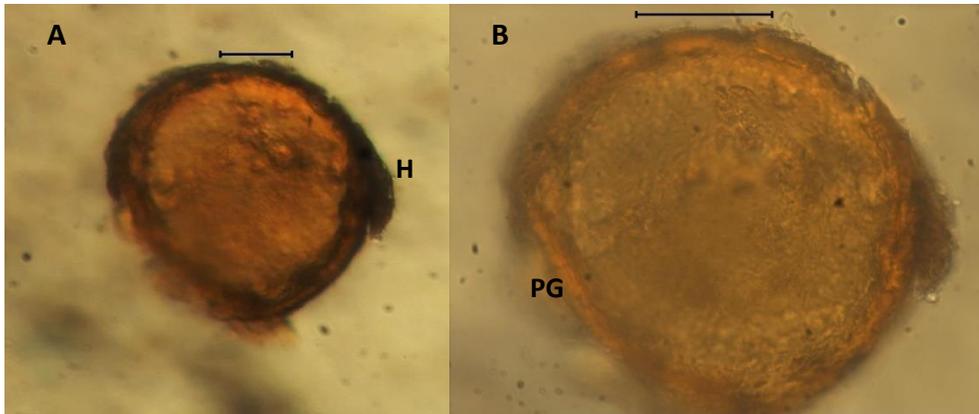


Figura 2.33. *Glomus* sp 4. A) Espora subglobosa, color miel. Hifa sustentora recta (H) (10x), B) Pared gruesa de la espora (PG). Escala 30 y 50 μm , respectivamente.

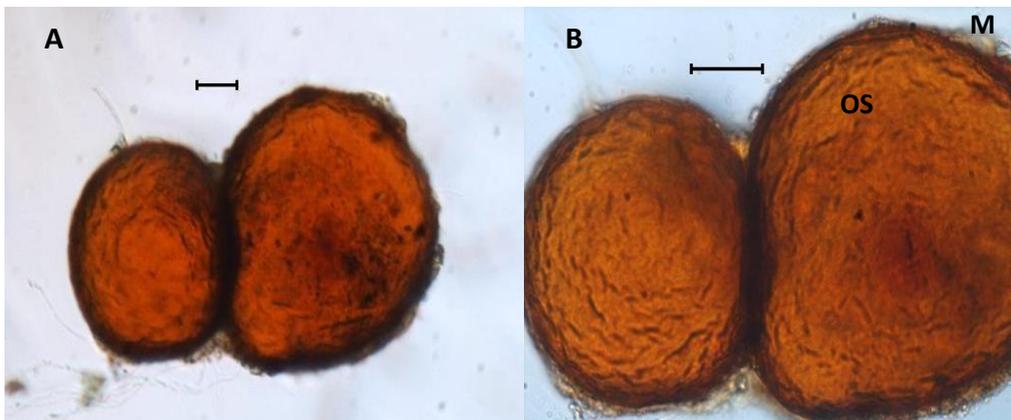


Figura 2.34. *Entrophospora* sp. A) Espora globosa, color naranja (10x); B) Presencia de ornamentación superficial (OS) y un manto alrededor de la espora (M) (40x). Escala 30 μm .

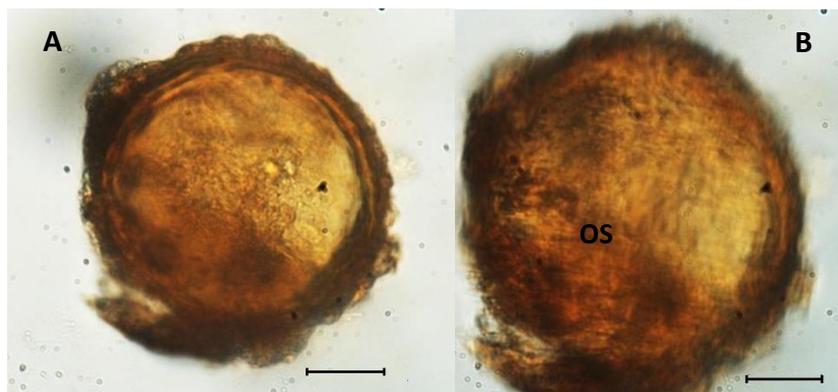


Figura 2.35. *Acaulospora* aff. *scrobiculata*. A) Espora globosa, color amarillo (40x); B) Presencia de ornamentación superficial (OS) (60x). Escala 30 μm .

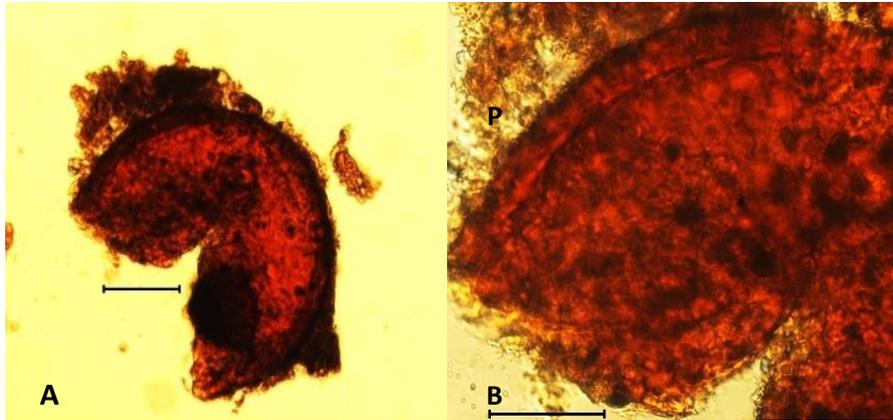


Figura 2.36. *Acaulospora* sp 1. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared de la espora, presencia de un peridium (P) (40x), escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.

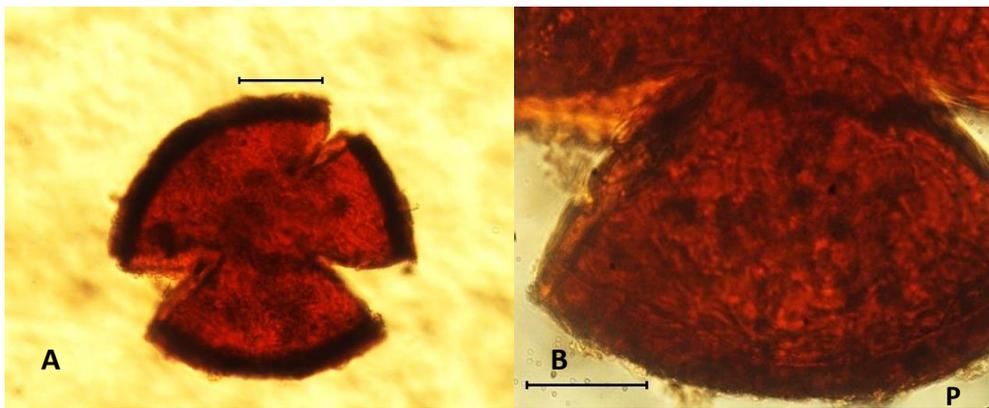


Figura 2.37. *Acaulospora* sp 2. A) Espora globosa, color café (10x); B) Pared de la espora, presencia de un peridium (P) (40x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.

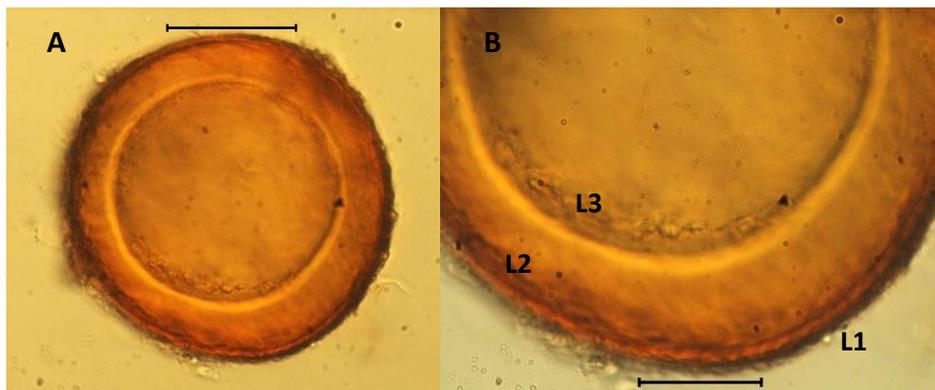


Figura 2.38. *Rhizophagus* aff. *fasciculatus*. A) Espora globosa, color amarillo (10x); B) Acercamiento de la pared de la espora, presencia de tres capas (L1, L2 y L3), (40x). Escala 30 μm y 50 μm , respectivamente.



Dentro de la variabilidad de géneros que se encontraron en los tres sitios, *Glomus* y *Acaulospora* fueron los más comunes; mientras que *Gigaspora*, *Septoglomus* aff. *constrictum* y *Entrophospora* sp. sólo se encontraron en los sitios Pedrera, Troncones y Mariposas, respectivamente. Si bien, el contenido de materia orgánica favorece el establecimiento y diversidad de los HMA, (Piotrowski y Rilling, 2007; Sellal *et al.*, 2016) existen géneros que pueden adaptarse a diversas condiciones del suelo. Por ejemplo, el género *Glomus* tiene la capacidad de producir mayor cantidad de esporas en corto tiempo y se considera como especie pionera en suelos que han perdido su fertilidad o tienen algún grado de perturbación; mientras que *Acaulospora* puede desarrollarse en suelos ácidos y con altas concentraciones de aluminio (Aguilera *et al.*, 2014; Lenoir *et al.*, 2016). *Gigaspora* es un género que produce esporas grandes y esporula en menor grado que el género *Glomus*. Además, su presencia se asocia a suelos conservados y con abundante materia orgánica (Castillo *et al.*, 2016; Sellal *et al.*, 2016). Lenoir *et al.* (2016) realizaron una comparación de los géneros de HMA que se desarrollan en praderas y bosques sin perturbación y con algún grado de alteración química o física; encontraron 43 especies asociadas a praderas y 52 especies a bosques sin perturbación, en contraste, en suelos con alteraciones hubo menor cantidad de especies; siendo los más comunes las especies de la familia Glomeraceae.

Resulta importante señalar que *E. cyathophora* se desarrolla en suelos someros y pedregosos, pero con alto contenido de materia orgánica (7.5 - 20.6%). Una estrategia vital para el establecimiento de dicha especie, es su asociación con los géneros *Glomus* y *Acaulospora* los que de acuerdo a la literatura tienen flexibilidad para adaptarse a diversas condiciones del suelo, incluyendo bajas concentraciones de nutrimentos, pH bajo, diferentes gradientes de humedad y perturbación del suelo (Lekberg *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2013). Shukla *et al.* (2013) encontraron resultados similares al evaluar la rizosfera de dos especies medicinales (*Withania somnifera* y *Ocimum sanctum*) a diferentes profundidades del suelo y gradientes de humedad. En dicha investigación, *Glomus* y *Acaulospora* fueron predominantes en la rizosfera de dichas especies. De igual forma, en otra Euphorbiaceae (*E. esula*), Lekberg *et al.* (2013) reportaron un porcentaje de colonización del 87% asociado a una especie predominante de *Glomus*.

Como se mencionó, los géneros predominantes fueron *Glomus* y *Acaulospora*; sin embargo, esto no significa que no exista diversidad de HMA en la rizosfera de *E. cyathophora* ya



que también se encontraron otros géneros como *Gigaspora*, *Rhizophagus*, *Septoglomus* y *Entrophospora*.

Finalmente, se debe mencionar que los resultados del presente trabajo no sólo aportan conocimiento de la biodiversidad de microorganismos que habitan en la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* (planta con potencial ornamental originaria de México); sino que la selección de las mejores cepas bacterianas y potencialmente, de HMA para su uso en la horticultura ornamental. Lo anterior no sólo podría reducir la cantidad de fertilizantes liberados al ambiente; además representarían una opción altamente atractiva para reducir costos de producción en cultivos ornamentales ya que con el aumento del precio del petróleo y del dólar, los fertilizantes son cada día más costosos.



2.6 CONCLUSIONES

En la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* existen microorganismos que participan en los ciclos biogeoquímicos al fijar nitrógeno y liberar fósforo de los minerales del suelo, lo que permite el desarrollo y crecimiento de esta especie vegetal en suelos poco profundos y pedregosos.

En los tres sitios de muestreo, la población de bacterias, incluyendo a las fijadoras de nitrógeno y productoras de índoles, tuvieron una población similar; sin embargo, la población de hongos totales en los sitios Pedrera y Troncones fue menor.

De un total de 76 rizobacterias aisladas y purificadas, se encontró mayor número de cepas de bacterias Gram negativas que solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno. Por lo contrario, el mayor número de cepas de bacterias productoras de ácido indolacético fue Gram positivas.

Se aislaron 24 cepas de rizobacterias productoras de AIA, 30 cepas de rizobacterias solubilizadoras de fosfatos y 22 cepas de rizobacterias fijadoras de nitrógeno de la rizosfera de *E. cyathophora*. Las cepas de rizobacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno fueron *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (Sitio Mariposas), *Arthrobacter* sp. CPO 2.62 (Sitio Pedrera) y *Pseudomonas putida* CPO 2.68 (Sitio Troncones). Las cepas con mayor capacidad de solubilización de fosfatos fueron *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (Sitio Troncones) y *Mycobacterium* sp. CPO 2.26 (Sitio Pedrera); mientras que *Pseudomonas* sp. CPO 2.18 y *Mycobacterium septicum* CPO 2.31 (Sitio Mariposas), presentaron los mayores halos de solubilización del fosfato tricálcico con respecto de las demás cepas aisladas.

De 24 cepas asiladas productoras de ácido indolacético, se seleccionó a *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Enterobacter* sp. CPO 2.33 (Sitio Pedrera) y, *Arthrobacter oryzae* CPO 2.46 (Sitio Troncones) por producir la mayor cantidad de ácido indolacético (AIA).

No se observaron diferencias estadísticas para el porcentaje de colonización micorrízica en los tres sitios de muestreo; pero en el Sitio Mariposas, se encontró mayor porcentaje de vesículas. Respecto a la presencia de HMA de los tres sitios, se aislaron e identificaron cuatro géneros principales (*Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora*) y dos especies (*Rhizophagus* aff. *fasciculatus* y *Septoglomus* aff. *constrictum*). Además, en el Sitio Pedrera se encontró mayor número de especies de HMA.

Conocer los microorganismos de la rizosfera de *E. cyathophora*, nos permitirá seleccionar las mejores cepas de rizobacterias y de HMA para su futuro uso en la horticultura ornamental.



CAPÍTULO III. EFECTIVIDAD DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA PRODUCCIÓN DE *Euphorbia pulcherrima*



Portada. A = Esqueje recién trasplantado, B y D = Podas, C = Brotes después de la 1^a poda, E = Brotes después de la 2^a poda, F = Panorama del experimento, G = Proceso de pigmentación y H = Plantas pigmentadas.



CAPÍTULO III. EFECTIVIDAD DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN LA PRODUCCIÓN DE *Euphorbia pulcherrima*

3.1 RESUMEN

La nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) es una planta con brácteas coloridas que se comercializa principalmente en la época navideña, estimándose una derrama económica de 700 millones de pesos anuales. Para obtener plantas saludables con altos estándares de calidad y presentación, los productores aplican de manera intensiva fertilizantes, reguladores de crecimiento, y plaguicidas, lo cual incrementa costos de producción y promueve la contaminación ambiental. Una alternativa altamente rentable es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) para la producción de esta especie ornamental. El presente trabajo evaluó el efecto de tres bacterias (*Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y *Bacillus megaterium* CPO 2.35) aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* en el crecimiento vegetativo y reproductivo de *E. pulcherrima* var. Prestige Red. Se utilizó un experimento factorial 5x3 (cinco niveles de inoculación bacteriana, y tres niveles de fertilización: 0%, 50% y 100%). En la fase vegetativa (118 días después del trasplante) la inoculación bacteriana produjo mayor área foliar, peso seco de hojas y total, y contenido relativo de clorofila, especialmente en plantas inoculadas con 50% del fertilizante Ultrasol® Multipropósito 18-18-18. En la fase reproductiva (236 días después del trasplante) la inoculación de la mezcla de las tres bacterias en combinación con 50% de fertilizante incrementó el área foliar, la tasa relativa de crecimiento, contenido de clorofila, peso seco total, amplitud de la planta, y número de ramificaciones. El uso de RPCV favorece el crecimiento y la producción de *E. pulcherrima*, al utilizar una dosis del 50% de fertilizante, obteniendo plantas con calidad semejante a aquellas obtenidas con la fertilización al 100%.

Palabras clave: Nochebuena, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, dosis de fertilización



CHAPTER III. EFFECTIVENESS OF THE INOCULATION OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA ON THE PRODUCTION OF *Euphorbia pulcherrima*

3.2 ABSTRACT

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) is plant species with colorful bracts widely commercialized during Christmas season, representing an estimated value of 700 million of Mexican pesos. Typically, producers apply intensive plant management practices (for instance, fertilizers, growth regulators or pesticides) to obtain healthy and high quality plants, but with increased cost production and consequent environmental negative impacts. The utilization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) represents an excellent alternative for poinsettia production. This research evaluated the effect of three PGPR (*Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 and *Bacillus megaterium* CPO 2.35) isolated from the rhizosphere of *E. cyathophora*, on the vegetative and reproductive growth of *E. pulcherrima* var. Prestige Red. A 5x3 factorial experiment (five levels of bacterial inoculation, and three levels of fertilization - 0%, 50% and 100%-) was set. At vegetative stage (118 days after transplanting), the bacterial inoculation significantly increased the leaf area, leaf and total dry weight, and relative content of chlorophyll, especially in inoculated plants with 50% of fertilization (Ultrasol® Multipurpose 18-18-18). During the reproductive stage (236 days after transplanting), plants inoculated with the three bacterial strains and combined with 50% of fertilizer had increased area foliar, relative growth rate, chlorophyll content, total dry weight, plant amplitude, and branching. The inoculation of PGPR favored growth and production of *E. pulcherrima*; furthermore, its combination with 50% of fertilizer resulted in similar plant quality when compared to that achieved in plants with the sole application of 100% of fertilizer.

Key words: Poinsettia, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, doses of fertilization



3.3 INTRODUCCIÓN

Euphorbia pulcherrima es una especie originaria de México que se cultiva en maceta como ornamental, asociándose con las festividades de la navidad en todo el mundo. Actualmente, sus ventas anuales superan los 100 millones de dólares en Estados Unidos, y en México se superan los 700 millones de pesos (Lack, 2011; Vázquez *et al.*, 2012; Trejo *et al.*, 2015).

Los estados en donde se producen las variedades cultivadas son Puebla, Estado de México, Michoacán, Distrito Federal, Morelos, Oaxaca, Jalisco, entre otros (Canul *et al.*, 2015). Debido a la ausencia de regulaciones y a la escasa información referente a la cantidad de fertilizantes y plaguicidas utilizada en la producción de especies ornamentales, cada año se liberan toneladas de compuestos químicos que provocan contaminación ambiental (Ortíz *et al.*, 2013).

Una opción para evitar el deterioro ambiental y a su vez, utilizar una tecnología amigable en la producción ornamental, es el uso de microorganismos aislados de la rizosfera con la finalidad de aportar los nutrimentos necesarios para el desarrollo de las plantas (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Philippot *et al.*, 2013). Otros beneficios asociados a los microorganismos de la rizosfera, son favorecer el metabolismo y fisiología de la planta, estimular el crecimiento, ayudar a la adquisición de nutrimentos esenciales, inducir la tolerancia al estrés, y la protección contra patógenos (Mendes *et al.*, 2013). Las bacterias promotoras del crecimiento en plantas (RPCV o PGPR en inglés) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden estimular el crecimiento y la productividad vegetal (Bashan *et al.*, 2007). Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Rhizobium* (Dardanelli *et al.*, 2010). Dichas bacterias pueden utilizar mecanismos como la producción de hormonas, la fijación de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fosfatos a partir de su propio metabolismo. También pueden afectar directamente el metabolismo de la planta al incrementar la absorción de agua y minerales, favorecer el desarrollo radical, incrementar la actividad enzimática y estimular la presencia de microorganismos benéficos y simbióticos en la rizosfera (Bashan *et al.*, 2007; Ahemad y Kibret, 2014).



Si bien, la mayoría de las RPCV son aisladas de la rizosfera de cultivos como maíz, avena, roble, caña de azúcar, cítricos y papa, e inoculadas en especies de diferentes familias taxonómicas (Mendes *et al.*, 2013; Zulueta *et al.*, 2014). En la actualidad, existen pocas referencias bibliográficas sobre el aislamiento de éstas en la rizosfera de plantas silvestres de una familia botánica determinada, para ser inoculadas en especies de la misma familia pero con potencial económico. En relación a lo anterior, y conociendo las bondades de los microorganismos aislados de la rizosfera, el presente capítulo tiene como finalidad el conocer el efecto de la inoculación de tres rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora* (planta silvestre con potencial ornamental que crece en suelos someros) sobre el crecimiento y desarrollo de *E. pulcherrima*; además de evaluar la eficiencia de las RPCV al combinarse con dosis (50% y 100%) de fertilización recomendada.



3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó durante los meses de febrero a diciembre de 2016, en un invernadero tipo túnel (Área de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, el cual se ubica a 19° 29' latitud oeste y 98° 53' latitud norte y a 2250 msnm), con cubierta de polietileno UVII-720, y estructura de acero galvanizado, con ventilación lateral, presentándose una temperatura máxima de 38 °C y 9 °C la mínima, con una intensidad luminosa de 653.43 mmol m⁻² s⁻¹.

3.4.2 Material vegetal

Se utilizaron esquejes enraizados de la variedad Prestige Red, los que tenían una edad de 3 meses, la presentación fue maceta de 3 pulgadas, adquiridos de la empresa Floraplant, ubicada en Tetecalitla, Morelos. La variedad Prestige Red es de color rojo, de respuesta tardía de 11 semanas (inducción a base de días cortos y noches largas, promoviendo la diferenciación floral y la pigmentación de las brácteas).

2.4.3 Sustrato y contenedores

Se realizó una mezcla de tepojal y peat moss en proporción 1:2 v/v. El sustrato se mezcló y esterilizó con vapor (80 a 90 °C durante 8 h). Como contenedores se utilizaron macetas de plástico flexibles, color terracota de 7 pulgadas, las cuales se desinfectaron con alcohol y cloro comercial al 80%.

3.4.4 Trasplante

Los esquejes se colocaron en las macetas conteniendo el sustrato previamente descrito, cada esqueje se colocó al centro de la maceta cuidando el cepellón y no dañar el sistema radical. A cada una de las macetas se les colocó un plato de plástico desinfectado para evitar contaminación al realizar los riegos y la fertilización.

3.4.5 Preparación del inóculo bacteriano

Se emplearon tres cepas bacterianas *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, fijadora de nitrógeno atmosférico; *Bacillus megaterium* CPO 2.35, productora de sustancias indólicas, *Enterobacter* sp.



CPO 2.5, solubilizadora de fosfato, y una mezcla de las tres cepas de rizobacterias (MIX) preparada con 2 mL de cada inóculo. Las cepas fueron aisladas originalmente de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*, descritas de acuerdo a su morfología colonial, analizadas cuantitativamente e identificadas molecularmente (ver Capítulo II de este trabajo de investigación).

Las tres cepas de rizobacterias se propagaron individualmente en medio LB (10 g de Bacto Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1 g de Triptofano) a 28 °C por 24 h. Al finalizar la incubación, se colocaron 50 mL de inóculo en tubos y se centrifugaron a 3,079 g por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones. Posteriormente, el sedimento se colocó en 300 mL de agua destilada estéril, se mezcló en el vórtex y se ajustó a una Densidad Óptica (D.O.) de 0.6 (10^7 células mL⁻¹) empleando un lector de absorbancia multimodal de microplacas Synergy 2, Biotek® (Neidhart *et al.*, 1990).

3.4.6 Inoculación y reinoculación

Las plántulas se inocularon a los siete días después del trasplante con 2 mL del inóculo bacteriano correspondiente, colocados con una jeringa estéril directamente sobre el sustrato en la base del tallo. Las plántulas control (sin inóculo bacteriano) recibieron sólo 2 mL de agua estéril (Figura 3.1). A los cuatro meses después del trasplante, se realizó la reinoculación de las bacterias correspondientes al tratamiento, con la misma D.O. de 0.6 (10^7 células mL⁻¹), y siguiendo el mismo procedimiento que en la primera inoculación bacteriana.

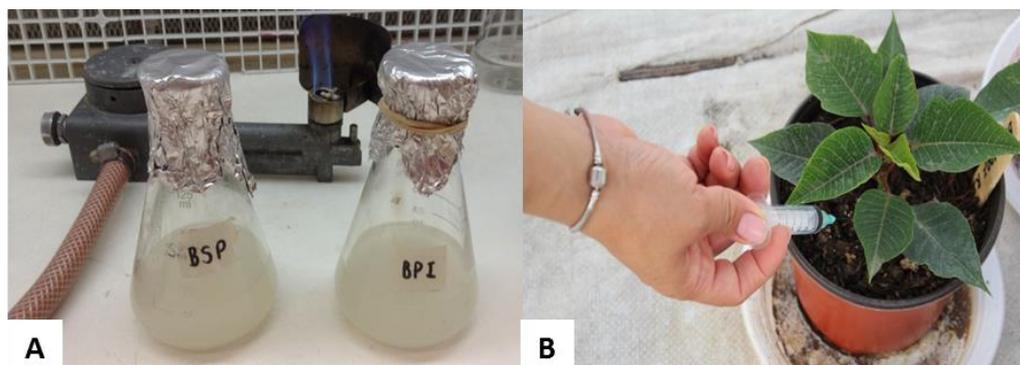


Figura 3.1. Obtención de inóculo bacteriano (A) e inoculación de las plantas con las cepas bacterianas (B).



3.4.7 Manejo de riego, fertilización, podas, manejo de plagas, y fotoperiodo

Durante todo el experimento, se utilizó agua destilada para regar, aplicándola cada tercer día o dependiendo de las condiciones climáticas o necesidades de las plantas. Para la fertilización de las plantas en los tratamientos con 50% y 100% de fertilizante, se utilizó Ultrasol® Multipropósito 18-18-18 (presentación granular), el cual contiene 18% de N, P y K, 0.5% de Mg, 0.8% de S, 400 mg kg⁻¹ Fe, 200 mg kg⁻¹ Mn, 200 mg kg⁻¹ Zn, 100 mg kg⁻¹ B, 100 mg kg⁻¹ Mo, y 100 mg kg⁻¹ Cu. La aplicación del fertilizante se realizó una vez por semana durante todo el experimento.

A los 2.5 meses después del trasplante, se realizó la primer poda con ayuda de un bisturí estéril y dejando cada planta con 2 a 3 nudos. Posteriormente, se realizó la segunda poda a los 1.5 meses después de la primera poda (Figura 3.2).

Para el control de mosca blanca, se colocaron trampas amarillas con pegamento y se liberaron ejemplares de *Chrysoperla carnea* (crisopas) a los 4 y 6 meses después del trasplante. De igual forma, para el control de mosca negra se utilizaron trampas de color amarillo y de color azul para los trips. También se asperjó cada dos semanas, jabón líquido comercial (0.3 mL L⁻¹ de agua), y aceite de neem (Nimicide 80, 0.2 mL L⁻¹) para reducir la población de mosca blanca y araña roja.

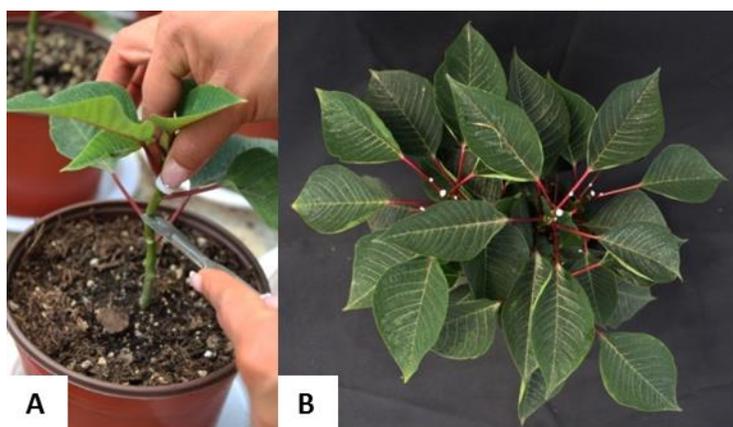


Figura 3.2. Eliminación de brote principal dejando de 2 a 3 nudos en la primera poda (A) y eliminación de parte superior de las ramificaciones en la segunda poda (B).

Con el fin de lograr una pigmentación homogénea y a la vez, proteger a las plantas de la temperatura, se colocó malla Ground cover de color negro (93.91% de sombra) en la parte superior del invernadero a partir de la primera semana de septiembre, y hasta la pigmentación



homogénea. La malla se abría a las 9 am, y se cerraba a las 5 pm, todos los días que duro la experimentación.

3.4.8 Variables evaluadas

Se realizaron dos muestreos, el primero en la fase vegetativa (118 días), y el segundo en la fase reproductiva, específicamente durante la pigmentación (236 días). Las variables que se consideraron para su evaluación se mencionan en el Cuadro 3.1.

Las variables fenológicas como amplitud y número de ramificaciones se midieron cada 20 días con ayuda de un vernier y una cinta métrica, mientras que el número de brácteas se evaluó cuando la planta comenzó a pigmentar.

El peso seco se determinó con una balanza digital OHAUS, y el volumen radical con probetas graduadas de 500 mL ó 1000 mL en las cuales se midió el volumen desplazado (cm³). El área foliar se determinó con un medidor de área foliar LI-200 marca LI-COR, y el contenido de clorofila se midió con el SPAD-SO2 Plus, Konica Minolta.

Cuadro 3.1. Variables evaluadas en dos fechas de muestreo, durante la producción de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de *E. cyathophora*.

Primera evaluación (118 días)	Segunda evaluación (236 días)
Número de hojas, altura, amplitud y número de ramificaciones	Número de hojas, altura, amplitud, número de ramificaciones y de brácteas)
Peso seco	Peso seco
Volumen radical	Volumen radical
Área foliar	Área foliar
Clorofila	Clorofila
Concentración de CO ₂ subestomática (Ci)	Ci
Tasa de transpiración (E)	E
Conductancia estomática (g _s)	g _s
Tasa fotosintética (Pn)	Pn
Fo (Fluorescencia a 50 μs)	Fo
Fv (Fluorescencia variable a 2 ms)	Fv
Fm (Fluorescencia máxima)	Fm
Fv/Fm, Fv/Fo (Indica condiciones de estrés en la planta)	Fv/Fm, Fv/Fo
RHS Colour chart*	Color de hojas y brácteas

* Royal Horticultural Society (RHS), 2006.



La tasa de crecimiento relativo (TCR) se calculó con los datos del peso seco total (raíz y parte aérea) de la primera evaluación (fase vegetativa) realizado a los 118 días después del trasplante (ddt) y el peso seco total de las plantas en floración (236 días después del trasplante).

La fórmula utilizada fue:

$$\text{TCR} = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Dónde: W2 = Peso seco final, W1 = Peso seco inicial, T1 = 119 ddt,

T2 = 235 ddt y Ln = Logaritmo natural

Las variables Ci, E, g_s y Pn se evaluaron con un medidor portátil de fotosíntesis CIRAS-2. La Fo, Fv y Fm se analizaron con un fluorómetro OS 30p+ Chlorophyll Fluorometer Opti Sciences. Fv/Fm y Fv/Fo se calcularon de acuerdo a los datos de Fv, Fm, Fv y Fo.

Además de las variables mencionadas, también se evaluó el número y pigmentación de las brácteas. Con respecto al color de las hojas y brácteas se utilizó la carta de colores RHS Colour chart (Royal Horticultural Society, 2006) en las hojas totalmente maduras y expandidas, así como en las brácteas coloreadas uniformemente.

3.4.9 Análisis químico del sustrato y análisis nutrimental en hojas

El sustrato que se utilizó en el experimento fue analizado para conocer la concentración inicial de macro y microelementos esenciales para las plantas (Anexos 6 y 7).

Al finalizar el experimento, las hojas de las plantas se secaron a 70 °C a peso constante y se molieron. Posteriormente, se realizó la digestión húmeda con ácido sulfúrico (H₂SO₄) y una combinación de ácido nítrico (HNO₃) y perclórico (HClO₄) en relación 2:1 v/v. El nitrógeno se analizó por el método de Kjeldahl y el fósforo vegetal se analizó con la mezcla diácida (ácido nítrico y perclórico) mediante el método colorimétrico con el complejo amarillo vanado-molibdato (Etchevers, 1992).



3.4.10 Diseño experimental y análisis estadísticos

El experimento fue un factorial 5 x 3 consistente en cinco tratamientos de inoculación bacteriana (*Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus megaterium*, MIX y Sin inocular) y tres dosis de fertilización (0%, 50% y 100%) dando un total de 15 tratamientos, cada uno con 15 repeticiones. Se realizaron análisis individuales donde se compararon los niveles de fertilización y el tipo de cepa bacteriana. Además, se realizó un análisis considerando su estructura factorial probando simultáneamente la inoculación de los microorganismos y los niveles de fertilización, así como de su interacción; y también se realizaron análisis combinados para cada fecha de muestreo. Además de los análisis de varianza, se realizó la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) y el análisis estadístico se realizó con el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute, 2015).



3.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1 Fase vegetativa

Los mayores valores de área foliar a los 118 días, se observaron en el tratamiento inoculado con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 con 50% de fertilización (E 50%), el mix de bacterias con 50% de fertilizante (MIX 50%) y sin inoculación bacteriana con 50% de fertilizante (S/I 50%); mientras que los valores más bajos se encontraron en plantas sin fertilizar con la inoculación de *Pseudomonas* CPO 2.78 y con *Enterobacter* sp. CPO 2.5. Cabe destacar que todos los tratamientos inoculados con alguna cepa bacteriana y con fertilización al 50% (B 50%, P 50%, E 50% y MIX 50%) fueron estadísticamente superiores al tratamiento sin inocular con 100% de fertilización (S/I 100%) (Figura 3.3).

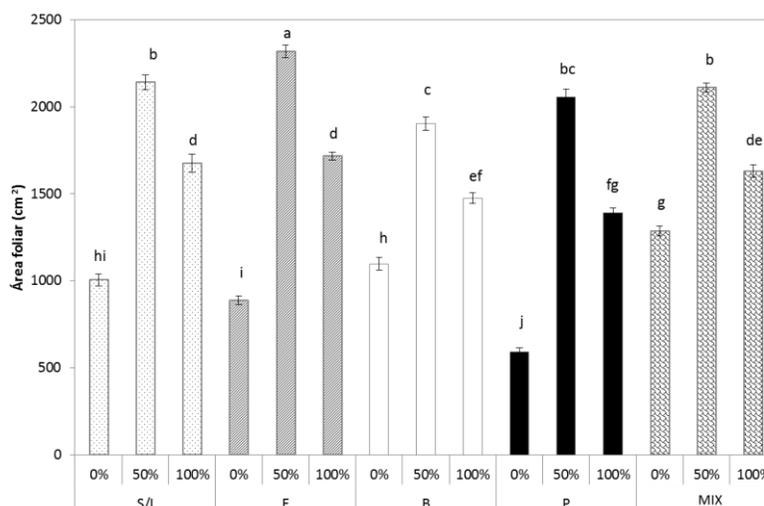


Figura 3.3. Área foliar de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.

Independientemente de la inoculación bacteriana, los tratamientos mostraron diferencias significativas dependiendo de la dosis de fertilizante aplicado; aunque aquellos tratamientos sin fertilizar tuvieron los más bajos valores. Resultados similares fueron descritos con la inoculación de *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas fluorescens* en *Calendula officinalis*, la cual mostró incrementos



graduales en área foliar, altura, número de brotes y hojas, al combinar fuentes orgánicas con las bacterias (Mohsen y Ismail, 2016).

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo heterogéneo de bacterias gram negativas que reciben su nombre al localizarse habitualmente como saprofitos en el tubo digestivo, pero también pueden encontrarse en suelo, agua y vegetación (Puerta y Mateos, 2010). Algunas especies de esta familia se han relacionado con la promoción del crecimiento y productividad vegetal ya que son altamente eficientes en la solubilización de fosfatos (Dardanelli *et al.*, 2010; Podile y Kishore, 2007), y tienen la habilidad para sobrevivir en medios contaminados (Chen *et al.*, 2016), e incrementar el porcentaje de supervivencia de orquídeas terrestres (Galdiano *et al.*, 2011).

El peso seco total fue estadísticamente mayor en el tratamiento inoculado con la mezcla de las bacterias más 50% de fertilización (MIX 50%) y en el inoculado con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 más 50% de fertilización (E 50%); mientras que los valores más bajos se encontraron en el tratamiento sin inoculación y sin fertilizante (S/I 0%). Esta tendencia se repitió en el peso seco de hojas (Cuadro 3.2). Para el peso seco del tallo, los tratamientos con valores estadísticamente mayores se obtuvieron al inocular *B. megaterium* CPO 2.35 y el MIX de bacterias, ambos sin adición de fertilizante; en contraste, los valores más bajos se encontraron con *B. megaterium* CPO 2.35 más 100% de fertilización (B 100%).

En el peso seco de raíz, el mayor valor se obtuvo al inocular la mezcla de las bacterias sin fertilización (MIX 0%); mientras que los valores más bajos se obtuvieron al inocular *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 con 100% de fertilización (P 100%), (Cuadro 3.2).

Independientemente a la inoculación bacteriana, la fertilización con 50% favoreció el peso seco total y de hoja, en los tratamientos inoculados con *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y el MIX de bacterias. Adicionalmente, la presencia de las cepas bacterianas solas o combinadas promovió el peso seco de raíz cuando no se aplicó fertilizante. Finalmente, en el peso seco de tallo no se observaron tendencias específicas entre tratamientos (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Peso seco de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del transplante.



Tratamientos	Dosis de fertilización	Hoja	Tallo	Raíz	Total
		(g)			
S/I	0%	3.34 f	3.49 abc	1.818 ef	6.834 e
	50%	8.1 abc	3.266 abcd	2.434 bcdef	11.366 abc
	100%	6.41 cde	2.612 bcde	3.344 abcd	9.022 cde
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	4.732 ef	3.442 abc	2.702 bcdef	7.144 e
	50%	8.682 ab	3.652 ab	2.028 cdef	12.334 ab
	100%	6.744 bcde	2.618 bcde	1.698 ef	9.362 bcde
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	5.49 edf	3.798 a	3.92 ab	9.288 bcde
	50%	8.43 abc	3.214 abcd	2.438 bcdef	11.644 abc
	100%	5.134 ef	2.064 e	1.556 ef	7.198 de
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	4.126 f	2.93 abcde	3.038bcde	7.056 e
	50%	7.368 abcd	3.004 abcde	2.742bcdef	10.372 abcd
	100%	5.554 def	2.21 de	1.278 f	7.764 de
MIX	0%	5.004 ef	3.75 a	4.75 a	8.754 cde
	50%	9.018 a	3.706 ab	3.448 abc	12.724 a
	100%	6.524 bcde	2.522 cde	1.846 def	9.046 cde
	DMS	2.21	1.10	1.49	3.19

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias. Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

El peso seco es un parámetro directo para medir el crecimiento de las plantas y puede usarse para correlacionar el efecto que tienen las RPCV sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos (Taiz y Zeiger, 2006; Huang *et al.*, 2017). En *E. pulcherrima*, la tendencia general del peso seco (hojas, tallo y raíz) mostró que las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp., *B. megaterium*, y el MIX de bacterias (todos con fertilización al 50%) fueron superiores aquellas plantas en las que se aplicó la fertilización realizada por los productores de nochebuena (fertilizante al 100%), lo que refleja el potencial del uso de estos microorganismos en la floricultura, ya que reduce a la mitad, la cantidad de fertilizante aplicado.

El mayor volumen radical se encontró en los tratamientos con *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 o con *Enterobacter* sp. CPO 2.5, ambos con 50% de fertilizante (P 50% y E 50%), los cuales no presentaron diferencias estadísticas entre sí; en contraste, el menor volumen radical se presentó en el tratamiento sin inoculación y sin fertilizante (S/I 0%) (Figura 3.4).

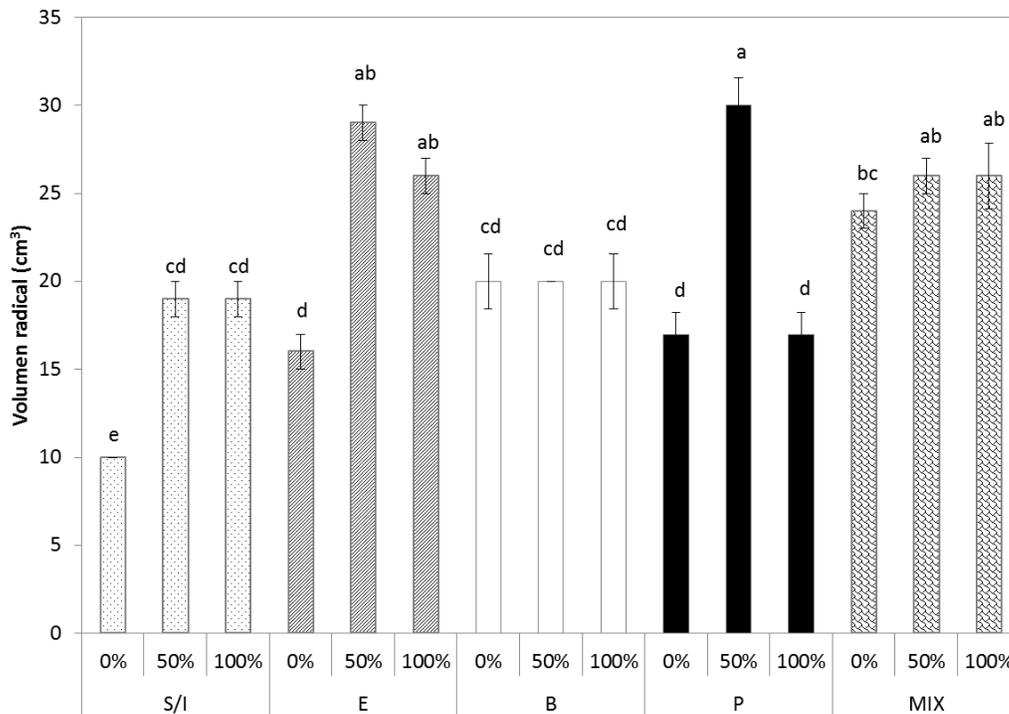


Figura 3.4. Volumen radical de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.

Los tratamientos que fueron inoculados con las bacterias pero sin aplicación de fertilizante, presentaron un volumen radical más desarrollado (Figura 3.5). Podile y Kishore (2007) indicaron que algunas especies de *Pseudomonas* promueven la densidad y el crecimiento de raíces principales y laterales debido a la capacidad de sintetizar ácido indolacético (AIA). Este compuesto es una hormona vegetal que controla diversos procesos fisiológicos como la elongación y la división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad. En el caso de las bacterias, el AIA se sintetiza a partir de la vía anabólica del indol-3-piruvato (IPA) (Vega *et al.*, 2016).



Figura 3.5. Desarrollo radical de *Euphorbia pucherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del trasplante y con fertilización de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18 (0%, 50% y 100%). Simbología: S/I = Sin, MIX = Mezcla de bacterias.



En la figura 3.5 se muestra el desarrollo radical de *E. pulcherrima* cuando se inoculó con las bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, y sin la adición de fertilizante (E 0%, P 0% y B 0%). En dicha figura se observa que el mayor desarrollo se presentó en el MIX de bacterias, y el menor desarrollo se observó en el tratamiento sin inoculación (S/I).

El contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) fue estadísticamente superior en tres tratamientos (S/I 100%, E 100% y P 100%); en contraparte, los tratamientos estadísticamente más bajos fueron S/I 0% y P 0%. Resulta importante señalar que los tratamientos sin fertilizar pero que se inocularon con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (E 0%), *B. megaterium* CPO 2.35 (B 0%), o con la mezcla de bacterias (MIX 0%) tuvieron mayor contenido relativo de clorofila en relación al tratamiento sin inocular (S/I 0%) (Figura 3.6).

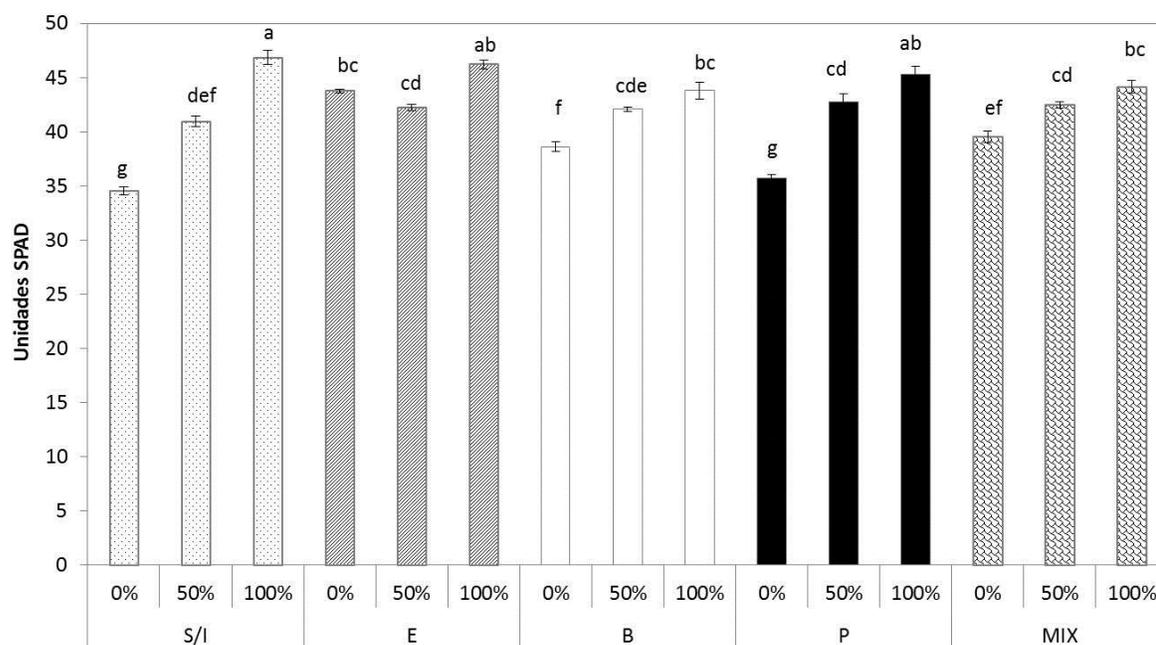


Figura 3.6. Contenido relativo de clorofila en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.



El uso del SPAD se ha utilizado en diferentes cultivos como *Ficus benjamina*, *Populus deltoides*, *Ocimum basilicum*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, entre otros (González, 2009). La cantidad de la clorofila está positivamente correlacionada con la fotosíntesis. Una reducción en el contenido de clorofila puede asociarse a la reducción del proceso fotosintético, reducción en la fijación del carbono, y con la falta de elementos esenciales para el funcionamiento del fotosistema I y II (González, 2009; Lodish, 2005). De acuerdo con Plesničar *et al.* (1994) el principal nutrimento para el crecimiento y metabolismo de las plantas es el fósforo ya que junto con el CO₂ y el agua son los sustratos primarios para el proceso de la fotosíntesis. Al respecto, en el presente trabajo se observó que las plantas sin adición de fertilizante (0 %) e inoculadas con las tres cepas (*Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y *Pseudomonas* sp. CPO 2.78) y el MIX, aprovecharon eficientemente el fósforo proporcionado por la bacteria en el proceso de la fotosíntesis ya que estas plantas no presentaron deficiencias nutrimentales como en aquellas plantas sin inocular y sin fertilización (S/I 0%). Lo anterior se corrobora al comparar la concentración de fósforo en el tejido vegetal de *E. pulcherrima* en los tratamientos (E 0%, B 0%, P 0% y MIX 0%) (Cuadro 3.7) con las tablas de interpretación de análisis nutrimental para *E. pulcherrima* propuestas por Mills y Benton (1991).

En términos de eficiencia, las plantas inoculadas con *Enterobacter* CPO 2.5 sin fertilización (E 0%) presentaron contenidos relativos de clorofila estadísticamente iguales en comparación de aquellas plantas inoculadas con 100% de fertilización (E 100%). Bhattacharyya y Jha (2012) mencionaron que las bacterias *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* son altamente eficientes en el aprovechamiento del fósforo en suelos deficientes de nutrimentos o cuando existen problemas de baja solubilidad en suelos alcalinos.

El contenido de CO₂ en el mesófilo fue estadísticamente superior en los tratamientos S/I 0% y en el MIX 0%; mientras que los menores valores se encontraron en plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 con 100% de fertilización. Con relación a la tasa de transpiración, las plantas del tratamiento S/I 0% presentaron estadísticamente el mayor valor; en tanto que las plantas de cinco tratamientos (E 50%, E 100%, B 50%, B 100%, y MIX 50%) tuvieron las menores tasas de transpiración (Cuadro 3.3). Para la conductancia estomática (g_s), el tratamiento con la mezcla de bacterias que no se fertilizó (MIX 0%) presentó la mayor conductancia; en tanto



que la menor conductancia se obtuvo en la mezcla de bacterias pero con 50% de fertilización (MIX 50%). En la tasa fotosintética (Pn), el tratamiento S/I 50% fue estadísticamente mayor comparado con los demás tratamientos; mientras que el tratamiento con la mezcla de bacterias con 50% de fertilización (MIX 50%) fue la de menor valor (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Contenido de CO₂ del mesófilo (Ci), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y tasa fotosintética (Pn) de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del transplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	Ci μmol mol ⁻¹	E μmol m ⁻² s ⁻¹	g _s μmol m ⁻² s ⁻¹	Pn μmol m ⁻² s ⁻¹
S/I	0%	337.8 a	1.76 a	153.2 cd	10.44 bc
	50%	296.4 bcd	1.64 ab	191.6 b	16.18 a
	100%	267.8 def	1.04 dc	132.6 de	11.14 bc
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	320 abc	1.3 bc	181.2 bc	11.6 b
	50%	233 fg	0.52 e	58.8 gh	8.5 cde
	100%	226.8 g	0.54 e	54.2 hi	5.9 efg
<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> CPO 2.35	0%	320.8 abc	0.8 de	113.6 ef	7.32 edf
	50%	306.8 abc	0.38 e	35.6 hi	2.8 hi
	100%	307.6 abc	0.48 e	48.6 hi	2.08 hi
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	331.4 ab	0.9 cd	152.8 cd	9 bcd
	50%	252.6 fg	1.4 abc	136.8 de	10.38 bc
	100%	237.8 fg	1.22 bc	115 ef	4 ghi
MIX	0%	336.8 a	0.64 de	419.4 a	8.78 bcde
	50%	288 cde	0.32 e	24.2 i	1.12 i
	100%	235.6 fg	1 cd	87 fg	4.34 fgh
	DMS	36.89	0.44	31.03	2.99

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias. Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

De acuerdo con Taiz y Zeiger (2006) la pérdida de agua por transpiración a través de los estomas es la consecuencia de la apertura estomática para permitir la entrada de CO₂. En el caso de las plantas del tratamiento S/I 0%, la mayor cantidad de CO₂ subestomático se relaciona con la mayor transpiración, lo que indica que la planta está perdiendo agua al abrir los estomas para obtener el CO₂ que servirá para el proceso de fotosíntesis. Canavar (2015) indicó que reducciones en la asimilación neta de CO₂ en hojas, conductancia estomática y la tasa de transpiración se usan con frecuencia como indicadores de estrés de las plantas.



Bresson *et al.* (2013) indicaron que las plantas inoculadas con RPCV pueden regular la apertura de los estomas mediante la presencia del ácido abscísico (ABA) lo que provoca una reducción de la pérdida del agua. Además, Stefan *et al.* (2013) mencionaron que es común que la tasa fotosintética se incremente en plantas inoculadas con RPCV; sin embargo, dependerá de la especie y de la bacteria. Por ejemplo en *Phaseolus coccineus*, la inoculación de *Bacillus mycoides* incrementó la Pn a los 20 días del desarrollo de la planta; mientras que la inoculación con *Bacillus pumilus* requirió de hasta 42 días para alcanzar valores superiores. Por otra parte, la aplicación de nitrógeno promueve la Pn al favorecer el contenido de clorofila (Baset *et al.*, 2010). Así, en los tratamientos S/I 50% y S/I 100% se observaron valores superiores de Pn que se relacionan con el contenido de clorofila y de nitrógeno foliar. Además, la tasa de transpiración puede incrementarse en plantas inoculadas con RPCV (Stefan *et al.*, 2013), pero en el presente trabajo las mayores tasas de transpiración se encontraron en los tratamientos S/I 0%, S/I 50%, P 50% y P 100%.

El análisis de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II, permite conocer diferentes tipos de estrés ambiental en las plantas (Bu *et al.*, 2012), tales como sequía, salinidad, temperatura, intensidad luminosa y diversos contaminantes (Moreno *et al.*, 2008). La medición de la fluorescencia directa es inducida por excitación continua donde se obtienen valores de Fo, Fm, Fv, Fv/Fm y Fv/Fo que miden la eficiencia fotosintética. A los 118 días se observó que el valor de la fluorescencia máxima (Fm) disminuyó estadísticamente en los tratamientos sin adición de fertilizante (S/I 0%, B 0%, P 0% y MIX 0%) (Figura 3.7). El resto de los tratamientos presentaron una Fm estadísticamente igual.

Con respecto a la relación de Fv/Fm y Fv/Fo (Cuadro 3.4) y de acuerdo con Bu *et al.* (2012), dichos parámetros sirven para determinar si la planta presenta condiciones de estrés. La relación Fv/Fm debe ser de ≥ 0.80 lo que representa la eficiencia fotoquímica del fotosistema II; mientras que un valor de Fv/Fo ≥ 4.0 indica la actividad potencial del fotosistema II. Al respecto, en el Cuadro 3.4 se muestran valores de Fv/Fm donde los tratamientos S/I 50%, S/I 100%, B 50%, B 100%, P 50%, P 100%, MIX 0%, MIX 50%, y MIX 100% presentaron valores menores a 0.80 por lo que las plantas no tienen eficiencia en el fotosistema II. Análogamente, los valores de Fv/Fo fluctuaron de 2.83 a 3.77 muy por debajo del criterio de 4.0, lo que indica que no se tiene actividad adecuada del fotosistema II.

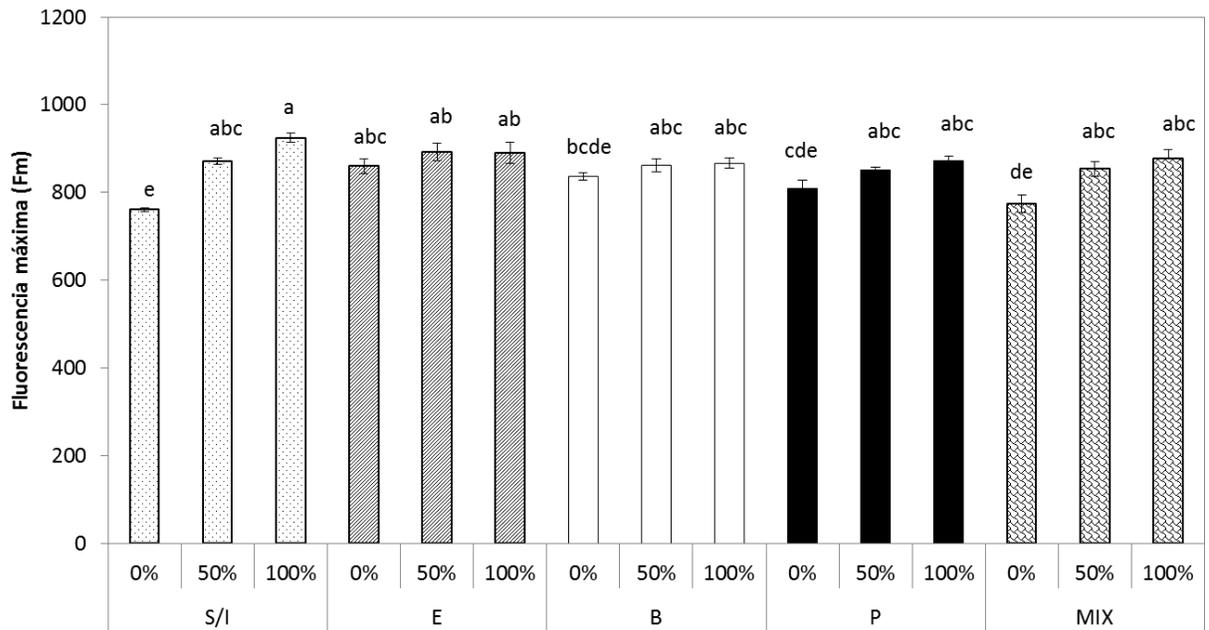


Figura 3.7. Fluorescencia máxima (Fm) en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 118 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), n = 5.

De los parámetros que se midieron durante el crecimiento vegetativo (118 días después del trasplante), la fluorescencia máxima (Fm) se relacionó con el bajo contenido de clorofila ya que el tratamiento S/I 0% presentó los valores más bajos de fluorescencia máxima y unidades SPAD. Sin embargo, la presencia de las RPCV favoreció el contenido de clorofila y la Fm, especialmente en las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. CPO 2.5, *Bacillus megaterium* CPO 2.35, y con la mezcla de las bacterias (MIX). Plesničar *et al.* (1994) indicaron que las RPCV favorecen la disponibilidad de micronutrientes en especial del fósforo, el cual interviene como donador de electrones en el proceso de la fotosíntesis. Además, las RPCV pueden participar como promotoras de sistemas antioxidantes ya que protegen a los tejidos por daño oxidativo o estrés causado por sequía, contaminación, enfermedades, etc. (Bhattacharyya y Jha, 2012).



Cuadro 3.4. Emisión de fluorescencia de clorofila en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a 118 días después del trasplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	Fo	Fv	Fv/Fo	Fv/Fm
S/I	0%	211.20 a	656.00 bcdef	3.11 bcdef	0.86 b
	50%	196.60 a	686.60 bc	3.49 abcd	0.79 bc
	100%	192.60 a	722.20 b	3.75 ab	0.78 bc
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	215.00 a	811.00 a	3.77 a	0.94 a
	50%	211.80 a	711.00 bc	3.36 abcde	0.80 bc
	100%	199.20 a	715.00 b	3.59 abc	0.80 bc
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	224.00 a	672.20 bcd	3.00 cdef	0.80 bc
	50%	205.20 a	580.40 f	2.83 ef	0.67 e
	100%	198.20 a	672.80 bcd	3.39 abcde	0.78 bc
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	231.20 a	663.40 bcd	2.87 def	0.82 bc
	50%	212.20 a	652.60	3.08 cdef	0.77 cd
	100%	213.20 a	604.00 def	2.83 ef	0.69 de
MIX	0%	227.40 a	587.20 ef	2.58 f	0.76 cd
	50%	220.80 a	635.00	2.88 def	0.74 cde
	100%	212.60 a	660.80 bcde	3.11 bcdef	0.75 cde
	DMS	38.73	76.01	0.66	0.08

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias, Fo = fluorescencia a 50 μ s, Fv = fluorescencia variable a 2 m, Fm = Fluorescencia máxima. Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

3.5.2 Fase reproductiva

Durante la segunda evaluación (236 días después del trasplante) se analizaron por separado las hojas y brácteas de las plantas. El área foliar fue estadísticamente superior en las plantas de los tratamientos inoculados con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 combinado con 50% de fertilizante (E 50%), con la mezcla de bacterias con 50% de fertilizante (MIX 50%), y en aquellas plantas donde sólo se aplicó la fertilización al 50% (S/I 50%); mientras que los valores más bajos se encontraron en las plantas de los tratamientos MIX 0%, P 0%, B 0%, y S/I 0% (Figura 3.8). En relación al área foliar en brácteas, los valores estadísticamente mayores se encontraron en el tratamiento MIX 50%; en tanto que los menores valores se observaron en las plantas del tratamiento S/I 0% (Figura 3.8). Independientemente a la inoculación bacteriana, se encontró que todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticas con respecto a la dosis de fertilización aplicada. Los valores más altos se obtuvieron en plantas fertilizadas al 50%, y los más bajos en



plantas sin fertilizante (0%). Este comportamiento cambió con respecto a los 118 días después del transplante ya que los mayores valores de área foliar se observaron en plantas fertilizadas al 100%.

El crecimiento vegetal puede determinarse mediante la medición del área foliar (Santos *et al.*, 2010). En *E. pulcherrima*, la combinación de fertilizante al 50% y la mezcla bacteriana (MIX 50%) produjo mayor área foliar tanto de hojas como de brácteas, las que mejoran las características de calidad requeridas para su comercialización. De acuerdo con Canul *et al.* (2015) y Galindo *et al.* (2015), los principales problemas en la producción de nochebuena en México se relacionan con la falta de pigmentación de brácteas, elongación de la planta, nutrición desequilibrada, y vida corta en contenedor. El resultado mencionado indica que las bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* favorecen la calidad de planta, y reduce a la mitad la cantidad de fertilizante utilizado por productores.

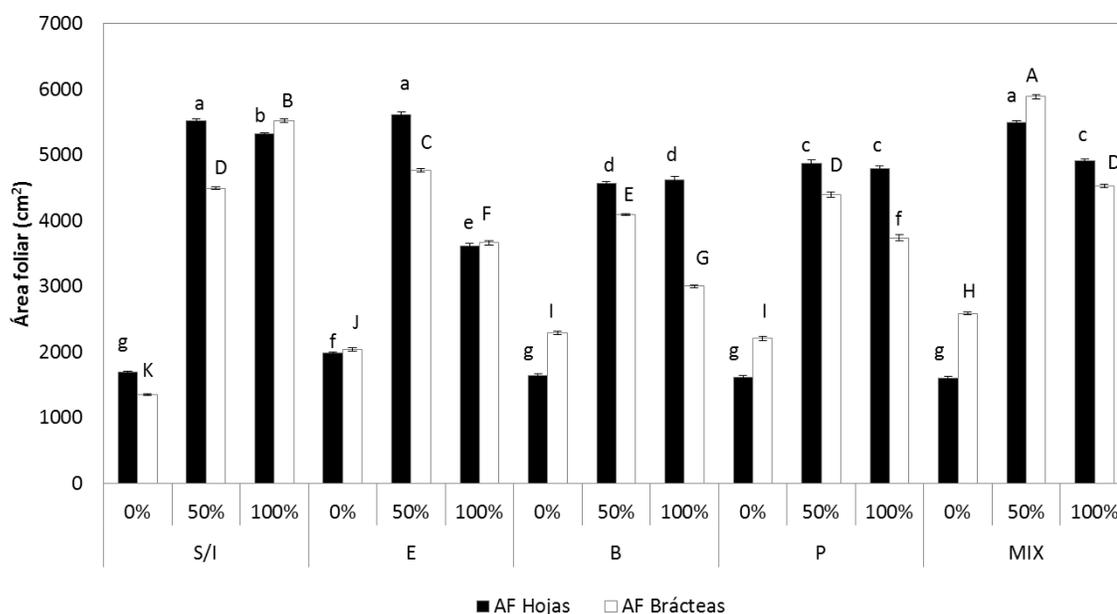


Figura 3.8. Área foliar de hojas y brácteas en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.



De acuerdo con Dardanelli *et al.* (2010) las RPCV pueden afectar el crecimiento de la planta de forma directa al facilitar la disponibilidad de micronutrientes en las plantas e indirectamente al prevenir la infección de organismos patógenos. Bacterias del género *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. se han reportado por promover el crecimiento en plantas ornamentales. Específicamente, se han reportado en *Catharanthus roseus*, *Dhalia variabilis*, *Pelargonium peltatum*, *Chrysanthemum* sp., entre otras especies (Göre y Altin, 2006; Karthikeyan *et al.*, 2014). Lo anterior permite visualizar el uso de las RPCV como una tecnología amigable al ambiente para su uso dentro de la horticultura ornamental en nuestro país.

La mayor tasa relativa de crecimiento (TRC) se obtuvo en los tratamientos B 100%, P 50%, P 100%, MIX 50% y MIX 100%; mientras que la menor tasa de crecimiento se presentó con la mezcla de bacterias sin aplicación del fertilizante (MIX 0%) (Cuadro 3.5).

De acuerdo con Cuéllar *et al.* (2010) la TCR expresa el crecimiento en materia seca a partir de un gramo de materia seca de la planta en cierto tiempo, con relación al tiempo inicial. Este parámetro se usa ampliamente en el estudio de plantas como indicador del crecimiento y de la producción y gasto de carbohidratos (Zamski y Schaffer, 1996). También permite evaluar la eficiencia de la planta en condiciones de estrés, y su productividad bajo diferentes sistemas de producción (Santos *et al.*, 2010; Quintana *et al.*, 2017). Esta variable es comúnmente utilizada en granos, hortalizas y frutales; sin embargo en especies ornamentales, raramente se calcula (Gil y Miranda, 2011; Sedano *et al.*, 2005; Quintana *et al.*, 2017).

Resulta importante enfatizar que el valor calculado de la TCR en el tratamiento MIX 50% fue superior a los tratamientos que no se inocularon y sólo se fertilizaron (S/I 50% y S/I 100%). Estos resultados se asemejan a los valores obtenidos para área foliar, clorofila, y peso seco de la planta, y puede considerarse como una variable indicativa del potencial de las RPCV en el mejoramiento del crecimiento y de la producción de nochebuena.

Beneduzi *et al.* (2012) mencionaron que en los últimos años, se han utilizado a las RPCV y a los hongos micorrízicos para favorecer la adaptación y estimular el crecimiento de las plantas. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la actividad de algunas RPCV puede ser altamente específica para especies, variedades y genotipos (Beneduzi *et al.*, 2012).



Cuadro 3.5. Tasa de crecimiento relativo (TRC) en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del transplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	1er muestreo (g)	2do muestreo (g)	TRC (g g ⁻¹ día)
S/I	0%	6.834 e	27.66 h	0.0118 abc
	50%	11.366 abc	55.11 b	0.0133 ab
	100%	9.022 cde	43.92 de	0.0134 ab
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	7.144 e	31.90 gh	0.0130 ab
	50%	12.334 ab	54.44 b	0.0126 abc
	100%	9.362 bcde	36.40 fg	0.0116 abc
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	9.288 bcde	29.74 gh	0.0098 bc
	50%	11.644 abc	50.52 bcd	0.012abc
	100%	7.198 de	42.49 ef	0.0151 a
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	7.056 e	30.60 gh	0.0125 abc
	50%	10.372 abcd	55.35 b	0.0143 a
	100%	7.764 de	45.45 cde	0.0150 a
MIX	0%	8.754 cde	25.62 h	0.009 c
	50%	12.724 a	65.24 a	0.0139 a
	100%	9.046 cde	51.72 bc	0.0148 a
	DMS	3.19	7.05	0.0037

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias, Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

El análisis del peso seco de hojas fue estadísticamente superior en plantas inoculadas con la mezcla de bacterias con aplicación de 50% o de 100% de fertilizante (MIX 50% y MIX 100%); los valores más bajos se presentaron en los tratamientos S/I 0%, E 0%, B 0%, P 0%, y MIX 0% (Cuadro 3.6). Con relación al peso seco del tallo los mejores tratamientos fueron P 50% y MIX 50%; en tanto que los tratamientos E 100%, B 0%, B 100%, P 100% y MIX 0% presentaron valores estadísticamente más bajos (Cuadro 3.6). Por definición, el tallo es parte del eje de las plantas vasculares que sirve como soporte y transporta fotosintatos entre las raíces y las hojas (Raven, 1992). En este contexto, el tallo de la planta de nochebuena es el soporte de la misma, pero no debe ser de grandes dimensiones ya que el objetivo final en la producción de nochebuena, es obtener una planta de gran amplitud con varias ramificaciones y mayor cantidad de brácteas. Para este fin, algunos productos químicos utilizados para reducir la elongación del tallo son chlormequat, paclobutrazol, uniconazole y la mezcla de chlormequat-daminozide (Faust



et al., 2001; Currey *et al.*, 2016). También se ha utilizado un régimen de déficit de agua para regular la expansión de los tejidos en nochebuena (Alem *et al.*, 2015; Litvin *et al.*, 2016).

En el peso seco de raíz, los valores estadísticamente más altos se observaron en los tratamientos E 0% y S/I 0%; mientras que los tratamientos S/I 100%, E 100%, B 50%, B 100%, P 50%, P 100% y MIX 100% obtuvieron los pesos más bajos. De acuerdo con Raven (1992), la raíz es un órgano que sirve como sostén de la planta y para absorber y conducir agua y minerales. Sin embargo, cuando existe carencia de nutrimentos, la arquitectura de la raíz puede modificarse en la búsqueda de los elementos esenciales (Forde y Lorenzo, 2001). López *et al.* (2003) indicaron que las plantas pueden responder favorablemente a la disponibilidad de nutrimentos al enviar señales que desencadenan mecanismos moleculares que modifican la división celular y procesos de diferenciación de la raíz. Así, el crecimiento de raíz y la formación de pelos radicales y raíces laterales, son sensibles a la concentración de nutrimentos en el suelo. De esta manera, las plantas donde no se adicionó fertilizante (S/I 0%), y en aquellas inoculadas con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (E 0%) mostraron mayor crecimiento de la raíz. En contraste, las plantas donde se adicionó fertilizante al 50% y 100% mostraron los menores crecimientos de la raíz (Figura 3.9).

Para el peso seco de brácteas, los tratamientos MIX 50% y S/I 50% tuvieron los valores significativamente más altos; mientras que los tratamientos con menor peso seco fueron S/I 0%, E 0%, B 0%, P 0% y el MIX 0% (Cuadro 3.6). Cabe destacar que aunque los tratamientos E 0%, B 0%, P 0% y MIX 0% presentaron similar peso seco de brácteas con respecto al tratamiento S/I 0%, las plantas presentaron brácteas más coloridas, con una distribución homogénea y no se observaron deficiencias nutrimentales de fósforo. Las observaciones anteriores se complementan con el análisis nutrimental de las hojas de nochebuena (Cuadro 3.7) en donde los contenidos de fósforo son óptimos de acuerdo al contenido nutrimental en *E. pulcherrima* expuesto por Mills y Jones (1991) y, sin la adición de ninguna fuente de fertilización.

De acuerdo con los resultados del presente experimento, y utilizando el criterio que se expuso con anterioridad, todos los tratamientos resultaron en plantas con tallo, apariencia y peso óptimo, capaz de soportar la parte aérea de la planta.



Cuadro 3.6. Peso seco en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	Hoja	Bráctea	Tallo	Raíz	Total
		(g)				
S/I	0%	7.48 e	3.88 g	16.30 fg	26.06 a	27.66 h
	50%	18.96 bc	15.60 ab	20.54 cd	18.99 bc	55.11 b
	100%	18.91 bc	8.95 de	16.06 fg	10.19 e	43.92 de
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	8.50 e	6.85 efg	16.54 f	29.39 a	31.90 gh
	50%	19.94 abc	12.93 bc	21.55 bc	15.29 cd	54.44 b
	100%	14.60 d	9.19 de	12.61 h	8.83 e	36.40 fg
<i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> CPO 2.35	0%	7.82 e	6.49 efg	15.42 fgh	20.56 b	29.74 gh
	50%	17.99 dc	12.36 c	20.17 cde	12.42 de	50.52 bcd
	100%	19.38 bc	8.61 def	14.5 fgh	8.77 e	42.49 ef
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	7.38 e	5.85 fg	17.36 def	17.22 bc	30.60 gh
	50%	18.81 bc	10.73 dc	25.81 a	12.54 de	55.35 b
	100%	17.90 dc	11.60 dc	15.94 fgh	8.77 e	45.45 cde
MIX	0%	6.79 e	5.84 fg	12.98 gh	15.63 cd	25.62 h
	50%	23.17 a	17.11 a	24.96 ab	17.07 bc	65.24 a
	100%	21.98 ab	12.64 bc	17.09 ef	12.14 de	51.72 bc
	DMS	3.65	3.05	3.44	3.86	7.05

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias, Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, $n = 5$.

En el peso seco total, el MIX 50% fue estadísticamente el mejor tratamiento en comparación del MIX 0%, P 0% y E 100%. Estos resultados sustentan el efecto positivo que tienen las RPCV en el crecimiento y desarrollo de *E. pulcherrima* ya que existe consistencia de su beneficio en los parámetros evaluados en esta investigación. En los Anexos 8, 9, 10, 11 y 12 se muestran los efectos de los aislamientos bacterianos inoculados, en el desarrollo y pigmentación de *E. pulcherrima*. Los resultados obtenidos en la presente investigación contrastan con los encontrados por Zulueta *et al.* (2014), ya que la inoculación de *Pseudomonas putida* en plantas de *E. pulcherrima* no promovió el desarrollo eficiente de esta planta ornamental.



Figura 3.9. Desarrollo radical de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del trasplante y con fertilización de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18 (0%, 50% y 100%). Simbología: S/I = Sin, MIX = Mezcla de bacterias.



Las plantas de los tratamientos E 0% y S/I 0% mostraron los valores de volumen radical significativamente más altos con respecto a las plantas de los tratamientos E 100%, B 100% y P 100% (Figura 3.10).

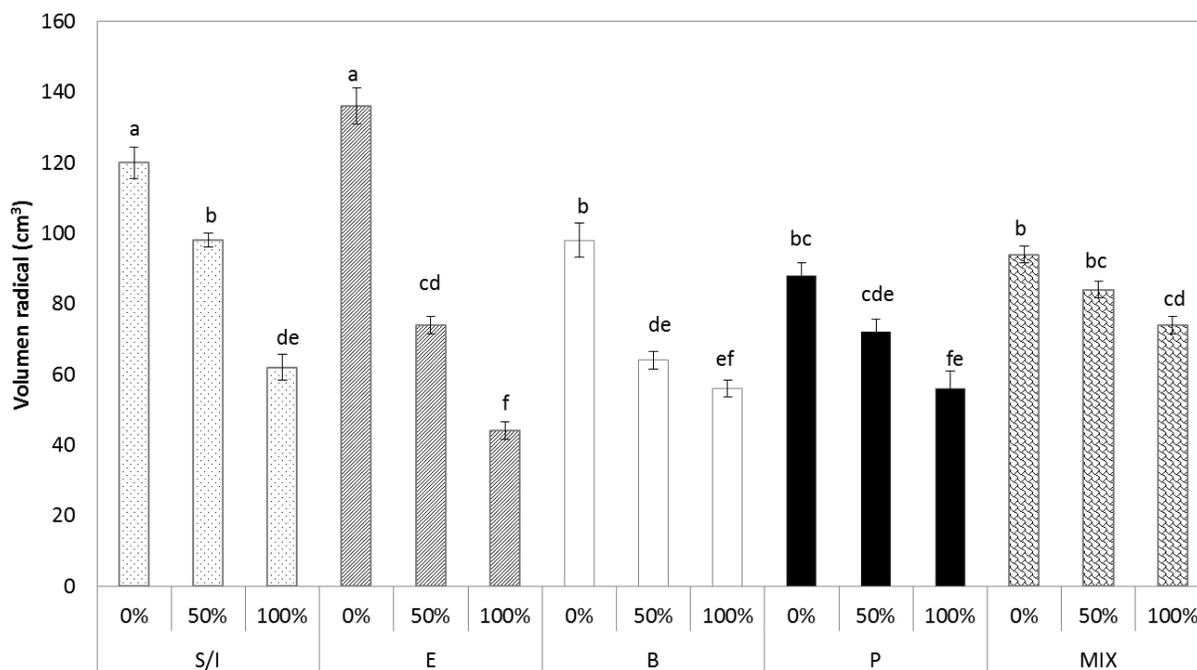


Figura 3.10. Volumen radical de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del trasplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78., MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.

Para un óptimo desarrollo de la raíz se requiere de diversos nutrimentos que son absorbidos del suelo o del sustrato (Anexos 6 y 7) y de los fotosintatos provenientes de la parte aérea de la planta; sin embargo, cuando existe carencia de micronutrientes, los procesos de desarrollo de la raíz son afectados; así, en una planta con deficiencia de nitrógeno, la adición de nitrato funciona como un mecanismo de señalización que promueve el crecimiento de las raíces laterales (López *et al.*, 2003). Por otra parte, las plantas deficientes en fósforo pueden cambiar la morfología, topología y patrones de distribución de su raíz (Shen *et al.*, 2011). Al respecto, los análisis foliares mostraron que únicamente las plantas del tratamiento S/I 0%, presentaron contenidos deficientes de fósforo (Cuadro 3.7) por lo que el mayor desarrollo del sistema radical



obtenido en este experimento puede deberse a lo discutido por López *et al.* (2003) y Shen *et al.* (2011). El análisis estadístico individual del efecto de la fertilización, independientemente de la inoculación bacteriana, mostró que las dosis de fertilización presentaron diferencias estadísticas. Así, los valores más altos de volumen radical se obtuvieron en plantas sin aplicación del fertilizante (0%), y los más bajos cuando las plantas fertilizadas con la dosis del 100%.

El análisis foliar de *E.pulcherrima* a los 236 días después del trasplante (Cuadro 3.7), mostró que cuando no se adicionó el fertilizante a las plantas (S/I 0%, E 0%, B 0%, P 0% y MIX 0%), el contenido de nitrógeno en las hojas fue deficiente al compararse con los cuadros de interpretación propuestos por Mills y Benton (1991). Sin embargo, cuando se adicionó 50% y 100% de fertilizante, el contenido de nitrógeno foliar fue adecuado. Debe mencionarse que la concentración de nitrógeno considerada como adecuada es de 4 a 6% de nitrógeno en las hojas de *E. pulcherrima* (Mills y Benton, 1991).

Cuadro 3.7. Análisis foliar de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del trasplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	N	Clasificación	P %	Clasificación
S/I	0%	2.78	Deficiente	0.16	Deficiente
	50%	4.73	Adecuado	1.19	Adecuado
	100%	4.65	Adecuado	1.08	Adecuado
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	2.97	Deficiente	0.30	Adecuado
	50%	4.65	Adecuado	1.20	Adecuado
	100%	4.78	Adecuado	1.18	Adecuado
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	3.18	Deficiente	0.27	Adecuado
	50%	4.44	Adecuado	0.90	Adecuado
	100%	4.87	Adecuado	0.99	Adecuado
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	3.32	Deficiente	0.38	Adecuado
	50%	4.50	Adecuado	1.18	Adecuado
	100%	4.66	Adecuado	1.09	Adecuado
MIX	0%	3.41	Deficiente	0.69	Adecuado
	50%	4.62	Adecuado	0.91	Adecuado
	100%	4.60	Adecuado	0.89	Adecuado

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias.

Para la concentración de fósforo en las hojas, únicamente en el tratamiento S/I 0% se mostró un contenido deficiente (Cuadro 3.7). Los tratamientos B 0%, P 0% y el MIX 0%, presentaron concentraciones de fósforo adecuadas a pesar de que no se aplicó ninguna fuente de



fertilización. Esto permite inferir que la presencia de las cepas bacterianas facilitó la absorción del fósforo presente en el sustrato (Anexo 6).

El nitrógeno y fósforo son elementos esenciales que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, la función principal de estos elementos se relaciona con la acumulación y la liberación de energía durante el metabolismo celular (Saber *et al.*, 2012). Dada la importancia de estos elementos, las RPCV facilitan la adquisición de elementos insolubles como el fósforo y de elementos deficientes como el nitrógeno. En el caso del fósforo, las RPCV liberan ácidos orgánicos de bajo peso molecular que modifican el pH del suelo y secuestran el Ca^{2+} , dejando libre a los fosfatos para su absorción por las plantas (Goswami *et al.*, 2016). Otros mecanismos son la acidificación, quelación y las reacciones de intercambio (Singh *et al.*, 2013). Para el nitrógeno, las RPCV pueden fijar nitrógeno atmosférico y transformarlo a formas asimilables para las plantas, incluso se ha reportado que la combinación RPCV-rizobios pueden mejorar el crecimiento y fijación del nitrógeno en las plantas. Lo anterior se debe a que ciertas rizobacterias (*Pseudomonas*) poseen la enzima ACC desaminasa que hidroliza ACC en amonio y α -ketobutirato; estos compuestos favorecen la formación de la nodulación y la inhibición de la síntesis acelerada del etileno endógeno, promoviendo así la elongación de la raíz y mejorando el crecimiento de las plantas (Vale *et al.*, 2010; Glick, 2014).

En el Cuadro 3.7 se observa que la adición de fertilizante al 50% y 100% en *E. pulcherrima*, permitió tener plantas con contenidos adecuados de fósforo. Al respecto, Mills y Benton (1991) mencionaron que la concentración adecuada de fósforo en las hojas de *E. pulcherrima* es de 0.2 a 1.0%.

El contenido relativo de clorofila (unidades SPAD) en la segunda evaluación (236 días después del trasplante) fue mayor estadísticamente en las plantas de los tratamientos MIX 50% y P 100%; mientras que los contenidos más bajos se encontraron en los tratamientos MIX 0%, P 0%, E 0% y S/I 0% (Figura 3.11). Al comparar los dos muestreos realizados, se observa que las plantas del tratamiento P 100% mantuvieron un contenido alto de clorofila; por el contrario, las plantas de los tratamientos S/I 0% y P 0% presentaron los contenidos de clorofila más bajos.

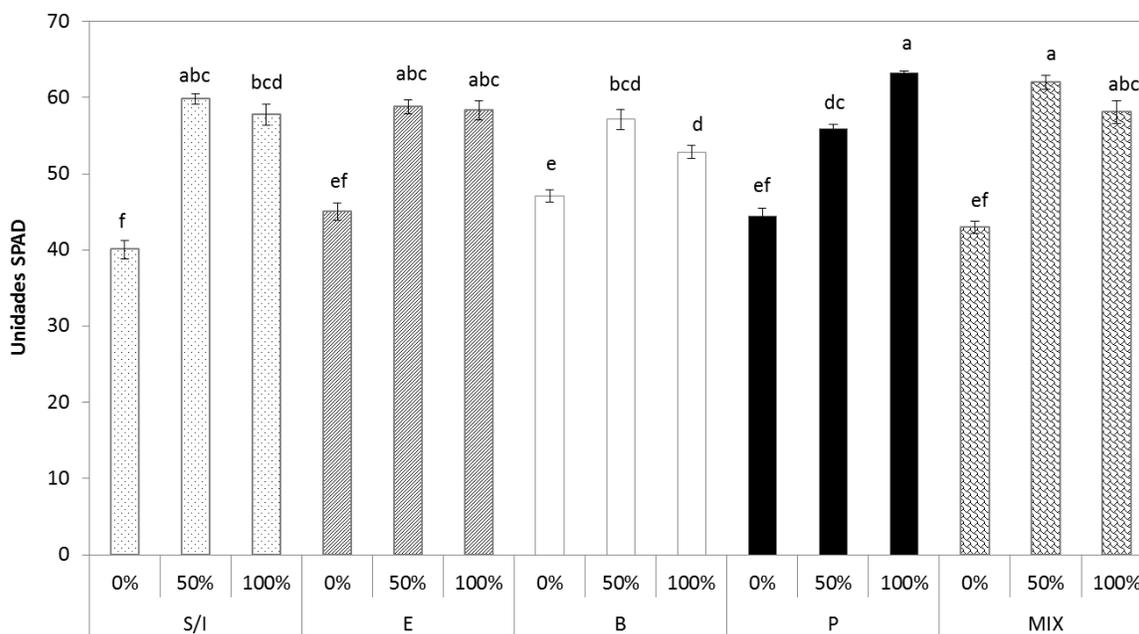


Figura 3.11. Contenido relativo de clorofila en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 5$.

Las RPCV favorecen el contenido total de clorofila al incrementar la disponibilidad de nutrimentos esenciales para la planta en suelos con baja fertilidad o contaminados (Miransari, 2011). En este contexto, las plantas que no se fertilizaron y se inocularon con las bacterias *Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Enterobacter* sp. CPO 2.5, *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 y la mezcla bacteriana (MIX) no mostraron deficiencias nutrimentales en la primera evaluación (118 días después del transplante); por el contrario, en la segunda evaluación (236 días después del transplante) se manifestaron síntomas de deficiencias de nitrógeno, lo que se relacionó con los valores de clorofila obtenidos en la segunda evaluación.

El contenido de CO_2 del mesófilo (C_i) fue superior con los tratamientos E 100%, S/I 50% y MIX 100%; en tanto que los 12 tratamientos restantes mostraron contenidos similares (Cuadro 3.8). Al efectuar una comparación entre los dos muestreos se observó que la C_i en la primera evaluación, fue mayor en los tratamientos sin fertilización; sin embargo, en la segunda evaluación los tratamientos con fertilización mostraron valores más altos (Cuadro 3.8). El contenido de CO_2



del mesófilo de las plantas puede ser afectado por condiciones de estrés hídrico (Flexas *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2013) y de deficiencia de magnesio (Mehne-Jakobs, 1996); además, este parámetro puede modificarse por la aplicación de fertilización foliar o fertilización al suelo (Borowski *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2015). Lo anterior puede explicar los resultados que se obtuvieron en la presente investigación.

La tasa de transpiración mostró mayores valores en plantas de los tratamientos B 0%; los tratamientos E 100% y P 50% tuvieron valores estadísticamente menores (Cuadro 3.8). En condiciones de limitada humedad, la tasa de transpiración se reduce debido al cierre estomático, reducción de la turgencia, y al bloqueo del CO₂ hacia al mesófilo (Reynolds *et al.*, 2013). Además, la transpiración está altamente relacionada con el área foliar; así, una planta con menor área foliar reduce su transpiración debido a limitaciones para interceptar luz y para controlar la transpiración (Barrett y Nell, 1981). Lo anterior pudo haber ocurrido en plantas de los tratamientos E 0%, P 0% y S/I 0% ya que también presentaron menor área foliar.

Las RPCV pueden alterar el mecanismo de apertura de los estomas y reducir la transpiración de las plantas, específicamente *B. subtilis* puede inducir el cierre de los estomas en presencia de bacterias fitopatógenas, mediante la producción de ácido salicílico, ácido abscísico y la expresión de ciertos genes (Kumar *et al.*, 2012). El tratamiento que presentó el mayor valor de conductancia estomática (g_s) fue B 0%; en tanto que los valores más bajos se encontraron en plantas de los tratamientos MIX 100% (Cuadro 3.8). Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Kumar *et al.* (2012) y Sawinski *et al.* (2013) quienes mencionaron que las bacterias del género *Bacillus* pueden alterar la apertura de las células guarda de los estomas, las que regulan el intercambio gaseoso y la transpiración mediante la expresión de genes y síntesis de reguladores de crecimiento.

Finalmente, los valores más altos de la tasa fotosintética (P_n) se encontraron en los tratamientos S/I 50%, B 0%, P 0% y MIX 0%; mientras que en el resto de los tratamientos los valores fueron estadísticamente iguales. La tasa fotosintética se refiere a la eficiencia de la planta para realizar la fotosíntesis, la cual depende de la concentración de O₂ y de CO₂, temperatura, luminosidad, humedad relativa, y contenido de nitrógeno (Taiz y Zeiger 2006; Corrales *et al.*, 2016). Los tratamientos con valores de P_n más altos (excepto S/I 50%) correspondieron a aquellos que no presentaron deficiencias de nitrógeno en el tejido vegetal. Este comportamiento pudo deberse a que la planta inoculada con bacterias, tuvo mayor eficiencia en el proceso de la



fotosíntesis, lo que se reflejó en una mejor apariencia de la planta, sin deficiencias nutrimentales y coloración homogénea de las brácteas. Lo anterior refleja la capacidad que tienen las bacterias de promover procesos fisiológicos de la planta. Corrales *et al.* (2016) indicaron que las plantas que desarrollan mayor amplitud de la planta o superficie vegetal pueden incrementar la tasa fotosintética al haber mayor superficie para captar energía luminosa. En el caso del nitrógeno, las plantas ornamentales como gerbera, pueden incrementar la Pn al adicionar hasta 112.5 mg N por día. Asimismo, las plantas inoculadas con RPCV pueden aumentar la fotosíntesis incluso en condiciones de baja fertilidad del suelo (Bresson *et al.*, 2013).

Cuadro 3.8. Contenido de CO₂ del mesófilo (Ci), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y tasa fotosintética (Pn) de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del transplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	Ci μmol mol ⁻¹	E μmol m ⁻² s ⁻¹	g _s μmol m ⁻² s ⁻¹	Pn μmol m ⁻² s ⁻¹
S/I	0%	345.4 d	2.58 bc	159.8 gh	8.18 cdefg
	50%	370.2 ab	3.22 ab	365 c	10.9 abcd
	100%	366.4 abcd	2.26 bc	266.8 de	7.38 defg
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	344.6 d	2.32 bc	248 ef	9.86 bcde
	50%	357.6 bcd	2.04 bc	240.4 f	5.86 efg
	100%	381.8 a	1.54 c	132.4 i	5 g
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	349.4 abcd	4.52 a	447.4 a	14.78 a
	50%	346.8 cd	2.74 bc	273.8 d	9.22 bcdef
	100%	363 abcd	2.98 b	249.4 ef	7.76 defg
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	355.4 bcd	2.74 bc	417.6 b	12.66 ab
	50%	346.6 cd	1.56 c	132 i	5.24 fg
	100%	353.2 bcd	2.02 bc	142.2 hi	7.1 defg
MIX	0%	346 cd	2.92 b	236.8 f	11.8 abc
	50%	352.4 bcd	2.88 bc	233.8 f	6.5 efg
	100%	368.8 abc	2.36 bc	176.2 g	7.16 defg
	DMS	23.72	1.35	22.77	4.00

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias. Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

La fluorescencia máxima (Fm) fue estadísticamente similar en 11 tratamientos; los tratamientos con los valores más bajos fueron S/I 0% y MIX 0% (Cuadro 3.9).



Cuadro 3.9. Emisión de fluorescencia de clorofila en *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a 236 días después del trasplante.

Tratamientos	Dosis de fertilización	Fm	Fo	Fv	Fv/Fo	Fv/Fm
S/I	0%	914.60 e	176.20 abc	747.60 g	4.28 cde	0.81 b
	50%	922.20 abc	165.60 c	763.60 g	4.61 bcde	0.82 b
	100%	981.60 a	170.20 bc	814.20 ef	4.79 abcd	0.83 b
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	1012.40 abc	188.00 abc	830.40 de	4.45 bcde	0.82 b
	50%	1019.40 ab	178.60 abc	845.00 cd	4.73 abcde	0.82 b
	100%	1022.60 ab	180.00 abc	846.60 cd	4.70 abcde	0.82 b
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	987.20 bcde	181.00 abc	798.20 f	4.44 bcde	0.81 b
	50%	1000.80 abc	176.80 abc	894.00 b	5.07 ab	0.89 a
	100%	1015.80 abc	176.40 abc	885.20 b	5.02 ab	0.87 a
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	983.40 cde	197.60 a	809.00 ef	4.10 e	0.82 b
	50%	984.40 abcd	171.20 abc	813.20 ef	4.75 abcde	0.82 b
	100%	989.60 ab	174.00 abc	817.60 ef	4.70 abcde	0.82 b
MIX	0%	956.20 de	192.20 ab	797.60 f	4.15 de	0.83 b
	50%	986.40 abc	176.00 abc	856.40 c	4.87 abc	0.87 a
	100%	1113.60 abc	183.00 abc	968.60 a	5.29 a	0.87 a
DMS		77.13	26.44	23.11	0.67	0.02

Simbología: S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias, Fo = fluorescencia a 50 μ s, Fv = fluorescencia variable a 2 m, Fm = Fluorescencia máxima. Letras diferentes en la misma columna muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), DMS = Diferencia Mínima Significativa, n = 5.

Todos los tratamientos mostraron valores de Fv/Fm y Fv/Fo dentro del rango para calificarlos con una eficiencia fotoquímica y óptima actividad potencial del fotosistema II. Durante el experimento, las plantas sin fertilización presentaron los valores más bajos en las variables fenológicas y fisiológicas; sin embargo, los índices de fluorescencia indicaron que las plantas no mostraban daño en el fotosistema II. En este sentido, Corrales *et al.* (2016) comentaron que en condiciones de exceso de luz, altas o bajas temperaturas y déficit de nitrógeno, los índices de Fv/Fm y Fv/F pueden ser alterados. La comparación del índice Fv/Fm y Fv/Fo en los dos muestreos realizados, mostró que en la fase vegetativa las plantas presentaban algún déficit en el fotosistema II; lo que se corrigió durante la fase reproductiva indicando que las plantas no sufrieron daños en el aparato fotosintético. Zhang *et al.* (2014) indicaron que el valor de Fv/Fm refleja la capacidad de atrapar electrones por el centro de reacción del fotosistema II, y la disminución de este parámetro es atribuido a un daño directo en el centro de reacción. El valor



de Fv/Fo refleja la eficiencia en la donación de electrones al fotosistema II y la tasa de conversión cuántica fotosintética.

El análisis estadístico de la amplitud de la planta en *E. pulcherrima* en la última fecha, mostró que el mejor tratamiento fue el MIX 100; mientras que el tratamiento más bajo fue S/I 0% (Figura 3.12).

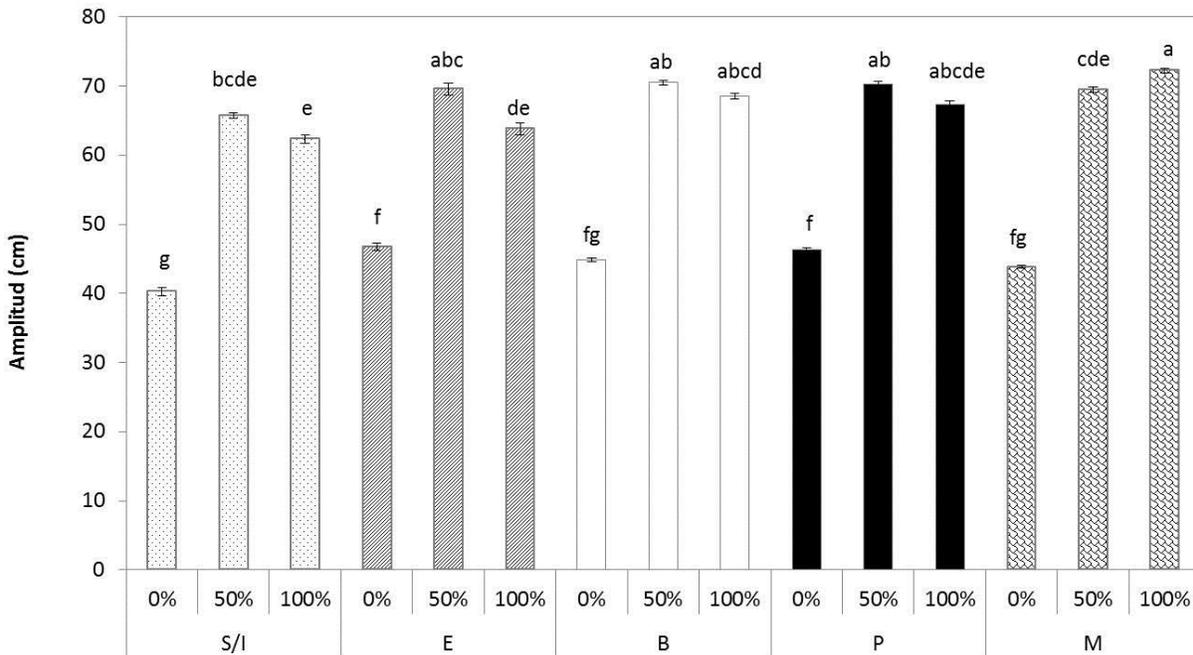


Figura 3.12. Amplitud de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 10$.

Cuando se inoculó con *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y el MIX de bacterias, las mejores amplitudes se lograron al fertilizarse con 50% y 100%; en tanto que los menores valores se obtuvieron cuando la planta no se fertilizó. El tratamiento que no se inoculó (S/I) mostró amplitudes semejantes estadísticamente cuando se fertilizó al 50% y 100% (Figura 3.12).



La amplitud en *E. pulcherrima* es un parámetro que se utiliza en el manual gráfico para la descripción varietal de nochebuena para demostrar el área que ocupa la planta desde una vista aérea (Mejía *et al.*, 2006) y para describir nuevas variedades (UPOV, 2008). Además, las plantas con mayor amplitud son las más requeridas y elegidas entre los consumidores ya que son más atractivas y robustas. Al respecto, las plantas que se obtuvieron en el experimento presentaron valores de amplitud superiores a las plantas que sólo se fertilizaron (Anexos 8, 9, 10, 11 y 12). Canul *et al.* (2017) evaluaron dos variedades comerciales (Prestige red y Freedom red) y un nuevo híbrido para interiores (Alondra) realizando un manejo tradicional y sin el uso de RPCV. Los valores medios de amplitud para Prestige red fueron de 23.02 cm, muy por debajo de los que se obtuvieron en el presente trabajo (72.25 en el tratamiento MIX 100%). Esto permite concluir que el uso de las cepas aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* promovieron mayor amplitud en nochebuena var. Prestige.

El análisis estadístico mostró que el número de ramificaciones fue mayor cuando se fertilizó y se inoculó con las rizobacterias; en comparación con los tratamientos S/I 0% y S/I 50%. Para el análisis combinado considerando la dosis de fertilización, se obtuvo mayor número de ramificaciones cuando se fertilizó al 100% y menores cuando no se fertilizó (0%) (Figura 3.13).

El número de ramificaciones fue dependiente de las podas que se realizaron, lo que ocasionó una reducción de ramificaciones y posteriormente un aumento de ellas. Este efecto se pronunció cuando las plantas se fertilizaron con 50 y 100%. Debe indicarse que la poda de la nochebuena es un evento en el que se puede presentar la muerte de las plantas debido a la presencia de organismos fitopatógenos que pueden infectar las heridas realizadas al momento de la poda (Ecke *et al.*, 2004), o bien, infectar la raíz de las plantas que están en condiciones de estrés producto de la pérdida de fotosintatos del material vegetal eliminado. Al respecto, durante las dos podas realizadas no hubo pérdidas de plantas por efecto de microorganismos patógenos, lo que indica un óptimo manejo agronómico realizado para las plantas de nochebuena, y que las RPCV protegieron a las plantas de microorganismos dañinos, fomentando la sanidad en las plantas. Beneduzi *et al.* (2012) indicaron que las RPCV pueden producir una variedad de compuestos químicos (antibióticos de amplio espectro, ácido láctico, liso-enzimas, exotoxinas y bactericinas) con actividad antimicrobiana usadas como sistema de defensa. Kaymak *et al.* (2010) mencionaron que algunas especies de *Pseudomonas* pueden proteger a plantas de *Dianthus*



caryophyllus de la infección por *Fusarium oxysporum*. Análogamente se ha reportado que plantas de calabaza son más resistentes a la infección de *Colletotrichum orbiculare* si se inoculan con RPCV (Lee *et al.*, 2005; Kaymak *et al.*, 2010).

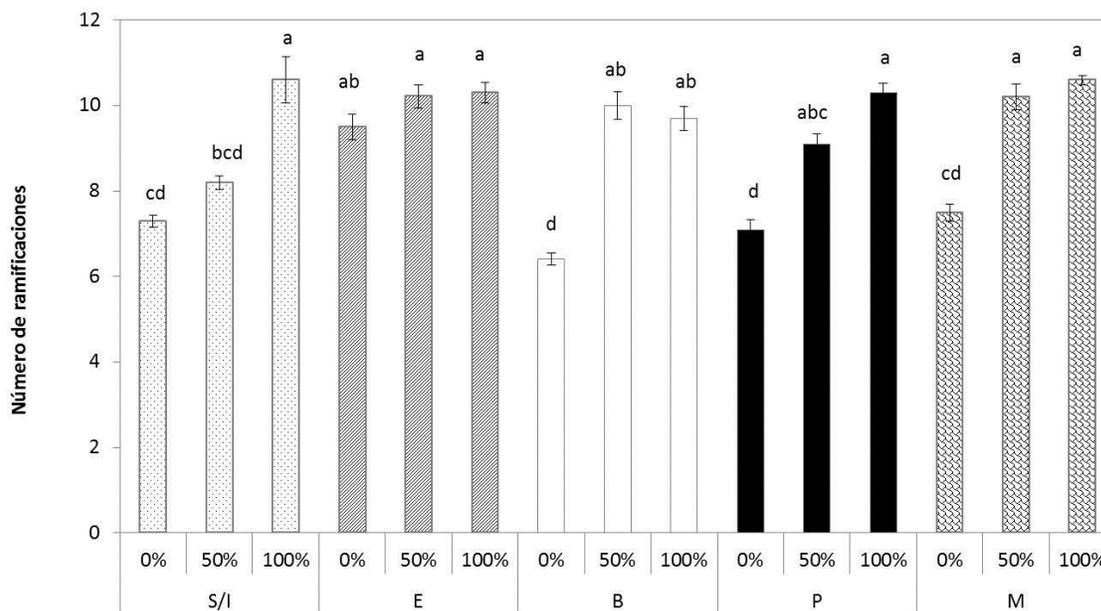


Figura 3.13. Número de ramificaciones de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora*, a los 236 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Medias \pm error estándar. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 10$.

A los 236 días después del transplante (segunda evaluación), las plantas de los tratamientos S/I 50%, MIX 50% y B 50% mostraron mayor cantidad de brácteas, mientras que las plantas de los tratamientos MIX 0%, P 0%, E 0%, B 0% y S/I 0% produjeron menor cantidad. (Figura 3.14). En nochebuena, las brácteas son hojas modificadas que rodean a las flores verdaderas y se diferencian de las hojas por su color, dimensión y forma; son muy atractivas y presentan diferentes tonalidades (rojas, blancas, moradas, rosas, amarillas, y variegadas) (Taylor *et al.*, 2011; Ecke *et al.*, 2011). De acuerdo con Starkey y Andersson (2000), la intensidad de luz (fotoperiodo) y el contenido de nitrógeno pueden influir en el desarrollo, tamaño y color de las brácteas (Zulueta *et al.*, 2014; Starkey y Nielsen, 2001).



El cultivar Prestige red es una variedad desarrollada en 2002 por Paul Ecke Ranch; genéticamente, es una planta con tallos fuertes, hábito de crecimiento vertical, resistencia a la ruptura del tallo y crecimiento uniforme de los brotes (Perera y Trader, 2010). Sin embargo, los caracteres anteriores sólo se cumplen si la planta presenta una nutrición adecuada, por lo que el uso de RPCV constituye una oportunidad para obtener plantas sanas y de óptima calidad. Al respecto, Zulueta *et al.* (2014) lograron incrementar el número de brácteas y hojas al inocular *Pseudomonas* C-60 en plantas de nochebuena variedad Prestige red. En el presente experimento, la inoculación de *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y la mezcla de bacterias (MIX) favoreció el número de brácteas, lo que en horticultura ornamental se considera como un parámetro de calidad de esta planta.

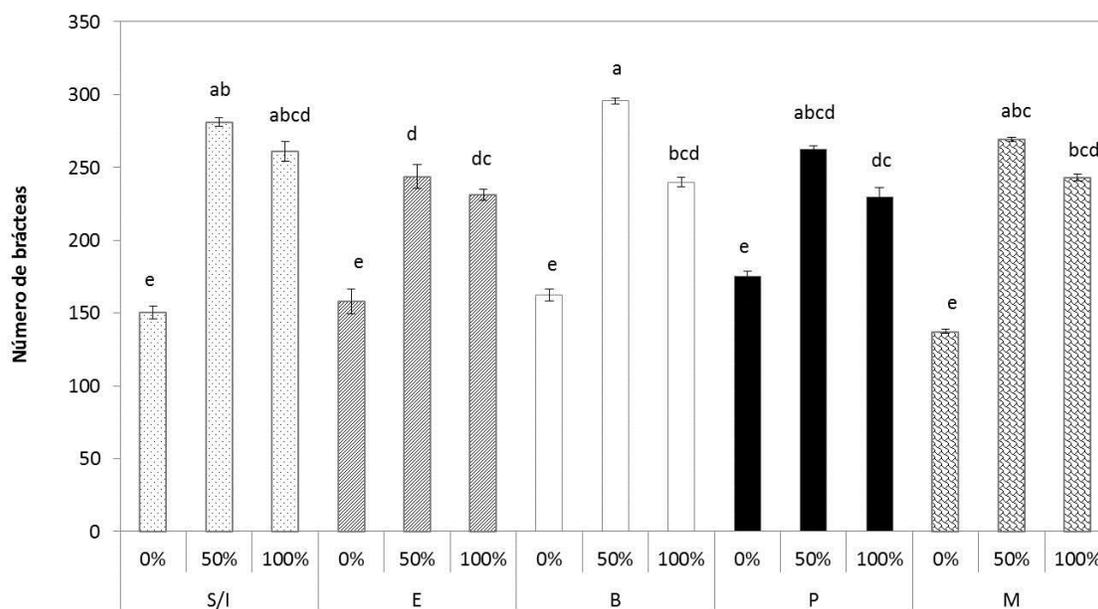


Figura 3.14. Número de brácteas de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* a los 236 días después del transplante. Simbología: S/I = Sin inocular, E = *Enterobacter* sp. CPO 2.5, B = *Bacillus megaterium* CPO 2.35, P = *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, MIX = Mezcla de bacterias. Letras diferentes muestran significancia entre tratamientos (Tukey, $\alpha = 0.05$), $n = 10$.

Con respecto al color de las hojas y de las brácteas de *E. pulcherrima* se observó que las plantas que no se inocularon y sin fertilizante (S/I 0%) obtuvieron una clasificación menor de coloración con respecto a las plantas que se inocularon pero sin fertilización (E 0%, B 0%, P 0% y MIX 0%). La coloración de las brácteas y de las hojas en las plantas de los tratamientos con



50% y 100% de fertilización, independientemente de la inoculación bacteriana, no mostró diferencias significativas (Cuadro 3.10).

Cuadro 3.10. Color de hojas y brácteas de *Euphorbia pulcherrima* inoculada con cepas de bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* y tres niveles de fertilización.

Tratamiento	Dosis de fertilización	Color de hojas	Color de brácteas
S/I	0%	Green group 146 A*	Red group 46 B
	50%	Green group 139 A	Red group 53 A
	100%	Green group 139 A	Red group 53 A
<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	0%	Yellow group 147A	Red group 53B
	50%	Green group 139 A	Red group 53 A
	100%	Green group 139 A	Red group 53 A
<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	0%	Yellow group 147A	Red group 53 B
	50%	Green group 139 A	Red group 53 A
	100%	Green group 139 A	Red group 53 A
<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	0%	Green group 147 A	Red group 53B
	50%	Green group 139 A	Red group 53 A
	100%	Green group 139 A	Red group 53 A
MIX	0%	Yellow group 139A	Red group 53 B
	50%	Green group 139 A	Red group 53 A
	100%	Green group 139 A	Red group 53 A

S/I = Sin inocular, MIX = Mezcla de bacterias, * = Basado en el RHS, 2006

De acuerdo con Valero (2012), el color es una interpretación de las longitudes de onda de la luz emitida o reflejada por un cuerpo y captada por el sistema visual. Para la UPOV (2013) el color se define por el tono (colores), saturación (indica pureza del color o contenido de gris) y brillo (cantidad de luz reflejada por el color, de claro a oscuro), y usualmente para la descripción del color se utiliza la carta de colores de la Royal Horticultural Society (RHS, 2006), en la que se escoge un color, tono y saturación de la carta de colores. En el presente trabajo, el color de las hojas del tratamiento sin inocular y sin adición de fertilizante (S/I 0%) se clasificó dentro del grupo de los verdes pero con una tonalidad menor que el resto de los tratamientos (146 A). Análogamente, en las brácteas el tratamiento S/I 0% presentó una tonalidad menor (46B) que las plantas del resto de los tratamientos (Cuadro 3.10).



3.6 CONCLUSIONES

La inoculación de *Enterobacter* sp. CPO 2.5, *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Pseudomonas* sp. CPO 2.78, aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*, promovió el crecimiento de *Euphorbia pulcherrima* en la fase vegetativa (118 días) ya que se encontró mayor área foliar, peso seco total, peso seco de hojas, y contenido de clorofila en las plantas que se inocularon y se fertilizaron con dosis de 50% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18.

Las variables fisiológicas como el CO₂ del mesófilo y la tasa de transpiración fueron superiores en el tratamiento que no se fertilizó y sin inoculación (S/I 0%); mientras que la conductancia estomática (g_s) fue mayor en el MIX 0% y la tasa fotosintética (Pn) en el tratamiento S/I 50%.

En la fase reproductiva (236 días después del trasplante) la inoculación de la mezcla de bacterias (*Enterobacter* sp. CPO 2.5, *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Pseudomonas* sp. CPO 2.78) con 50% de fertilizante (MIX 50%) produjo incrementos en área foliar, TRC, clorofila, peso seco total, amplitud y número de ramificaciones.

Las plantas que no se fertilizaron, presentaron los valores más bajos en las variables fenológicas y concentraciones variables en las fisiológicas (g_s, Pn, E y CO₂ del mesófilo), pero los índices de fluorescencia mostraron que no hay deficiencias en el fotosistema II de las plantas.

El análisis foliar demostró que la concentración de fósforo fue adecuada en las plantas inoculadas con las tres cepas aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* y sin adición de fertilizante (E 0%, B 0%, P 0% y MIX 0%); en contraste la concentración de nitrógeno vegetal en las hojas de *E. pulcherrima* fue deficiente cuando no se aplicó fertilizante.

En la fase vegetativa y reproductiva, las plantas de los tratamientos donde se inoculó con las tres cepas bacterianas pero que no se fertilizaron (E 0%, P 0%, B 0% y MIX 0%) generaron mayor desarrollo radical que aquellas que se fertilizaron al 100%.

Con base en los resultados de la presente investigación, se puede concluir que el uso de RPCV favorece el crecimiento y la producción de *E. pulcherrima*; además, permite obtener plantas de calidad con 50% de la dosis de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18, utilizadas en el manejo convencional.

DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES FINALES

México es un país con gran riqueza florística donde investigadores de otros países han aprovechado para coleccionar, mejorar genéticamente y patentar diversas especies nativas. De esta forma, no sólo es prioritario para nuestro país el rescate, conservación, e investigación de especies nativas, sino también el aprovechamiento de recursos biotecnológicos como los microorganismos del suelo para evitar el deterioro y la contaminación ambiental.

Euphorbia cyathophora es una especie silvestre con potencial ornamental que tiene su origen y diversificación en el país. Dado a que no existe información referente a su propagación, microorganismos asociados a su rizosfera, manejo agronómico, compuestos presentes en el látex para su uso o aprovechamiento, y desarrollo biotecnológico, en el presente trabajo (desarrollado en tres capítulos) se abordaron algunos de estos temas.

En el primer experimento (Capítulo I) se evaluó la propagación sexual y asexual de *E. cyathophora* mediante la técnica de cultivo *in vitro*. Las semillas mostraron baja germinación en sustrato y en medio de cultivo. Al evaluar en condiciones *in vitro* tratamientos de luminosidad y de aplicación de reguladores de crecimiento, se observó que el tratamiento con periodos de oscuridad y luz (OL) no promovió el crecimiento de hojas, cotiledones y altura de las plántulas, pero generó un sistema radical más desarrollado con aparición temprana de raíces terciarias. Con respecto a la interacción de los reguladores y el efecto de la luz, se obtuvieron resultados diferenciales dependiendo de los tratamientos, resaltando el tratamiento con $1 \text{ mg BAP L}^{-1} + 0.1 \text{ mg ANA L}^{-1}$ el cual generó brotes en ambas condiciones de luminosidad (OL y CL). El estímulo de oscuridad (OL) generó mayor respuesta morfogénica (formación de callo) y mayor desarrollo; mientras que en condiciones de luz (CL) se obtuvo menor crecimiento y desarrollo de callo en los explantes. Este trabajo implementó un protocolo para la micropropagación de *E. cyathophora*, y permitió además, conocer la influencia de la luz y de los reguladores de crecimiento en la morfogénesis de esta especie ornamental. Además mediante este protocolo sería posible obtener de manera *ex situ*, individuos de esta especie para futuras investigaciones.

Dado a que *E. cyathophora* se caracteriza por crecer en suelos someros y pedregosos sin presentar síntomas de deficiencia o problemas en la nutrición, se planteó conocer algunos grupos microbianos que habitan en la rizosfera de la planta crecida en su hábitat natural (Capítulo II). De esta forma, se colectó suelo rizosférico y raíces de la planta en tres localidades; y se determinó la población de ciertos microorganismos de vida libre (hongos, actinobacterias, bacterias



solubilizadoras de fosfatos, bacterias productoras de índoles, y bacterias fijadoras de nitrógeno), y simbióticos de la raíz (hongos micorrízicos arbusculares, HMA). Se aislaron del suelo rizosférico 76 rizobacterias (24 productoras de ácido indolacético, 30 solubilizadoras de fosfato, y 22 fijadoras de nitrógeno). Las rizobacterias con mayor potencial de fijación de nitrógeno pertenecieron a *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (Sitio Mariposas), *Arthrobacter* sp. CPO 2.64 (Sitio Pedrera), y *Pseudomonas putida* CPO 2.68 (Sitio Troncones). Para la solubilización de fosfatos, se encontró que las cepas con mayor capacidad fueron *Mycobacterium* sp. CPO 2.1 (Sitio Pedrera), *Enterobacter* sp. CPO 2.5, y *Pseudomonas moraviensis* CPO 2.11 (Sitio Troncones); en tanto que las mejores rizobacterias productoras de ácido indolacético (AIA) fueron *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Enterobacter* sp. CPO 2.33 (Sitio Pedrera), y *Arthrobacter oryzae* CPO 2.46 (Sitio Troncones). Los géneros más representativos de HMA en los tres sitios fueron *Glomus*, *Entrophospora*, *Acaulospora* y *Gigaspora*, *Rhizophagus* aff. *fasciculatus*, y *Septoglomus* aff. *constrictum*. En relación a lo anterior, en esta fase experimental fue posible conocer la abundancia de rizobacterias y HMA que habitan de forma natural en la rizosfera de *E. cyathophora*, lo que favorece que esta planta se adapte a suelos pedregosos y con poca profundidad. Análogamente, los microorganismos participan en los ciclos biogeoquímicos al fijar nitrógeno y liberar fósforo de los minerales del suelo, facilitando la disponibilidad de elementos esenciales para la nutrición de esta planta silvestre.

Es importante señalar que las 76 rizobacterias y los HMA constituyen un recurso biotecnológico para su uso en la horticultura ornamental, siguiendo un modelo de sustentabilidad para uso en plantas ornamentales de importancia económica para nuestro país.

Una vez que se conoció el potencial benéfico que tienen los microorganismos aislados de la rizosfera de *E. cyathophora*, se eligieron las tres cepas bacterianas más relevantes: *Bacillus megaterium* CPO 2.35 (productora de ácido indolacético), *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 (fijadora de nitrógeno) y *Enterobacter* sp. CPO 2.5 (solubilizadora de fosfato) para evaluar su efecto en el desarrollo vegetativo (118 días después del trasplante) y reproductivo (236 días después del trasplante) de *Euphorbia pulcherrima* (Capítulo III), especie ornamental de la misma familia botánica con importancia económica en el país y que es comercializada a nivel mundial. Los resultados fueron diferenciales con respecto a la inoculación y a la dosis de fertilización aplicada en *E. pulcherrima*, en ambos muestreos. El área foliar, peso seco total, clorofila, número de ramificaciones y brácteas, y amplitud de la planta fue significativamente superior en las plantas



con la mezcla de bacterias y la fertilización (MIX 50%); en contraste, las plantas sin fertilización desarrollaron raíces más largas y robustas. En la evaluación de contenido de CO₂ subestomático, tasa de transpiración (E), conductancia estomática (gs) y tasa fotosintética (Pn) en la fase vegetativa y reproductiva, también se observaron resultados contrastantes entre dosis de fertilización e inoculación. Sin embargo, la Pn fue mayor cuando se adicionó fertilizante y los mejores valores de E y contenido de CO₂ subestomático correspondió a los tratamientos donde no se fertilizó.

La tasa de crecimiento relativo (TCR) se relacionó positivamente con el área foliar, la clorofila, y el peso seco total de la planta; la mayor TCR fue obtenida en las plantas con la mezcla de bacterias con 50% de fertilización (MIX 50%), mientras que la menor TRC se obtuvo en plantas inoculadas con la mezcla de bacterias sin la adición de fertilizante (MIX 0%). Las plantas que no se fertilizaron e inocularon (S/I 0%) presentaron coloraciones en hojas y brácteas con menor tonalidad y brillo en comparación con aquellas plantas inoculadas y en las que se adicionó fertilizante.

La mezcla de bacterias (MIX) presentó mayor eficiencia en las variables evaluadas a la dosis de 50%. Sin adición de fertilizante (0%), las bacterias solas o en consorcio facilitaron la adquisición de nutrimentos presentes en el sustrato en comparación del tratamiento donde no se fertilizó e inoculó (S/I 0%); por el contrario, la aplicación de 100% de fertilizante no promovió mayor desarrollo y producción en comparación con la fertilización al 50%. Lo anterior indica que al haber nutrimentos en el sustrato, las bacterias disminuyen su efecto benéfico sobre la planta.

Los resultados de esta investigación son pioneros en la propagación *in vitro*, uso de reguladores de crecimiento y condiciones de luz en *E. cyathophora*, y de igual forma, en su aportación al conocimiento del aislamiento e identificación de microorganismos benéficos que viven en la rizosfera de esta planta prioritaria de conservación. Resulta importante señalar que la inoculación con las tres cepas más destacadas, permitió el crecimiento vegetativo y reproductivo de *E. pulcherrima* de forma exitosa al demostrar que con sólo el 50% de la fertilización, se obtienen plantas de nochebuena de calidad igual o superior que las plantas fertilizadas con una dosis de 100%.

Las bacterias aisladas de la rizosfera de *E. cyathophora* (*Pseudomonas* sp. CPO 2.78, *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y *Enterobacter* sp. CPO 2.5) constituyen una biotecnología alterna para ser utilizada en el crecimiento y la producción de *E. pulcherrima*. Además se logró



reducir el uso del fertilizante hasta la mitad del aplicado por los productores, representando un potencial ahorro económico y disminución de contaminantes al ambiente.

Finalmente, el presente trabajo cumple satisfactoriamente con los objetivos e hipótesis propuestos en cada capítulo de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Aguado, S.G.A., Moreno, G.B., Jiménez, F.B., García, M.E., Preciado, O.R.E., 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35, 9-21.
- Aguilera, P., Cornejo, P., Borie, F., Barea, J.M., von Baer, E., Oehl, F., 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Triticum aestivum* L. plants growing in an Andosol with high aluminum level. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 186, 178-184.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2013. Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: A review. *Biochemistry and Molecular Biology* 1, 19-26.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26, 1-20.
- Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. 2000. Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Agricultura Técnica en México* 26, 191-203.
- Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L., Ferrera-Cerrato, R., Franco-Ramírez, A., 2012. Diversity and agricultural applications of arbuscular mycorrhizal fungi in Mexico. *Journal of Biofertilizers and Biopesticides* 3, 115.
- Alba, R., 2017. Flora mexicana en la mira de los traficantes. *Crónica ambiental* 10, 29-32.
- Alcántar, G.G., Trejo, T.L.I., Fernández, P.Y.L., Rodríguez, M.M.N., 2012. Elementos esenciales, in: Alcántar, G.G., Trejo, T.L.I. (Eds.), *Nutrición de cultivos*. Mundi Prensa, México, D. F. 326-363 p.
- Alem, P., Thomas, P.A., Van Iersel, M.W., 2015. Controlled water deficit as an alternative to plant growth retardants for regulation of Poinsettia stem elongation. *HortScience* 50, 565-569.
- Anand, K., Kumari, B., Mallick, M., 2016. Phosphate solubilizing microbes: An effective and alternative approach as biofertilizers. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8, 37-40.
- Andersson, K.O., Tighe, M.K., Guppy, C.N., Milham, P.J., McLaren, T.I., 2015. Incremental acidification reveals phosphorus release dynamics in alkaline vertic soils. *Geoderma* 259, 35-44.
- Andrews, M., Andrews, M.E., 2017. Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 705.
- Anis, M., Ahmad, N., 2016. Plant Tissue Culture: A Journey from Research to Commercialization, in: Anis, M., Ahmad, N., (Eds.), *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer, pp. 3-13
- Aquihuatl, R.M.A., Volke, S.T., Prado, B.L.A., Ramírez, V.F., Salazar, G. M., 2012. Manual de prácticas de laboratorio. *Microbiología general*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. 73 p.
- Armenta, B.A.D., García, G.C., Camacho, B.J.R., Apodaca, S.M.A., Montoya, G. L., Nava, P.E., 2010. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Revista Ra Ximhai* 6, 51-56.
- Ashraf, A., Sarfraz, R.A., Rashid, M.A., Shahid, M., 2015. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *Journal of Food and Drug Analysis* 23, 109-115.
- Aslam, J., Mujib, A., Sharma, M.P., 2013. *In vitro* micropropagation of *Dracaena sanderiana* Sander ex Mast: An important indoor ornamental plant. *Saudi Journal of Biological Sciences* 20, 63-68.

- Bach, A.T., Díaz, M., 2008. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. *Revista Agricultura Orgánica*, 35-38.
- Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D., Vivanco, J.M., 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 642-650.
- Baez, R.A., Morales, G.Y.E., Quintero, H.V., Muñoz, R.J., 2017. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microbial Biotechnology* 10, 19-21.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S., Vivanco, J.M., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233-266.
- Banik, A., Mukhopadhyaya, S.K., Dangar, T.K., 2016. Characterization of N₂-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (*Oryza* spp.) genotypes. *Planta* 243, 799-812.
- Barrett, J., Nell, T., 1981. Transpiration in growth retardant treated poinsettia, bean and tomato. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 94, 85.
- Baset, M., Shamsuddin, Z. H., Wahab, Z., Marziah, M., 2010. Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacterial (PGPR); inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Australian Journal of Crop Science* 4, 85.
- Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R., Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales, in: Ferrera-Cerrato, R., Alarcon, A (Eds.), Chapter 8. *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. Editorial Trillas, Mexico, 170-224 p.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1994. Deep complex morphophysiological dormancy in seeds of the mesic woodland herb *Delphinium tricorne* (Ranunculaceae). *International Journal of Plant Sciences* 155, 738-743.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., Passaglia, L.M., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology* 35, 1044-1051.
- Beneduzi, A., Passaglia, L.M., 2011. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting Bacilli, in: Dinesh, K.M. (Eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-20.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R., Cleyet-Marel, J., 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and Fertility of Soils* 33, 152-156.
- Bhattacharyya, P., Jha, D., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1327-1350.
- Bidarigh, S., Azarpour, E., 2013. Study effect of BAP, GA₃ hormone and light rate of Poinsettia under *in-vitro* condition. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5, 1058.
- Bidwell, R.G.S., 2002. *Fisiología Vegetal*. AGT Editor SA. México, 784.p.
- Bomfeti, C.A., Florentino, L.A., Guimarães, A.P., Cardoso, P.G., Guerreiro, M.C., Moreira, F. M.S., 2011. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35, 657-671.
- Borowski, E., Michalek, S., 2011. The effect of foliar fertilization of French bean with iron salts and urea on some physiological processes in plants relative to iron uptake and translocation in leaves. *Acta Scientiarum Polonorum Zootechnica* 10, 183-193.

- Bresson, J., Varoquaux, F., Bontpart, T., Touraine, B., Vile, D., 2013. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 200, 558-569.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E., 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 535-538.
- Bu, N., Li, X., Li, Y., Ma, C., Ma, L., Zhang, C., 2012. Effects of Na₂CO₃ stress on photosynthesis and antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. *Ecotoxicology and environmental safety* 78, 35-40.
- Burns, R.C., Hardy, R.W., 2012. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer Science & Business Media, pp. 190.
- Calvo, P., Nelson, L., Kloepper, J.W., 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil* 383, 3-41.
- Canavar, Ö., 2015. Effects of water deficit on gas exchange of different age leaves and both stem and leaves solute content of sunflowers. *Agrociencia* 49, 6.
- Canul, K.J., García, P.F., Barrios, G.E.J., Campos, B.E., Osuna, C.F.D.J., Ramírez, R.S., Rangel, E.S.E., 2015. Técnica para producir híbridos en nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *Agroproductividad* 8, 32-37.
- Canul, K.J., García, P.F., Barrios, G.E.J., Rangel, E.S.E., Ramírez, R.S.G., Osuna, C.F., 2017. Alondra: nuevo híbrido de nochebuena para interiores. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8, 1203-1208.
- Castillo, C., Borie, F., Oehl, F., Sieverding, E., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity: prospecting in Southern-Central zone of Chile. A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 16, 400-422.
- Castro, L.M.D.R., de Jesus, P.R.J., da Silva, O.G.L., Machado, J.L., 2010. Análise da folha e da bráctea de *Euphorbia cyathophora*. In V CONNEPI-2010, 1-6.
- Chen, Y., Chao, Y., Li, Y., Lin, Q., Bai, J., Tang, L., Wang, S., Ying, R., Qiu, R., 2016. Survival Strategies of the Plant-Associated Bacterium *Enterobacter* sp. Strain EG16 under Cadmium Stress. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 1734-1744.
- Cheong, J., Do Choi, Y., 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19, 409-413.
- Chitra, M., Senthilkumar, N., Asraf, A., 2014. Antimicrobial and wound healing activities of *Euphorbia cyathophora*. *International Journal of Pharmacology Research* 4, 59-61.
- Colinas, M., Espinosa, A., Mejía, J., Rodríguez, M.A., Pérez, M., Alia-Tejacal, I., 2014. Cultivars of *Euphorbia pulcherrima* from Mexico. in: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014), pp. 487-490.
- Corrales, G.M., Rada, F., Jaimez, R., 2016. Efecto del nitrógeno en los parámetros fotosintéticos y de producción del cultivo de la gerbera (*Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook. f.). *Acta Agronómica* 65, 255-260.
- Corrales, R.L.C., Gálvez, Z.Y.A., Burbano, V.E.M., 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas* 12, 67-79.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2008. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. John Wiley & Sons, pp. 384.

- Cuéllar, N.D., Arrieta Herrera, J.M., 2010. Evaluación de respuestas fisiológicas de la planta arbórea *Hibiscus rosasinensis* L., (Cayeno) en condiciones de campo y vivero. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11, 61-72.
- Currey, C.J., McCabe, K.G., Walters, K.J., 2016. Concentration and timing of ethephon drench applications interact to affect growth and flowering of containerized angelonia and geranium. *HortScience* 51, 1542-1546.
- Curtis, H., Schnek, A., 2008. *Biología*, Ed. Médica Panamericana, 1160 p.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23, 174-181.
- Dardanelli, M.S., Carletti, S.M., Paulucci, N.S., Medeot, D.B., Cáceres, E.R., Vita, F.A., Garcia, M.B., 2010. Benefits of plant growth-promoting rhizobacteria and rhizobia in agricultura, in: Maheshwari, Dinesh K. (Ed), *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-20.
- Das, A., Varma, A., 2009. Symbiosis: The Art of Living, in: Varma, A., Kharkwal, A. C. (Eds.), *Symbiotic Fungi*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-28.
- Davies, P.J., 2010. The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions, in: Davies, P.J. (Ed.), *Plant hormones*. Springer, pp. 1-15.
- De Melo, F.W., Suzuki, R.M., Pescador, R., Rita, C.L., Kerbauy, G.B., 2011. Propagation, growth, and carbohydrates of *Dendrobium* Second love (Orchidaceae) *in vitro* as affected by sucrose, light, and dark. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 47, 420-427.
- Devers, M., Pesce, S., Rouard, N., Martin L.F., 2014. Evidence for cooperative mineralization of diuron by *Arthrobacter* sp. BS2 and *Achromobacter* sp. SP1 isolated from a mixed culture enriched from diuron exposed environments. *Chemosphere* 117, 208-215.
- Devlin, T.M., 2004. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Editorial Reverté, 1219 p.
- Dominguez, S.J.M., Gutiérrez, R.A.D., Prieto, G.F. Acevedo, S.O., 2012. Sistema de Notación Munsell y CIELab como herramienta para evaluación de color en suelos. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 3, 141-155.
- Doyle, J.J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11-15.
- Dressler, R.L., 1961. A synopsis of Poinsettia (Euphorbiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 48, 329-341.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R., 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 85-125.
- Ecke, P.V.E., Faust, A., Higgins, J.W., 2004. *The Ecke Poinsettia Manual*. Ball publishing. Illinois 6051, p. 287.
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., Berg, G., 2016. Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, and nodulation of soybean under salt stress. *Plant and Soil* 405, 35-45.
- El-Esawi, M.A., 2016. Micropropagation technology and its applications for crop improvement. in: Anis, M., Ahmad, N. (Eds.), *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer, Singapore, pp. 523-545.
- Elsheikh, A., Daffalla, H., Khalfala, M., 2013. *In vitro* micropropagation of the ornamental plant *Dieffenbachia*-A review. *Universal Journal of Plant Science* 1, 91-99.

- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo, M.L., Delgado, H., 2012. Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. Pastos y Forrajes 35, 407-416.
- Etchevers, B.J.D. 1992. Manual de métodos para análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes. Análisis rutinarios en estudios y programas de fertilidad. Laboratorio de Fertilidad, Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. de México, 150 p.
- Fageria, N.K., 2012. The role of plant roots in crop production. CRC Press. Taylor & Francis Books. New York, pp. 452.
- Fageria, N.K., Moreira, A., 2011. The role of mineral nutrition on root growth of crop plants. Advances in agronomy 110, 251-331.
- Faure, D., Vereecke, D., Leveau, J.H., 2009. Molecular communication in the rhizosphere. Plant Soil 321, 279-303.
- Faust, J. E., Korczynski, P. C., Klein, R. 2001. Effects of paclobutrazol drench application date on poinsettia height and flowering. HortTechnology 11, 557-560.
- Fernández, G.A.J., Martínez, H.P., Cobo, D.J.F., Villadas, P.J., Martínez, M.E., Toro, N., Tringe, S.G., Fernández, L.M., 2017. The rhizosphere microbiome of burned holm-oak: potential role of the genus *Arthrobacter* in the recovery of burned soils. Scientific Reports 7, 6008-6017.
- Fernández, L.A., Zalba, P., Gómez, M.A., Sagardoy, M.A., 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. Ciencia del Suelo 23, 31-37.
- Flexas, J., Bota, J., Escalona, J.M., Sampol, B., Medrano, H., 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. Functional Plant Biology 29, 461-471.
- Forde, B., Lorenzo, H., 2001. The nutritional control of root development. Plant Soil 232, 51-68.
- Fortin, J.A., 2009. Mycorrhizas: The new green revolution. Québec City, CA: Editions MultiMondes, pp. 148.
- Francis, I., Holsters, M., Vereecke, D., 2010. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. Environmental Microbiology 12, 1-12.
- Galdiano, J.R.F., Pedrinho, E.A.N., Castellane, T.C.L., Lemos, E.G. M., 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. Revista Brasileira de Ciência do Solo 35, 729-737.
- Galindo, G.D.V., Alia, T.I., Valdez, A.L.A., Colinas, L.M.T., Villegas, T.Ó.G., López, M.V., Sainz, A.M.J., Guillén, S.D., 2015. Extracción de macronutrientes y crecimiento en variedades de nochebuena de sol nativas de México. Revista fitotecnia mexicana 38, 305-312.
- Gamborg, O.L., 2002. Plant tissue culture. Biotechnology Milestones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 38, 84-62.
- Gámez, M.O., Villavicencio, E.G., Serrato, C.M.A., Mejía, M.J.M., Treviño, C.G., Martínez, G.L., Rodríguez, O.M., Granada, C.L., Flores, M.C., Reyes, J.S., Islas, L. M., Salomé, C.E., Menchaca, G.R.A., Espadas, M.C.M., Hernández, S.L., Vázquez, G.L.M., Martínez, M.F., Vargas, P.E.O., Ríos, S., 2016. Conservación y aprovechamiento sostenible de especies ornamentales nativas de México. SNICS y UACH. 152 p.
- García, L.S., 2015. Evaluación de genotipos de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) en Tetela del Monte, Cuernavaca, Morelos. Tesis de licenciatura, Departamento de Fitotecnia, UACH. 34 p.

- Gendreau, E., Corbineau, F., 2009. Physiological aspects of seed dormancy in woody ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants* 9, 151-158.
- Geneve, R.L., 1998. Seed dormancy in commercial vegetable and flower species. *Seed Technology* 20, 236-250.
- Geng, Z.F., Liu, Z.L., Wang, C.F., Liu, Q.Z., Shen, S.M., Liu, Z.M., Du, S.S., Deng, Z.W., 2011. Feeding deterrents against two grain storage insects from *Euphorbia fischeriana*. *Molecules* 16, 466-476.
- Gerdemann, J., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46, 235-244.
- Gil, A.I., Miranda, D., 2011. Efecto de cinco sustratos sobre índices de crecimiento de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) bajo invernadero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 1, 142-153.
- Glick, B. R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research* 169, 30-39.
- Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., Prasad, R., Varma, A., 2008. Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know? in: Varma, A. (Ed), *Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics* (3). Berlin, Heidelberg, Springer, 3-27 pp.
- González, Á., 2009. Aplicación del medidor portátil de clorofila en programas de mejora de trigo y cebada. *Agroecología* 4, 111-116.
- González, R.E., Manzo, G.A., 2008. Manual de técnicas selectas de cultivo de tejidos vegetales. Departamento de Fitotecnia, UACH. 151 p.
- González-Chávez, M.C.A., Gutiérrez-Castorena, M.C., Wright, S., 2004. Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *Terra Latinoamericana* 22, 507-514.
- Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of Indoleacetic Acid. *Plant Physiology* 26, 192-195.
- Göre, M.E., Altin, N., 2006. Growth promoting of some ornamental plants by root treatment with specific fluorescent *Pseudomonans*. *Journal of Biological Sciences* 6, 610-615.
- Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2, 1127500.
- Gothandam, K., Aishwarya, R., Karthikeyan, S., 2010. Preliminary screening of antimicrobial properties of few medicinal plants. *Journal of Phytology* 2, 1-6.
- Goyal, M., Sasmal, D., Nagori, B.P., 2012. GCMS analysis and antimicrobial action of latex of *Euphorbia caducifolia*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 119-123.
- Grageda, C.O., Vera, N.J., Castellanos, J., Peña, C.J., 2003. Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *Terra Latinoamericana* 21, 65-71.
- Grageda, C.O.A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J.J., Vera-Nuñez, J.A., 2012. Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3, 1261-1274.
- Gupta, A., Gopal, M., Tilak, K., 2000. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology* 38, 856-862.
- Gyuris, A., Szlavik, L., Minarovits, J., Vasas, A., Molnar, J., Hohmann, J., 2009. Antiviral activities of extracts of *Euphorbia hirta* L. against HIV-1, HIV-2 and SIVmac251. *In Vivo* 23, 429-432.

- Ha, L.T., Pawlicki-Jullian, N., Pillon-Lequart, M., Boitel-Conti, M., Duong, H.X., Gontier, E., 2016. Hairy root cultures of *Panax vietnamensis*, a promising approach for the production of ocotillo-type ginsenosides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 126, 93-103.
- Hagel, J.M., Yeung, E.C., Facchini, P.J., 2008. Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in plant science* 13, 631-639.
- Hardy, R., Burns, R.C., Holsten, R.D., 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology & Biochemistry* 5, 47-81.
- Haslam, E., Cai, Y., 1994. Plant polyphenols (vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Natural Product Reports* 11, 41-66.
- Hazarika, B., Ansari, S., 2007. Biofertilizers in fruit crops, A review. *Agricultural Reviews-Agricultural Research Communications Centre India* 28, 69.
- Hepher, A., Roberts, J. A., 1985. The control of seed germination in *Trollius ledebourii*: the breaking of dormancy. *Planta* 166, 314-320.
- Hernández, A.E., Gutiérrez, C.M.C., Rubiños, P.J.E., Alvarado, L.J., 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 24, 463-470.
- Hill, T., Lewicki, P., Lewicki, P., 2006. *Statistics: Methods and applications: A Comprehensive reference for science, industry, and data mining*. StatSoft Inc, pp. 833.
- Horn, J.W., van Ee, B.W., Morawetz, J.J., Riina, R., Steinmann, V.W., Berry, P.E., Wurdack, K.J., 2012. Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 305-326.
- Horvath, D., Wurdack, K., Pullin, K.L., 2011. *Euphorbia*. in: Kole C. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Plantation and Ornamental Crops*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 125-132.
- Hua, J., Liu, Y., Xiao, C., Jing, S., Luo, S., Li, S., 2017. Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. *Phytochemistry* 136, 56-64.
- Huang, P., de-Bashan, L., Crocker, T., Kloepper, J.W., Bashan, Y., 2017. Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of crop plants. *Biology and Fertility of Soils* 53, 199-208.
- Huetteman, C.A., Preece, J.E., 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33, 105-119.
- Hughes, K.W., 1981. *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environmental and Experimental Botany* 21, 281-288.
- Husen, E., 2016. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4, 27-31.
- Hussain, A., Arshad, M., Ahmad, Z., Ahmad, H., Afzal, M., Ahmad, M., 2015. Potassium fertilization influences growth, physiology and nutrients uptake of maize (*Zea mays* L.). *Cercetari Agronomice in Moldova* 48, 37-50.
- Hussain, A., Hasnain, S., 2009. Cytokinin production by some bacteria: its impact on cell division in cucumber cotyledons. *African Journal of Microbiology Research* 3, 704-712.
- Hussain, A., Hasnain, S., 2011. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 2645.
- Hynes, R.K., Leung, G.C., Hirkala, D.L., Nelson, L.M., 2008. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western. *Canadian Journal of Microbiology* 54, 248-258.

- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A., 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *Plant Cell* 25, 3159-3173.
- Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G., Jain, S.M., 2010. Plant micropropagation. in: Davey, M. R., Anthony, P. (Eds.), *Plant cell culture: Essential methods*. John Wiley & Sons. pp. 1-23.
- Isah, T., 2015. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica* 57, 9-28
- Isaza, M., Hipólito, J., 2007. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* 13, 13-18.
- Jaramillo, R., 2011. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: Comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Revista Contactos* 81, 17-23.
- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Jaleel, C.A., Deiveekasundaram, M., 2010. Effect of root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth, alkaloid content and nutrient control of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *National Croatian* 19, 205-212.
- Kayasth, M., Kumar, V., Gera, R., 2014. *Gordonia* sp.: A salt tolerant bacterial inoculant for growth promotion of pearl millet under saline soil conditions. *3 Biotech* 4, 553-557.
- Kaymak, H.C., 2010. Potential of PGPR in agricultural innovations, in: Maheshwari, Dinesh K. (Ed), *Plant growth and health promoting bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 45-79.
- Knowles, R., 2013. Acetylene inhibition technique: Development. *Denitrification in Soil and Sediment* 56, 151.
- Koltai, H., Kapulnik, Y., 2010. Arbuscular mycorrhizal symbiosis under stress conditions: benefits and costs. in: Seckbach, J., Grube, M. (Eds.), *Symbioses and stress*. Springer Netherlands, pp. 339-356.
- Kondamudi, R., Murthy, K.S.R., Pullaiah, T., 2009. Euphorbiaceae - A critical review on plant tissue culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10, 313-335.
- Konno, K., 2011. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* 72, 1510-1530.
- Koornneef, M., Bentsink, L., Hilhorst, H., 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 33-36.
- Krikorian, A.D., 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation, in: Davies, P.J. (Ed.), *Plant hormones*. Springer, pp. 774-796.
- Krishnaraj, P.U., Dahale, S., 2014. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 389-405.
- Kumar, A., Bahadur, I., Maurya, B., Raghuwanshi, R., Meena, V., Singh, D., Dixit, J., 2015. Does a plant growth promoting rhizobacteria enhance agricultural sustainability. *Journal of Applied Microbiology* 9, 715-724.
- Kumar, A.S., Lakshmanan, V., Caplan, J.L., Powell, D., Czymbek, K.J., Levia, D.F., Bais, H.P., 2012. Rhizobacteria *Bacillus subtilis* restricts foliar pathogen entry through stomata. *The Plant Journal* 72, 694-706.
- Kumar, M., Prasad, R., Goyal, P., Teotia, P., Tuteja, N., Varma A., Kumar, V., 2017. Environmental Biodegradation of Xenobiotics: Role of Potential Microflora, in: Hashmi, M., Kumar V., Varma A. (Eds.), *Xenobiotics in the Soil Environment*. Soil Biology, vol 49. Springer, Cham, pp. 319-334.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870-1874.
- Lack, W.H., 2011. The discovery, naming and typification of *Euphorbia pulcherrima* (Euphorbiaceae). *Willdenowia* 41, 301-309.

- Le Dang, Q., Choi, Y.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Park, M.S., Park, N., Lim, C.H., Kim, H., Ngoc, L.H., Kim, J., 2010. Pesticidal activity of ingenane diterpenes isolated from *Euphorbia kansui* against *Nilaparvata lugens* and *Tetranychus urticae*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13, 51-54.
- Lee, C., Lee, Y., Jeun, Y., 2005. Observations of infection structures on the leaves of cucumber plants pre-treated with arbuscular mycorrhiza *Glomus intraradices* after challenge inoculation with *Colletotrichum orbiculare*. *The Plant Pathology Journal* 21, 237-243.
- Lee, E., Koh, J., 2002. Improvement of seed germination in native *Iris sanguinea* Donn ex Horn. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 20, 345-351.
- Lekberg, Y., Gibbons, S.M., Rosendahl, S., Ramsey, P.W., 2013. Severe plant invasions can increase mycorrhizal fungal abundance and diversity. *International Society for Microbial Ecology* 7, 1424-1433.
- Lekberg, Y., Koide, R.T., Rohr, J.R., Aldrich-Wolfe, L., Morton, J.B., 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95, 95-105.
- Lenoir, I., Fontaine, J., Sahraoui, A.L., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: A review. *Phytochemistry* 123, 4-15.
- Lezcano, Y., Escalona, M., Daquinta, M., 2010. *In vitro* propagation of *Paeonia* sp. *Actualidades Biológicas* 32, 19-28.
- Linsmaier, E.M. Skoog, F., 1965. Organic growth factor requirement for tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 18, 100-127.
- Lira, S.R.H., 2008. *Fisiología Vegetal*, 2da Edición, Trillas, México, D.F. 237 p.
- Litvin, A.G., van Iersel, M.W., Malladi, A., 2016. Drought stress reduces stem elongation and alters gibberellin-related gene expression during vegetative growth of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 141, 591-597.
- Liu, X.C., Zhou, L., Liu, Z.L., 2014. Evaluation of nematicidal activity of ethanol extracts of Euphorbiaceae plants and constituents from *Euphorbia fischeriana* to *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2, 311-317.
- Ljung, K., 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943-950.
- Lodish, H., 2005. *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana, España. 1088 p.
- López, B.J., Cruz R.A., Herrera E.L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology* 6, 280-287.
- Loyola-Vargas, V.M., Sánchez-Iturbe, P., Canto-Canché, B., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Galaz-Ávalos, R.M., Moreno-Valenzuela, O., 2004. Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. *Revista de la Sociedad Química de México* 48, 67-94.
- Luna, M.E.M., Enríquez, V.J.R, Velasco, V.A., Villegas A.Y., Carrillo R.J.C., 2014. Concentración de benziladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* 46, 97-107.
- Lynn, K., Clevette-Radford, N., 1984. Euphorbain p, a serine protease from *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry* 23, 682-683.
- Majid, M., Khan, M.R., Shah, N.A., Haq, I.U., Farooq, M.A., Ullah, S., Sharif, A., Zahra, Z., Younis, T., Sajid, M., 2015. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. *BMC complementary and alternative medicine* 15, 349.

- Manchanda, G., Singh, R.P., Li, Z.F., Zhang, J.J., 2017. Mycorrhiza: Creating Good Spaces for Interactions. in: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (Eds.), Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art. Springer International Publishing, pp. 39-60.
- Maness, P., Weaver, P., 2001. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 751-756.
- Marinetti, G., 1962. Chromatographic separation, identification, and analysis of phosphatides. *Journal of Lipid Research* 3, 1-20.
- Martin, K., Sunandakumari, C., Chithra, M., Madhusoodanan, P., 2005. Influence of auxins in direct *in vitro* morphogenesis of *Euphorbia nivulia*, a lectinaceous medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 41, 314-319.
- Martínez, E., Fuentes, J.P., Acevedo, E., 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la Ciencia del Suelo Nutrición Vegetal* 8, 68-96.
- Martínez, G.M., Jiménez, R.J., Cruz, D.R., Juárez, A.E., García, R., Cervantes, A., Mejía, H.R., 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México* 73, 155-281.
- Martínez, M.E., Sosa, E.J.E., Álvarez, F., 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿Una ruta con dirección? *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85, 1-9.
- Matias, E.F., Santos, K., Almeida, T.S., Costa, J.G., Coutinho, H.D., 2010. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Revista Brasileira de Biociências* 8, 1-3.
- Matilla, M.A., Krell, T., 2017. Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos. *Alianzas y Tendencias* 2, 14-21.
- Matysiak, B., Falkowski, G., 2010. Response of three ornamental plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi depending on compost addition to peat substrate and the rate of controlled release fertilizer. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18, 321-333.
- Mayfield, M.H., 1997. A systematic treatment of *Euphorbia* subgenus *Poinsettia* (Euphorbiaceae). Tesis Doctoral. University of Texas, pp. 230.
- Mayfield, M.H., Steinmann, V.W., 2010. *Euphorbia spellenbergiana* (Euphorbiaceae), a new species from Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 43-50.
- Mehne-Jakobs, B., 1996. Magnesium deficiency treatment causes reductions in photosynthesis of well-nourished Norway spruce. *Trees* 10, 293-300.
- Mehta, S., Nautiyal, C.S., 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43, 51-56.
- Mejía, M.J.M., Colinas, L.M.T., Espinosa, F.A., Martínez, M.F., Gaytán, A.A. Alia, T.I., 2006. Manual gráfico para la descripción varietal de nochebuena (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). SNICS- SAGARPA y UACH. Chapingo, México, 60 p.
- Mejía, M.J.M., Espinosa, F.A., 2003. Plantas nativas de México con potencial ornamental: Análisis y perspectivas. UACH, 185 p.
- Mendes, R., Garbeva, P., Raaijmakers, J.M. 2013. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews* 37, 634-663.
- Mesía, L.R., Mesía, W.R., Ríos, J.R., Encinas, L.A., Artiles, M.R., González, A., Coloma, R., 2012. Búsqueda de principios activos antiparasitarios en plantas de uso tradicional de la amazonia peruana. Especial énfasis en alcaloides indólicos. *Ciencia Amazónica (Iquitos)* 2, 116-123.

- México Produce., 2016. Disponible en: [http:// www.mexicoproduce.mx /p/acercade. html](http://www.mexicoproduce.mx/p/acercade.html). Consultado el 14 de Agosto de 2017.
- Mills, H.A., Jones Jr, J.B., 1991. Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc.
- Miransari, M., 2011. Soil microbes and plant fertilization. Applied Microbiology and Biotechnology 92, 875-885.
- Miyashima, S., Sebastian, J., Lee, J.Y., Helariutta, Y., 2013. Stem cell function during plant vascular development. EMBO Journal 32, 178-193.
- Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13, 638-649.
- Mohsen, M., Ismail, H., 2016. Response of *Calendula officinalis* L. which grown in saline soil to Plant Growth Promoters and some organic substances. International Journal of Pharm Tech Research 9, 153-172.
- Molnár, Z., Virág, E., Ordog, V., 2011. Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biologica Szegediensis 55, 123-127.
- Morel, M.A., Braña, V., Castro-Sowinski, S., 2012. Legume crops, importance and use of bacterial inoculation to increase production. in: Aakash G. (Ed.), Plant Crop. Intech, Rijeka, pp. 217-240.
- Moreno, L.Y., Galvis, F., 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Pastos y Forrajes 36, 33-37.
- Moreno, S.G., Vela, H.P., Alvarez, M.O.S., 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. Revista de Educación Bioquímica 27, 119-129.
- Morgan, J., Connolly, E., 2013. Plant-soil interactions: Nutrient uptake. Nature Education Knowledge 4, 2.
- Munro, B., Vuong, Q.V., Chalmers, A.C., Goldsmith, C.D., Bowyer, M.C., Scarlett, C.J., 2015. Phytochemical, antioxidant and anti-cancer properties of *Euphorbia tirucalli* methanolic and aqueous extracts. Antioxidants 4, 647-661.
- Murashige, T., Skoog, T., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15, 473-97.
- Mwine, J.T., Van Damme, P., 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. Journal of Medicinal Plants Research 5, 652-662.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170, 265-270.
- Neidhart, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. 1990. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Vol 20. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Nhut, D.T., An, T.T.T., Huong, N.T.D., Don, N.T., Hai, N.T., Thien, N.Q., Vu, N.H., 2007. Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverse thin cell layer culture. Scientia Horticulturae 111, 146-151.
- Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I., 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environmental Microbiology 10, 2966-2978.

- Niranjan, R.S., Shetty, H.S., Reddy, M.S., 2005. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity, in: Siddiqui, Z.A. (Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 197-216.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000., 2002. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis: México, 85 p.
- Ortíz, I., Avila-Chávez, M.A., Torres, L.G., 2013. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* 4, 1-21.
- Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N., 2015. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology* 6, 745-750.
- Pahlevani, A.H., Riina, R., 2011. A synopsis of *Euphorbia* subgen. *Chamaesyce* (Euphorbiaceae) in Iran. *Annales Botanici Fennici* 48, 304-316.
- Palaniappan, P., Chauhan, P.S., Saravanan, V.S., Anandham, R., Sa, T., 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology and Fertility of Soil* 46, 807-816.
- Palocci, C., Soro, S., Cernia, E., Fiorillo, F., Belsito, C.M., Monacelli, B., Delle Monache, G., Pasqua, G., 2003. Lipolytic isoenzymes from *Euphorbia latex*. *Plant Science* 165, 577-582.
- Panhwar, Q.A., Othman, R., Rahman, Z.A., Meon, S., Ismail, M.R., 2012. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. *African Journal of Biotechnology* 11, 2711-2719.
- Paredes-Mendoza, M., Espinosa-Victoria, D., 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latinoamericana* 28, 61-70.
- Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3795-3801.
- Perera, D., Trader, B.W., 2010. Poinsettia 'Prestige™ Red' (*Euphorbia pulcherrima*) *in vitro* propagation. *HortScience* 45, 1126-1128.
- Pérez, B.M., Rigo, M.D., Díaz, C. A. H., Ramos, R.A., 2007. Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9, 35-40.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11, 789-799.
- Phillips, J.M., Hayman, D., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55, 158-161.
- Pierik, R.L.M., 2012. *In vitro* culture of higher plants. Springer Science & Business Media, pp. 347.
- Pintus, F., Spanó, D., Medda, R., Floris, G., 2011. Calcium ions and a secreted peroxidase in *Euphorbia characias* latex are made for each other. *The Protein Journal* 30, 115-123.
- Piotrowski, J.S., Rilling M.C., 2007. Succession of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Patterns, Causes, and Considerations for Organic Agriculture. *Advances in Agronomy* 97, 111-130.
- Pírez, M., Mota, M., 2000. Morfología y estructura bacteriana. *Revista en internet* 3, 23-42.
- Plesničar, M., Kastori, R., Petrović, N., Panković, D., 1994. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. *Journal of Experimental Botany* 45, 919-924.

- Podile, A.R., Kishore, A.K., 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer Science & Business Media, pp. 195-230.
- Ponmurugan, P., Kumar, S.K., 2012. Applications of plant tissue culture. Editorial: New Age International, pp. 222.
- Porta, C.J., López, A.M., Poch, M.R., 2014. Edafología, Uso y protección de suelos. Mundi-prensa, 608 p.
- Prasad, R., Bhola, D., Akdi, K., Cruz, C., Sairam, K.V.S.S., Tuteja, N., Varma, A., 2017. Introduction to mycorrhiza: Historical development. in: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (Eds.), Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art. Springer International Publishing. pp. 1-7.
- Puerta, G.A., Mateos, R.F., 2010. Enterobacterias. *Medicine* 10, 3426-3431.
- Püschel, D., Rydlová, J., Vosátka, M., 2014. Can mycorrhizal inoculation stimulate the growth and flowering of peat-grown ornamental plants under standard or reduced watering? *Applied Soil Ecology* 80, 93-99.
- Quintana-Escobar, A.O., Iracheta-Donjuan, L., Méndez-López, I., Alonso-Báez, M., 2017. Caracterización de genotipos elite de *Coffea canephora* por su tolerancia a sequía. *Agronomía Mesoamericana* 28, 183-188.
- Quirós, H.J., Alizaga, R.G.B., Jiménez, V.E., 2006. Germinación y crecimiento de la planta, San José, CR: Edit. de la Universidad de Costa Rica, 124 p.
- Quraishi, A., Koche, V., Mishra, S., 1996. *In vitro* micropropagation from nodal segments of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45, 87-91.
- Ramawat, K.G., 2007. Secondary plant products in nature, in: Ramawat, K.G. (Ed.), *Biotechnology*. Science Publishers, ProQuest Ebook Central. pp. 21- 58.
- Ramezani, M., Behravan, J., Arab, M., Farzad, A.S., 2008. Antiviral activity of *Euphorbia helioscopia* extracts. *Journal of Biological Sciences* 8, 809-813.
- Ramírez, G.R.M., Urzúa, H.M.C., Camacho, C.A., Tsuzuki, R.G., Esquivel, C.R., 2015. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Editorial Trillas, México, D.F. 374 p.
- Ramírez, Z.G., Chávez-Servia, J.L., 2014. Mejoramiento genético de ornamentales del Estado de México. Instituto de Investigación y Capacitación Agrícola, Acuícola y Forestal del Estado de México, Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Oaxaca, COFUPRO. Estado de México, México.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., Latif, F., 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7, 187-196.
- Raven, P., Evert, R., Eichhorn, S., 1992. The movement of water and solutes in plants. *Biology of plants*. Worth Publishers, New York, pp. 791.
- Redecker, D., 2008. Glomeromycota. Arbuscular mycorrhizal fungi and their relatives. Version 2008. Disponible en: <http://tolweb.org/Glomeromycota/28715/2008.01.14> in The Tree of Live Web Project.
- Rennie, R.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (Dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal Microbiology* 27, 8-14.
- Restrepo, F., G.M., Marulanda, M.S., de la Fe, P.Y., Díaz, O.A., Lucia, B.V., Hernández, R.A., 2015. Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 46, 63-76.
- Reyes, I., Valery, A., 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro* 19, 117- 126.

- Reynolds, M., Pask, A., Mullan, D., Chavez-Dulanto, P., 2013. Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. CIMMYT, 174 p.
- Rice, W., Paul, E., 1971. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. *Canadian Journal of Microbiology* 17, 1049-1056.
- Richmond, G.S., Ghisalberti, E.L., 1994. Seed dormancy and germination mechanisms in *Eremophila* (Myoporaceae). *Australian Journal of Botany* 6, 705-715.
- Roberts, M.F., Wink, M., 2013. Introduction. in: Roberts, M. F. (Ed.), *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications*. Springer Science & Business Media. pp. 1-7.
- Roca, L., Mroginski, A., 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones (No. 151). CIAT, 969 p.
- Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319-339.
- Rodríguez, H., Gonzalez, T., Selman, G., 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology* 84, 155-161.
- Rolim, R.G., de Ferreira, P.M.A., Schneider, A.A., Overbeck, G.E., 2015. How much do we know about distribution and ecology of naturalized and invasive alien plant species? A case study from subtropical southern. *Brasil Biological Invasions* 17, 1497-1518.
- Rout, G., Mohapatra, A., Jain, S.M., 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances* 24, 531-560.
- Royal Horticultural Society (RHS). 2006. Colour chart. The Royal Horticultural Society, London, England.
- Royero, M., Vargas, T.E., Oropeza, M., 2007 Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia* 32, 247-252.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Dow, J.M., 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7, 514.
- Rzedowski, J., 1991. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. *Acta Botánica Mexicana* 14, 3-21.
- Saber, Z., Pirdashti, H., Esmaeili, M., Abbasian, A., Heidarzadeh, A. 2012. Response of wheat growth parameters to co-inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and different levels of inorganic nitrogen and phosphorus. *World Applied Sciences Journal* 16, 213-219.
- Sáenz, L., Azpeitia, A., Oropeza, C., Jones, L.H., Fuchsova, K., Spichal, L., Strnad, M., 2010. Endogenous cytokinins in *Cocos nucifera* L. *in vitro* cultures obtained from plumular explants. *Plant cell reports* 29, 1227-1234.
- Sakakibara, H., 2010. Cytokinin biosynthesis and metabolism. in: Davies P.J.(Ed.), *The plant hormones: their nature, occurrence, and functions*. Springer Netherlands. pp. 95-114.
- Sakakura, A., Takayanagi, Y., Kigoshi, H., 2002. Jolkinolide D pharmacophore: synthesis and reaction with amino acids, nucleosides, and DNA. *Tetrahedron Letters* 43, 6055-6058.
- Saldívar, I.P., Laguna, C.A., Gutiérrez, R.F., Domínguez, G.M., 2010. Ácido giberélico en la germinación de semillas de *Jaltomata procumbens* (Cav.) J.L. Gentry. *Agronomía Mesoamericana* 21, 327-331.
- Salmerón, S.I.A., Pedraza, S.M.E., Mendoza, O.L.S., Chávez, B.A.T., 2015. Cronología de la taxonomía y cladística de los glomeromicetos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38, 153-163.

- Samidurai, K., Mathew, N., 2014. Bioassay guided fractionation and GC-MS analysis of *Euphorbia lactea* extract for mosquito larvicidal activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6, 344-347.
- Santi, C., Bogusz, D., Franche, C., 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany* 111, 743-767.
- Santos-Castellanos, M., Segura-Abril, M., Núñez-López, C.E., 2010. Análisis de crecimiento y relación fuente-demanda de cuatro variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el municipio de Zipaquirá (Cundinamarca, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 63, 5253-5266.
- SAS Institute Inc., 2015. SAS User's Guide. Release 9.4 Edition. North Carolina, U.S.A.
- Satyaprakash, M., Nikitha, T., Reddi, E., Sadhana, B., Vani, S.S., 2017. Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 2133-2144.
- Sawinski, K., Mersmann, S., Robatzek, S., Böhmer, M., 2013. Guarding the green: pathways to stomatal immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26, 626-632.
- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30, 3875-3883.
- Scherlach, K., Hertweck, C., 2009. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic and biomolecular chemistry* 7, 1753-1760.
- Schmidt, C.S., Alavi, M., Cardinale, M., Müller, H., Berg, G., 2012. *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405T promotes plant growth probably by altering fungal communities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 48, 947-960.
- Schmidt, S., Naumann, I.D., De Barro, P.J., 2001. Encarsia species (Hymenoptera: Aphelinidae) of Australia and the Pacific Islands attacking *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) a pictorial key and descriptions of four new species. *Bulletin of Entomological Research* 91, 369-387.
- Sedano-Castro, G., González-Hernández, V., Engleman, E., Villanueva-Verduzco, C., 2005. Dinámica del crecimiento y eficiencia fisiológica de la planta de calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11, 291-297.
- Seldin, L., Van Elsas, J., Penido, E.G., 1983. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant and Soil* 70, 243-255.
- Sellal, Z., Ouazzani Touhami, A., Chliyeh, M., Dahmani, J., Benkirane, R., Douira, A., 2016. Arbuscular Mycorrhizal fungi species associated with rhizosphere of *Argania spinosa* (L.) Skeels in Morocco. *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 4, 82-99.
- SEMARNAT., 2007. Situación de la flora y fauna del estado de México respecto a la NOM-059-SEMARNAT-2001. SECRETARIA DEL MEDIO AMBIENTE, Toluca, Méx. Disponible en: http://sma.edomex.gob.mx/sites/sma.edomex.gob.mx/files/files/sma_pdf_flora_fauna_em.pdf.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2, 587 pp.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., Zhang, F., 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiology* 156, 997-1005.
- Shi, J., Li, Z., Nitoda, T., Izumi, M., Kanzaki, H., Baba, N., Kawazu, K., Nakajima, S., 2008. Antinematodal activities of ingenane diterpenes from *Euphorbia kansui* and their derivatives against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *A. Journal of Biosciences C.* 63, 59-65.

- Shi, S., Qu, Y., Ma, F., Zhou, J., 2014. Bioremediation of coking wastewater containing carbazole, dibenzofuran, dibenzothiophene and naphthalene by a naphthalene-cultivated *Arthrobacter* sp. W1. *Bioresource technology* 164, 28-33.
- Shi, Z., Liu, D., Wang, F., 2013. Spatial variation of arbuscular mycorrhizal fungi in two vegetation types in Gurbantonggut Desert. *Contemporary Problems of Ecology* 6, 455-464.
- Shin, W., Islam, R., Benson, A., Joe, M.M., Kim, K., Gopal, S., Samaddar, S., Banerjee, S., Sa, T., 2016. Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 49, 17-29.
- Shukla, A., Vyas, D., Anuradha, J., 2013. Soil depth: an overriding factor for distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13, 23-33.
- Singh, A.V., Chandra, R., Goel, R., 2013. Phosphate solubilization by *Chryseobacterium* sp. and their combined effect with N and P fertilizers on plant growth promotion. *Archives of Agronomy and Soil Science* 59, 641-651.
- Singh, B., Satyanarayana, T., 2011. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 17, 93-103.
- Smith, J., Doran, J., 1996. Measurement and use of pH and electrical conductivity for soil quality analysis. *Methods for Assessing Soil Quality*. Soil Science Society of America (SSSA). Special Publication. Madison, pp. 49.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1985. *Methods in Legume-Rhizobium Technology*. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources Paia, Maui, pp. 367.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, 1-13.
- Srivastava, L.M., 2002. *Plant growth and development: Hormones and environment*. Academic Press, pp. 774.
- Starkey, K.R., Andersson, N.E., 2000. Effects of light and nitrogen supply on the allocation of dry matter and calcium in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75, 251-258.
- Starkey, K.R., Nielsen, N.E., 2001. Reduced N and K application increases the uptake of Ca and improves the quality of Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzsch). in: Horst, W.J., Schenk, M.K., Bürkert, A., Claassen, N., Flessa, H., Frommer, W.B., Goldbach, H., Olf, W., Römheld, V., Sattelmacher, U., Schubert, S., Wirén, N.V., Wittenmayer, L. (Eds.), *Plant nutrition. Developments in plant and soil sciences*. Vol 92. Springer, Dordrecht, pp. 312-313.
- Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V., Mihasan, M., Hritcu, L. 2013. Seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). *Scientia Horticulturae* 151, 22-29.
- Steinmann, V.W., 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana* 61, 61-93.
- Steinmann, V.W., 2012. *Euphorbia mayfieldii*, a New Species of Section *Poinsettia* from Bolivia. *Systematic Botany* 37, 960-963.
- Sun, Y., Zhang, Y., Wang, K., Qiu, X., 2006. NaOH scarification and stratification improve germination of *Iris lactea* var. chinensis seed. *HortScience* 41, 773-774.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2006. *Fisiología vegetal*, Vol. I y II, Universitat Jaume I, 1338 p.
- Taylor, J.M., Lopez, R.G., Currey, C.J., Janick, J., 2011. The poinsettia: History and transformation. *Chronica Horticulturae* 51, 23-28.

- Teotia, P., Kumar, M., Prasad, R., Kumar, V., Tuteja, N., Varma, A., 2017. Mobilization of micronutrients by mycorrhizal fungi. in: Varma, A., Prasad, R., Tuteja, N. (Eds.), Mycorrhiza-Function, Diversity, State of the Art. Springer International Publishing, pp. 9-26.
- Thorpe, T.A., Patel, K.R., Vasil, I., 2012. Clonal propagation: adventitious buds. Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants 1, 49-60.
- Tigabu, M., Oden, P., 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. Seed Science and Technology 29, 11-20.
- Timmusk, S., Paalme, V., Pavlicek, T., Bergquist, J., Vangala, A., Danilas, T., Nevo, E., 2011. Bacterial distribution in the rhizosphere of wild barley under contrasting microclimates. PLoS One 6, 17968.
- Tindall, B.J., Sikorski, J., Smibert, R.A., Krieg, N.R., 2007. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics, in: Reddy, C., Beveridge, T., Breznak, J., Marzluf, G., Schmidt, T., Snyder, L. (Eds.), Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition. American Society of Microbiology, pp. 330-393.
- Tomás, B.F., 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alimentación, Nutrición y Salud 10, 41-53.
- Trejo, H.L., Olson, Z.M.E., Bye, B.R.A., 2015. Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México. Revista mexicana de biodiversidad 86, 478-485.
- Trigiano, R.N., Gray, D.J., 2011. Plant tissue culture, development, and biotechnology. CRC Press, pp. 680.
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), 2013. Revisión del documento TGP/14: Sección 2: Términos Botánicos, Subsección 3: Color. Cuadragésima novena sesión, Ginebra.
- Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), 2008. Flor de Pascua, *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad. Ginebra, Suiza.
- Upadhyay, R., 2011. Plant latex: A natural source of pharmaceuticals and pesticides. International Journal of Green Pharmacy 5, 169-180.
- Vaingankar, J., Rodrigues, B., 2012. Screening for efficient AM (arbuscular mycorrhizal) fungal bioinoculants for two commercially important ornamental flowering plant species of Asteraceae. Biological Agriculture & Horticulture 28, 167-176.
- Vale, B.F.M., Seldin, L., Araujo, F.F., 2010. Benefits of plant growth-promoting rhizobacteria and rhizobia in agriculture, in: Maheshwari (Ed.), Plant growth and health promoting bacteria, Microbiology Monographs 18, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 201.
- Valero, A., 2012. Principios de color y holopintura. Editorial Club Universitario, España, 420 p.
- Varughese, G., Muthukrishnan, M., Chojnacki, T., 2001. The occurrence of polyprenols in Euphorbiaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 70, 39-41.
- Vázquez, J., García, F., Granada, L., Canul, K.J., Ramírez, S. y Osuna, F., 2012. Cueltlaxochitl-Nochebuena: su pasado, presente y futuro en el estado de Morelos. INIFAP. CIRPAS Campo Experimental Zacatepec. Publicación especial No. 53.
- Vega, C.P., Canchignia M.H., González, M., Seeger, M., 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. Cultivos Tropicales 37, 33-39.

- Vibrans, H., 2009. Malezas de México. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/euphorbiaceae/euphorbia-cyathophora/fichas/ficha.htm>.
- Victório, C.P., Henriques, A.B., Tavares, E.S., Esquibel, M.A., Lage, C.L.S., 2010. Standardized production of *Phyllanthus tenellus* Roxb. by plant tissue culture. *Revista Ciencia Agronómica* 41, 272-278.
- Villanueva, J., Quirós, L.M., Castañón, S., 2015. Purification and partial characterization of a ribosome-inactivating protein from the latex of *Euphorbia trigona* Miller with cytotoxic activity toward human cancer cell lines. *Phytomedicine* 22, 689-695.
- Villaseñor, J.L., 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la sociedad Botánica de México* 75, 105-135.
- Villaseñor, J.L., 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87, 559-902.
- Vimal, J.B., Das, S.S.M., 2015. Antifungal activity of *Euphorbia antiquorum* L. latex an *in vitro* study. *International Journal of Applied Research* 1, 25-28.
- Webster, G., 2014. Euphorbiaceae, in: K. Kubitzki (Ed.) Flowering plants. Eudicots. Springer, pp. 51-216.
- Weir, B., 2016. The current taxonomy of rhizobia. Disponible en: www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.
- Whistler, W.A., 1988. Ethnobotany of Tokelau: the plants, their Tokelau names, and their uses. *Economic Botany* 42, 155-176.
- Willems, A., 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287, 3-14.
- Xu, B., Zhang, J., Long, Y., 1990. A preliminary discussion on the laboratory. Germination of eight species seeds of wild flowers. *Journal of Seed Science* 6, 1-5.
- Yang, Y., Riina, R., Morawetz, J.J., Haevermans, T., Aubriot, X., Berry, P.E., 2012. Molecular phylogenetics and classification of *Euphorbia* subgenus *Chamaesyce* (Euphorbiaceae). *Taxon* 61, 764-789.
- Zamski, E., Schaffer, A.A., 1996. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships, Ed. Marcel Dekker Inc., USA, pp. 905.
- Zhang, M., Tang, S., Huang, X., Zhang, F., Pang, Y., Huang, Q., Yi, Q., 2014. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany* 107, 39-45.
- Zimmermann, N., Ritz, C.M., Hellwig, F., 2010. Further support for the phylogenetic relationships within *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae) from nrITS and trnL-trnF IGS sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 286, 39-58.
- Zulueta, R., Cordoba, M.V., Hernandez, M.L.G., Murillo, A.B., Rueda, P.E., Lara, L., 2014. Effect of *Pseudomonas putida* on growth and anthocyanin pigment in two poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) cultivars. *The Scientific World Journal*, Article ID 810192.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis químicos de los suelos del Ejido La Libertad, Sabino y Misión Unidos, Municipio de Victoria, Estado de Tamaulipas.

Sitios de muestreo	pH ¹	C.O. ² %	M.O. ³ %	N ⁴ %	C.I.C. ⁵ Cmol (+) kg ⁻¹	mg kg ⁻¹								
						Ca ⁶	Mg ⁶	Na ⁶	K ⁶	P ⁷	Fe ⁸	Cu ⁸	Zn ⁸	Mn ⁸
Pedrera	7.3	8.2	14.2	0.660	46.85	12.62	1.18	0.46	1.13	11.7	9	1.89	5	28
Troncones	7.6	4.3	7.5	0.340	16.90	8.76	1.58	0.39	0.54	23.7	14	0.93	2	15
Mariposas	7.4	11.9	20.6	0.488	31.68	18.73	3.14	0.31	0.98	35.7	8.5	0.23	10	25

C.O. = Carbono orgánico, M.O. = Materia orgánica, C.I.C. Capacidad de intercambio catiónico. Metodologías utilizadas: 1. Potenciométrico Relación Suelo-Agua 1:2, 2 y 3. Walkley and Black, 4. Arrastre de Vapor con MgO y Devarda Alloy, 5. Acetato de amonio 1.0N, pH 7.0 y titulación, 6. Acetato de amonio 1.0N, pH 7.0 y Absorción Atómica, 7. Olsen, 8. DTPA y Absorción Atómica.

Anexo 2. Análisis físicos de los suelos del Ejido La Libertad, Sabino y Misión Unidos, Municipio de Victoria, Estado de Tamaulipas.

Sitios de muestreo	Dap ¹ g cm ⁻³	Arenas ² Limo ² Arcilla ² %			Clase textural ²	Color en húmedo ³	Color en seco ³
		Arena ²	Limo ²	Arcilla ²			
Pedrera	0.94	3.4	59.7	37.0	Franco arcillo limoso	10YR 2/1 Pardo muy oscuro	7.5 YR 3/2 Pardo oscuro
Troncones	1.04	45.5	45.5	15.8	Franco	10YR 2/1 Negro	10YR 4/2 Pardo grisáceo oscuro
Mariposas	0.83	46.1	46.1	29.8	Franco arcilloso	10YR 2/1 Negro	10YR 3/2 Pardo grisáceo muy oscuro

Metodologías utilizadas: 1. Método del terrón, 2. Textura por el método de Bouyoucos, 3. Color determinado por la carta Munsell del color del suelo, el número acompañado de letras corresponde a matiz, el numerador a claridad y el denominador a pureza (Dominguez *et al.*, 2012).

Anexo 3. Características morfológicas de colonias de bacterias solubilizadoras de fosfatos aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio	Identificación	Forma	Color	Tamaño (cm)	Borde	Superficie	Aspecto	Elevación	Consistencia
Pedreras	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.1	Circular	Amarillo	0.3	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pantoea</i> sp. CPO 2.25	Circular	Blanca	0.3	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Mycobacterium</i> sp. CPO 2.26	Filamentosa	Salmón	0.2	Aserrada	Lisa	Seca	Convexa	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.28	Circular	Crema	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.2	Filamentosa	Amarillo claro	0.3	Lobulada	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Rhodococcus fascians</i> CPO 2.3	Circular	Salmón	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.4	Circular	Salmón claro	0.3	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanca
Troncones	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.5	Circular	Crema	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Pulvinada	Blanda
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.6	Circular	Amarillo claro	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.7	Circular	Crema	0.4	Ondulada	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pseudomonas putida</i> CPO 2.8	Circular	Amarillo claro	0.2	Ondulada	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.9	Circular	Transparente	0.2	Ondulada	Lisa	Húmeda	Plana	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.10	Circular	Crema	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Mucoide
	<i>Pseudomonas moraviensis</i> CPO 2.11	Circular	Crema	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Plana	Mucoide
<i>Curtobacterium</i> sp. CPO 2.29	Circular	Blanca	0.2	Ondulada	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda	
Mariposas	<i>Leclercia adecarboxylata</i> CPO 2.12	Circular	Amarillo claro	0.5	Ondulado	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.13	Circular	Crema	0.3	Ondulado	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.14	Circular	Amarillo claro	0.4	Entero	Rugosa	Húmeda	Pulvinada	Mucoide
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.15	Circular	Crema	0.5	Ondulado	Rugosa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.16	Circular	Amarillo claro	0.3	Ondulado	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.17	Circular	Blanco	0.5	Ondulado	Lisa	Húmeda	Plana	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.18	Circular	Amarillo claro	0.4	Ondulado	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.30	Circular	Transparente	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.19	Circular	Amarillo claro	0.5	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.20	Circular	Transparente	0.5	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.21	Circular	Amarillo	0.5	Entero	Lisa	Húmeda	Plana	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.22	Circular	Transparente	0.6	Entero	Lisa	Húmeda	Plana	Mucoide
	<i>Mycobacterium septicum</i> CPO 2.31	Circular	Amarillo	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.23	Circular	Blanco	0.4	Ondulado	Rugosa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.24	Circular	Crema	0.3	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda

Anexo 4. Características morfológicas de colonias de bacterias productoras de AIA aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio	Identificación	Forma	Color	Tamaño (cm)	Borde	Superficie	Aspecto	Elevación	Consistencia
Pedrera	<i>Enterobacter</i> sp. CPO 2.33	Circular	Blanco cremoso	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Bacillus endophyticus</i> CPO 2.34	Rizoide	Crema	0.5	Dentada	Lisa	Butirosa	Plana	Blanda
	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.35	Puntiforme	Blanca	0.1	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Staphylococcus</i> sp. CPO 2.36	Filamentosa	Crema	0.2	Arissada	Rugosa	Seca	Umbilicada	Dura
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.37	Circular	Crema	0.4	Entera	Lisa	Butirosa	Plana	Mucoide
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.38	Puntiforme	Amarillo fuerte	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.39	Puntiforme	Amarillo	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
Troncones	<i>Bacillus megaterium</i> CPO 2.40	Circular	Crema	0.5	Entero	Rugosa	Seca	Umbilicada	Blanda
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.41	Circular	Crema	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Bacillus simplex</i> CPO 2.42	Circular	Crema	0.4	Entero	Lisa	Butirosa	Umbilicada	Mucoide
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.43	Circular	Amarillo intenso	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.44	Puntiforme	Amarillo claro	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Bacillus</i> sp. CPO 2.45	Filamentosa	Blanca	0.2	Lobulada	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Arthrobacter oryzae</i> CPO 2.46	Puntiforme	Blanca	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.47	Fusiforme	Naranja	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Bosea</i> sp. CPO 2.48	Circular	Crema	0.1	Dentado	Rugosa	Húmeda	Pulvinada	Blanda
	<i>Staphylococcus sciuri</i> CPO 2.49	Circular	Crema	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
Mariposas	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.50	Circular	Salmón	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Acinetobacter</i> sp. CPO 2.51	Circular	Crema	0.4	Entera	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> CPO 2.52	Filamentosa	Crema	0.5	Ondulada	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.53	Circular	Crema	0.2	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Rhodococcus</i> sp. CPO 2.54	Puntiforme	Blanco	0.1	Entero	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Microbacterium oxydans</i> CPO 2.55	Circular	Amarillo fuerte	0.4	Entero	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.56	Circular	Crema	0.5	Entero	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide

Anexo 5. Características morfológicas de colonias de bacterias fijadoras de N aisladas de la rizosfera de *Euphorbia cyathophora*.

Sitio	Identificación	Forma	Color	Tamaño (cm)	Borde	Superficie	Aspecto	Elevación	Consistencia
Pedrera	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.57	Rizoide	Blanco	0.5	Dentada	Lisa	Húmeda	Pulvinada	Mucoide
	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.58	Puntiforme	Blanco	0.2	Filamentosa	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.60	Circular	Amarilla	0.3	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Mucoide
	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.62	Puntiforme	Crema	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.63	Fusiforme	Transparente	0.1	Entera	Lisa	Húmeda	Plana	Blanda
Troncones	<i>Arthrobacter</i> sp. CPO 2.64	Circular	Blanco	0.3	Entera	Lisa	Húmeda	Elevada	Mucoide
	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.65	Circular	Transparente	0.3	Entera	Lisa	Húmeda	Pulvinada	Blanda
	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.66	Circular	Transparente	0.4	Entera	Lisa	Húmeda	Pulvinada	Mucoide
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.67	Circular	Crema	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Pseudomonas putida</i> CPO 2.68	Puntiforme	Amarillo claro	0.1	Entera	Lisa	Húmeda	Elevada	Blanda
	<i>Shinella</i> sp. CPO 2.69	Puntiforme	Blanca	0.1	Entera	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
Mariposas	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.70	Circular	Blanco	0.3	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Rhizobium</i> sp. CPO 2.71	Circular	Blanco	0.4	Entera	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.72	Circular	Transparente	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Variovorax</i> sp. CPO 2.73	Rizoide	Transparente	0.4	Filamentosa	Rugosa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide
	<i>Microbacterium</i> sp. CPO 2.74	Circular	Transparente	0.1	Entera	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.75	Filamentosa	Transparente	0.1	Ondulada	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.76	Filamentosa	Transparente	0.2	Ondulada	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.78	Fusiforme	Blanca	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Gordonia terrae</i> CPO 2.79	Fusiforme	Blanco	0.4	Entera	Lisa	Húmeda	Elevada	Mucoide
	<i>Pseudomonas</i> sp. CPO 2.80	Circular	Transparente	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Convexa	Blanda
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> CPO 2.81	Circular	Transparente	0.2	Entera	Lisa	Húmeda	Umbilicada	Mucoide

Anexo 6. Análisis químico de sustrato utilizado para el desarrollo de *Euphorbia pulcherrima*.

pH ¹	C.O. ² %	M.O. ³ %	N ⁴ %	C.I.C. ⁵ Cmol (+) kg ⁻¹	Ca ⁶	Mg ⁶	Na ⁶	K ⁶	P ⁷	Fe ⁸	Cu ⁸	Zn ⁸	Mn ⁸
					mg kg ⁻¹								
5.20	19.03	30.82	0.735	37	13.35	33.65	1.06	4.52	132.78	180	3.8	12	176

C.O. = Carbono orgánico, M.O. = Materia orgánica, C.I.C. Capacidad de intercambio catiónico. Metodologías utilizadas: 1. Potenciométrico Relación Suelo-Agua 1:2, 2 y 3. Walkley and Black, 4. Arrastre de Vapor con MgO y Devarda Alloy, 5. Acetato de amonio 1.0N, pH 7.0 y titulación. 6. Acetato de amonio 1.0N, pH 7.0 y Absorción Atómica, 7. Olsen y 8. DTPA y Absorción Atómica

Anexo 7. Color del sustrato utilizado para el desarrollo de *Euphorbia pulcherrima*.

Color en húmedo ¹	Color en seco ¹
10YR 2/1 Negro	7.5 YR 3/2 Pardo oscuro

Metodologías utilizadas: 1. Color determinado por la carta Munsell, el número acompañado de letras corresponde a matiz, el numerador a claridad y el denominador a pureza (Domínguez *et al.*, 2012)

Anexo 8. Aspecto del tamaño y amplitud de plantas de *Euphorbia pulcherrima* sin inoculación bacteriana y con tres niveles de fertilización (0%, 50% y 100% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18), a los 236 días después del transplante.



0%

50%

100%



Anexo 9. Aspecto del tamaño y amplitud de plantas de *Euphorbia pulcherrima* inoculadas con *Bacillus megaterium* CPO 2.35 y con tres niveles de fertilización (0%, 50% y 100% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18), a los 236 días después del transplante.



Anexo 10. Aspecto del tamaño y amplitud de plantas de *Euphorbia pulcherrima* inoculadas con *Enterobacter* sp. CPO 2.5 y con tres niveles de fertilización (0%, 50% y 100% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18), a los 236 días después del transplante.



Anexo 11. Aspecto del tamaño y amplitud de plantas de *Euphorbia pulcherrima* inoculadas con *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 y con tres niveles de fertilización (0%, 50% y 100% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18), a los 236 días después del transplante.



Anexo 12. Aspecto del tamaño y amplitud de plantas de *Euphorbia pulcherrima* inoculadas con la mezcla de bacterias (*Bacillus megaterium* CPO 2.35, *Pseudomonas* sp. CPO 2.78 y *Enterobacter* sp. CPO 2.5) y con tres niveles de fertilización (0%, 50% y 100% de Ultrasol® Multipropósito 18-18-18), a los 236 días después del transplante.

