



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A. C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

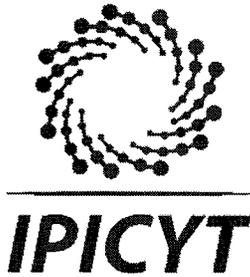
**Aislamiento, caracterización e identificación de  
bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en  
la germinación y crecimiento de *Arabidopsis  
thaliana* L.**

Tesis que presenta  
**Ángel de Jesús Estrada González**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias Ambientales**

**Codirectores de la Tesis:**  
**Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano**  
**Dr. Joel David Flores Rivas**

San Luis Potosí, S.L.P. Diciembre de 2017



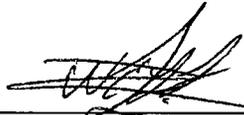
## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a Opuntia spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de Arabidopsis thaliana L.***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Ángel de Jesús Estrada González** y aprobada el catorce de diciembre del dos mil diecisiete por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



---

**Dr. Joel David Flores Rivas**  
Codirector de la tesis



---

**Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano**  
Codirectora de la tesis



---

**Dra. Laura Yáñez Espinosa**  
Miembro del Comité Tutorial



---

**Dr. Pablo Delgado Sánchez**  
Miembro del Comité Tutorial

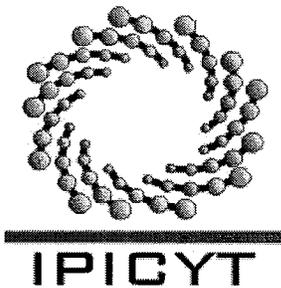


## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. bajo la Codirección de la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y el Dr. Joel David Flores Rivas.

Durante la realización de este trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-712516).

Este proyecto fue financiado por el proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica 254406.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 049 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de diciembre del año 2017, se reunió a las 12:15 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Laura Yáñez Espinosa</b>	<b>Presidenta</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Pablo Delgado Sánchez</b>	<b>Secretario</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Joel David Flores Rivas</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

sustentó el C.

**Ángel de Jesús Estrada González**

sobre la Tesis intitulada:

*Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a Opuntia spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de Arabidopsis thaliana L.*

que se desarrolló bajo la dirección de

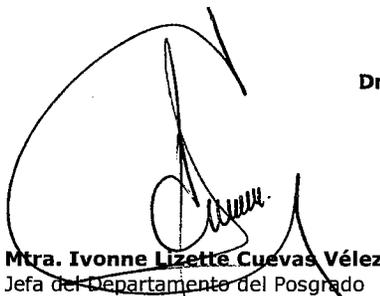
**Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano**  
**Dr. Joel David Flores Rivas**

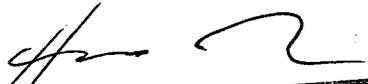
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 14:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de diciembre de 2017.

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

Quiero dedicar el presente trabajo de tesis a mi mamá Ofelia, que gracias a su dedicación, esfuerzo y sacrificio ha logrado sacar adelante a nuestra familia, y que a pesar de todas las adversidades siempre ha estado apoyándonos para que al día de hoy mis hermanos y yo seamos personas de bien y mejor preparadas. También quiero darle las gracias por todos sus consejos, su tiempo, pero sobre todo por su gran amor, siempre estaré en deuda con ella.

A mi hermano Aldo (dito) por todas sus risas, sus travesuras, sus ocurrencias, pero sobre todo por su gran cariño y amor, y por siempre contagiarme de su gran alegría. Dito sabes que te quiero mucho y siempre estaré contigo apoyándote y aconsejándote.

A toda mi familia que de alguna u otra manera me han brindado su apoyo, cariño y amor.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al pueblo de México por la beca otorgada (712516) para que yo pudiera realizar mis estudios de maestría.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por haberme dado la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias en sus aulas y laboratorios. Por los servicios brindados y su infraestructura de primer nivel puestos a nuestra disposición para el aprendizaje y preparación como profesionistas de excelencia.

A la Dra. Esmeralda López por todos sus consejos y apoyo para que yo pudiera realizar este trabajo de tesis. Por su paciencia, por el tiempo brindado, por estar siempre al pendiente del progreso del trabajo de laboratorio y escritura de tesis, pero sobre todo por demostrarme su pasión y amor a la investigación y en especial a los bichos (microorganismos).

Al Dr. Joel Flores por todo su apoyo y confianza. Por siempre estar al pendiente de cómo voy y por siempre otorgarme un poco de su tiempo para escucharme y aconsejarme a pesar de que siempre está muy ocupado. Por su apoyo incondicional para que yo pudiera realizar el presente trabajo de tesis, pero sobre todo por su invaluable amistad.

A la Dra. Laura Yáñez por su gran apoyo y consejos para la realización del presente trabajo, por todos los conocimientos que ha compartido conmigo, por el tiempo que me dedicó, por escucharme y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Pablo Delgado por su apoyo incondicional, tanto de conocimientos como de material, para que yo pudiera haber realizado el presente trabajo de tesis. Por el tiempo que me dedicó y los conocimientos que compartió conmigo para realizar este trabajo de investigación.

A los profesores de la División de Ciencias Ambientales que contribuyeron en mi formación académica y profesional, muchas gracias.

A los técnicos académicos Liz Cortés, Ale Colunga y Juan Pablo Rodas, por haberme facilitado el uso de los laboratorios y de material para que yo pudiera llevar a cabo este trabajo.

A mis profesores y amigos de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV) de la UASLP, al Dr. Juan Carlos Rodríguez, a la M.C. Ale Hernández, al Dr. Jorge Alcalá, al Dr. Hugo Ramírez y al Dr. José Marín, por todo el apoyo que me han

brindado, por sus conocimientos, consejos y el tiempo que han compartido conmigo en beneficio de mi formación académica y profesional.

Al Dr. José Luis Lara, a la Dra. Coco Hernández y al Dr. Heriberto Méndez por haberme dado la oportunidad de volver a pertenecer a la comunidad de la FAV pero ahora como profesor.

A mis amigas de años, que a pesar de no verlas con frecuencia les agradezco por todo el tiempo que han compartido conmigo y por los buenos momentos que hemos pasado: Ana Isabel Gutiérrez, Maritza Ortiz y Nelva Contreras. Así como a mis amigos de la uni: Eyra Hernández, Susy Serna, Rosita Vázquez, Edith Espitia y Gerado Castro, pero en especial a Fany Grizel Vázquez por todos los momentos que hemos pasado juntos y por todos los que nos faltan por vivir, por su gran apoyo, por sus consejos, pero sobre todo por su invaluable amistad.

A mis compañeros y amigos de la maestría: Ale Acosta, Andy Echeverría, Augusto Rodarte, Pancho Guerra, Hugo Serrato, Javier Labastida, Karen Galindo, Richard Méndez, pero en especial a Lupita Ruíz, Moni Ibarra y Beatriz (Bety) Gómez por los desvelos, por acompañarnos entre nosotros para estudiar, pero sobre todo por los buenos momentos que compartimos juntos, así como a Betsa Flores por siempre escucharme, por aconsejarme, pero sobre todo por su gran cariño e invaluable amistad.

Al equipo de trabajo, nuevamente a Andy y a Chris Díaz, pero en especial a mi amigo Neto Mascot y mi amiga Margarita por su todo su apoyo incondicional y por todos sus consejos.

# Contenido

Dedicatorias .....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de cuadros .....	x
Lista de figuras .....	xi
Resumen .....	xii
Abstract .....	xiii
Introducción.....	1
Hipótesis.....	8
Objetivo general .....	9
Objetivos específicos: .....	9
Materiales y métodos .....	10
1. Especie de estudio.....	10
2. Recolección de las muestras de la rizósfera de <i>Opuntia</i> spp.....	10
3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera.....	11
4. Semillas de <i>Opuntia</i> spp. ....	11
5. Aislamiento de bacterias endófitas de las semillas .....	12
6. Descripción morfológica de las colonias bacterianas.....	12
7. Selección de las cepas bacterianas .....	14
7.1 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA) de las cepas bacterianas .....	14
7.2 Producción de sideróforos .....	16
7.3 Prueba de hemólisis .....	18
8. Identificación de las bacterias mediante el gen 16s .....	19
8.1 Extracción de ADN.....	19
8.2 Amplificación del gen 16S rRNA.....	20
8.3 Purificación .....	22
8.4 Secuenciación .....	22
9. Efecto exógeno de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) en la germinación de las tres especies de <i>Opuntia</i> . ....	22

9.1 Preparación de las soluciones de AIA y GA <sub>3</sub> .....	22
9.2 Diseño experimental .....	23
9.3 Evaluación de la germinación .....	23
10. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de las bacterias en la promoción de la germinación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	24
10.1 Preparación de las cepas bacterias .....	24
10.2 Semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	24
10.3 Preparación del medio Murashige & Skoog (MS) .....	24
10.4 Diseño experimental .....	25
10.5 Evaluación de la germinación .....	25
10.6 Evaluación del crecimiento de las plántulas .....	25
11. Análisis estadísticos .....	26
Resultados .....	27
1. Aislamiento de cepas bacterianas de la rizósfera y endósfera de <i>Opuntia</i> spp. ....	27
2. Selección de las bacterias .....	28
2.1 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA) por las bacterias .....	28
2.2 Prueba de hemólisis .....	31
2.3 Producción de sideróforos .....	32
3. Identificación de las cepas bacterianas.....	33
4. Efecto exógeno de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA <sub>3</sub> ) en la germinación de <i>Opuntia</i> spp. ....	35
5. Efecto de las bacterias seleccionadas en la germinación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	37
Discusión.....	44
Conclusiones.....	56
Bibliografía .....	57
Anexo .....	72

## Lista de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos utilizados para romper la latencia de semillas de <i>Opuntia</i> spp.....	5
<b>Cuadro 2.</b> Características morfológicas utilizadas para la descripción de las colonias bacterianas.....	13
<b>Cuadro 3.</b> Diluciones de AIA para la curva de calibración.....	16
<b>Cuadro 4.</b> Concentración y volumen de reactivos utilizados para la PCR.....	21
<b>Cuadro 5.</b> Pasos de la PCR utilizados en el termociclador.....	21
<b>Cuadro 6.</b> Cantidad (g) de AIA y GA <sub>3</sub> utilizadas para preparar distintas concentraciones de las hormonas.....	23
<b>Cuadro 7.</b> Número de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de las tres especies de <i>Opuntia</i> .....	27
<b>Cuadro 8.</b> Número de cepas bacterianas aisladas de las semillas de las tres especies de <i>Opuntia</i> .....	27
<b>Cuadro 9.</b> Cuantificación de la producción de AIA por las cepas bacterianas mediante el método de Salkowski.....	28
<b>Cuadro 10.</b> Cepas bacterianas identificadas mediante la secuenciación del gen 16s rRNA y resultados de las pruebas de caracterización.....	33

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ilustración de las características morfológicas de colonias bacterianas utilizadas para su descripción.....	14
<b>Figura 2.</b> Prueba de hemólisis de las siete cepas bacterianas que presentaron mayor producción de AIA. Sólo las cepas MIN END OL 1-3 de MIN 1 y TSA END OL 1-3 de MIN 1 realizaron hemólisis del tipo Beta.....	32
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de las cepas bacterianas en el medio agar-CAS. La cepa RE END OS 1-5 ( <i>Burkholderia</i> sp.) dio positivo para la producción de sideróforos por el cambio de color del medio de azul a naranja.....	33
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de germinación de las semillas de las tres especies de <i>Opuntia</i> lavadas y no lavadas bajo diferentes concentraciones de GA <sub>3</sub> . Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 229.76, P< 0.0001).....	35
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de germinación de las semillas de las tres especies de <i>Opuntia</i> lavadas y no lavadas bajo diferentes concentraciones de AIA. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 66.27, P< 0.0001).....	36
<b>Figura 6.</b> Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en la germinación de <i>A. thaliana</i> L. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 11.40, P< 0.05).....	38
<b>Figura 7.</b> Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de raíz de <i>A. thaliana</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 14.88, P< 0.05).....	39
<b>Figura 8.</b> Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento del tallo de <i>A. thaliana</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 7.86, P< 0.05).....	40
<b>Figura 9.</b> Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> . Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos (F= 13.76, P< 0.05).....	41
<b>Figura 10.</b> Efecto de la inoculación de las bacterias en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> L. por compuestos solubles (en cajas Petri sin división).....	42
<b>Figura 11.</b> Efecto de la inoculación de las bacterias en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> L. por compuestos volátiles (en cajas Petri con división).....	43
<b>Figura 12.</b> Efecto de la promoción del crecimiento de <i>A. thaliana</i> por la combinación de <i>Variovorax</i> sp., <i>Endobacter/ Gluconacetobacter</i> sp. y <i>Kokuria</i> sp.....	53

## Resumen

Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias asociadas a *Opuntia* spp. y su efecto en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L.

Las interacciones microorganismo-planta son muy importantes para las plantas ya que algunas bacterias conocidas como promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) tienen la capacidad de promover su crecimiento a través de la fijación de N<sub>2</sub>, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas, compuestos orgánicos volátiles (COVs), por sideróforos, entre otros mecanismos, que pueden ocurrir tanto en la endósfera como en la rizósfera de la planta. Se ha encontrado que las PGPB son muy importantes para el establecimiento de algunas cactáceas en zonas áridas y semiáridas de México, sin embargo, aún son escasos este tipo de estudios para especies de esta familia, en específico para *Opuntia*. Por lo tanto, se plantearon dos objetivos: 1) aplicar ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) y ácido indolacético (AIA) a las semillas de *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* para probar si era posible romper su latencia fisiológica, además, se experimentó con semillas desinfectadas y no desinfectadas superficialmente para comprobar el efecto de la microbiota de la testa en su germinación; 2) aislar y caracterizar PGPB de la endósfera de semillas y rizósfera de las tres especies de *Opuntia* con capacidad para producir AIA, COVs y sideróforos, y probar su efecto en la germinación y el crecimiento de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* L. Las fitohormonas no promovieron la germinación de las tres especies de *Opuntia*, pero si se observó un efecto negativo de la desinfección de las semillas en su germinación, lo que sugiere que su microbiota juega un papel muy importante en la germinación de las mismas. Se aislaron 108 cepas bacterianas de la rizósfera y 14 cepas de la endósfera de las semillas, de las cuales se identificaron siete cepas como las mayores productoras de AIA (de entre 23 y 175 µg/ mL de cultivo O.D. 0.4<sub>560nm</sub>) pertenecientes a los géneros: *Micrococcus*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Variovorax*, *Endobacter* (*Gluconacetobacter*) y *Kocuria*, las cuales se inocularon junto con *A. thaliana* L. para evaluar su crecimiento. *Endobacter* (*Gluconacetobacter*) promovió 80% más el crecimiento de la longitud total de *A. thaliana* comparado con el testigo, posiblemente por el efecto de COVs, y *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) promovió 30% más el crecimiento de la longitud total de *A. thaliana*, posiblemente por el efecto del AIA, proponiéndose estas dos cepas como PGPB de *A. thaliana* y probablemente de *Opuntia* spp. En conclusión, se aislaron géneros bacterianos, anteriormente no reportados para cactáceas, con la capacidad de producir AIA, COVs y sideróforos, y se comprobó su efecto en la promoción del crecimiento de *A. thaliana* L.

**Palabras clave:** Nopal, PGPB, ácido indolacético, sideróforos, germinación, promoción de crecimiento vegetal.

## Abstract

Isolation, characterization and identification of bacteria associated with *Opuntia* spp. and its effect on the germination and growth of *Arabidopsis thaliana* L.

The microorganism-plant interactions are very important for plants, some bacteria known as plant growth promoters (PGPB) have the ability to promote their growth through the fixation of N<sub>2</sub>, the phosphorus solubilization, phytohormones, volatile organic compounds (VOCs) and siderophores production, among other mechanisms, which can occur both in the endosphere and in the rhizosphere of the plant. It has been found that PGPB are very important for the establishment of some cacti in arid and semiarid zones of Mexico, however, this type of studies is still scarce for species of this family, specifically for *Opuntia*. Therefore, two objectives were proposed: 1) apply gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and indoleacetic acid (IAA) to the seeds of *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* and *O. robusta* to test if it was possible to break their physiological latency, also, experimented with seeds disinfected and not disinfected superficially to check the effect of the microbiota of the seed coat on its germination; 2) isolate and characterize PGPB from the seed endosphere and rhizosphere of the three *Opuntia* species with the capacity to produce IAA, VOCs and siderophores, and test their effect on the germination and growth of the model plant *Arabidopsis thaliana* L. Phytohormones did not promote the germination of the three *Opuntia* species, but a negative effect of the disinfection of the seeds was observed in their germination, which suggests that their microbiota plays a very important role in their germination. We isolated 108 bacterial strains from the rhizosphere and 14 strains of the seed endosphere, of which seven strains were identified as the major producers of AIA (between 23 and 175 µg/ mL of culture OD 0.4<sub>560nm</sub>) belonging to the genera: *Micrococcus*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Variovorax*, *Endobacter* (*Gluconacetobacter*) and *Kocuria*, which were inoculated in *A. thaliana* L. to evaluate their growth. *Endobacter* (*Gluconacetobacter*) promoted 80% more total length growth of *A. thaliana* compared to the control, possibly due to the effect of VOCs, and *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) promoted 30% more the growth of the total length of *A. thaliana*, possibly due to the effect of AIA. These two strains are proposed as PGPB of *A. thaliana* and probably of *Opuntia* spp. In conclusion, bacterial genera, previously not reported for cacti, were isolated with the ability to produce AIA, VOCs and siderophores, and their effect on the growth promotion of *A. thaliana* L was tested.

**Key words:** Nopal, PGPB, indoleacetic acid, siderophores, germination, plant growth promoting.

## Introducción

El suelo es el principal soporte de los ecosistemas terrestres y posee una gran diversidad de microorganismos (bacterias, hongos, algas y protozoos) que establecen complejas interacciones entre ellos mismos y con las plantas para poder vivir (Dighton & Krumins, 2014; Vijaya *et al.*, 2016). Estas interacciones interespecíficas entre microorganismo-planta se pueden llevar acabo en diversas partes de la planta, ya sea la filósfera, la endósfera o rizósfera. La filósfera hace referencia a las partes aéreas de la planta; la endósfera al tejido interno de la planta, ya sea de la raíz, tallo, hojas, flores o semillas, donde los microorganismos que se encuentran colonizándolos son también conocidos como endófitos; y la rizósfera se define como cualquier volumen del suelo que se encuentra en asociación y bajo la influencia de las raíces de las plantas (Bhattacharyya & Jha, 2012). Se ha demostrado que las bacterias endófitas y de la rizósfera tienen la capacidad para promover el crecimiento de las plantas a través de múltiples mecanismos (Lacava & Azevedo, 2013), por lo que son conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés).

La rizósfera se considera una región o un microhábitat poblado por una gran cantidad de microorganismos, estimando más de 4,000 especies microbianas por cada gramo de suelo (Montesinos, 2003), muchas son capaces de inducir efectos positivos sobre el crecimiento y la salud de las plantas, por lo que habitualmente a éstas se le denominan como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) (Saleem *et al.*, 2007; Hayat *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2016). A su vez, las plantas, a través de sus raíces, segregan diferentes compuestos orgánicos como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y vitaminas que las poblaciones microbianas utilizan como recurso para vivir (Vijaya *et al.*, 2016).

El efecto promotor del crecimiento de las PGPR sobre las plantas está basado principalmente por la liberación de diversos metabolitos que estimulan directa o indirectamente el crecimiento y la salud de las plantas (Hayat *et al.*, 2010; Pii *et al.*, 2015). Dentro de la estimulación directa destaca la fijación de nitrógeno atmosférico (Sahin *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2015; Majeed *et al.*, 2015), la solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico y la adquisición de otros nutrientes (Puente *et al.*, 2004; Pii *et al.*, 2015), la producción de reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas) como ácido indolacético (AIA), citocininas y giberelinas (López *et al.*, 2011; Sokolova *et al.*, 2011), y por la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) (Ryu *et al.*, 2003). En el

caso de los mecanismos indirectos estos pueden ser mediante la producción de moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos, mediante la disposición del hierro de forma asimilable para la planta (Saha *et al.*, 2015), o a través del antagonismo o inhibición de microorganismos fitopatógenos, aunado a la producción de antibióticos y enzimas que degradan sus paredes celulares, proporcionándole cierta inmunidad o resistencia sistémica inducida a la planta (Naveen, 2013; Glick, 2015; Vijaya *et al.*, 2016). Además, los microorganismos le dan a la planta cierta resistencia a varios tipos de estrés abiótico como son el hídrico o salino (Yang, *et al.*, 2008; Marasco *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013; Goswami *et al.*, 2016; Rubin *et al.*, 2017). Por ejemplo, el incremento y la disponibilidad de elementos minerales esenciales como el nitrógeno, fósforo y hierro por la PGPB se puede ver reflejado en un incremento en la fotosíntesis de la planta y por lo tanto en su crecimiento (Nadeem *et al.*, 2009). La producción del AIA modifica la arquitectura de las raíces incrementando su densidad y longitud, así como la cantidad de pelos radiculares, lo que incrementa la capacidad de la planta para absorber agua y nutrientes, facilitando su supervivencia y crecimiento (Marulanda *et al.*, 2009; Vacheron *et al.*, 2013).

Por otro lado, las bacterias endófitas por lo general colonizan los espacios intercelulares de todos los órganos de las plantas (Ryan *et al.*, 2008), siendo los lugares más comunes de entrada a la planta las grietas y heridas que se forman en las raíces como resultado de su crecimiento (Sørensen & Sessitsch, 2015), los estomas (Roos & Hattingh, 1983), y las lenticelas presentes en raíces y tallos (Scott *et al.*, 1996). Las bacterias endófitas también pueden promover el crecimiento de las plantas y darle protección contra fitopatógenos (Ali *et al.*, 2012). La capacidad de los endófitos bacterianos para promover el crecimiento básicamente sería por los mismos mecanismos directos o indirectos que realizan las PGPR (Santoyo *et al.*, 2016). Además, se les han atribuido otros efectos benéficos como el ajuste osmótico y la regulación estomática permitiéndole a la planta hacer un uso más eficiente del agua (Compant *et al.*, 2010). Los endófitos bacterianos pueden tener una ventaja sobre las bacterias que habitan la rizósfera, ya que el vivir dentro de los tejidos de la planta representan una oportunidad para estar siempre en contacto con sus células y, por lo tanto, ejercer más fácilmente un efecto benéfico directo (Santoyo *et al.*, 2016), interactuando de manera más eficiente con la planta (Ali *et al.*, 2014). Otra ventaja de los endófitos bacterianos es que no están sujetos a las condiciones cambiantes del suelo (temperatura, pH, contenido de agua, etc.) que pueden influir en la promoción del crecimiento (Glick, 2012). Sin embargo, las bacterias endófitas sólo se han estudiado e identificado de ciertas plantas, principalmente de plantas usadas cultivos comerciales, por lo que la oportunidad de encontrar nuevas bacterias endófitas benéficas entre la gran

diversidad de plantas de diferentes ecosistemas es considerable (Ryan *et al.*, 2008).

Por lo anterior, es de gran relevancia estudiar este tipo de interacciones entre microorganismo-planta para entender y comprender mejor la estabilidad y productividad de los ecosistemas naturales, además de poder aplicar este conocimiento en diversas estrategias para incrementar la producción de alimentos de forma sustentable (Naveen, 2013; Dighton & Krumins, 2014).

En los últimos años ha crecido el interés por estudiar estas interacciones simbióticas entre microorganismos y plantas que viven en las regiones áridas y semiáridas. Es bien conocido que estas regiones se caracterizan principalmente por presentar baja disponibilidad de agua en el suelo para las plantas (Gibson & Nobel, 1986), fluctuaciones extremas de temperatura durante el día y la noche, alta radiación solar, suelos con bajo contenido de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, o suelos con grandes cantidades de sales (Cline, 2007; Collins *et al.*, 2008).

En Norteamérica, las principales plantas que habitan estas zonas pertenecen a las familias Cactaceae, Asparagaceae y a otras familias de plantas xerófitas (Granados-Sánchez *et al.*, 2012) que han desarrollado diversos mecanismos morfológicos, anatómicos y fisiológicos (Nobel, 2002; Márquez-Guzmán *et al.*, 2013) que les han permitido sobrevivir en estos ambientes inhóspitos (Gibson & Nobel, 1986; Nobel, 2010). Sin embargo, estudios recientes han indicado que las interacciones con microorganismos, principalmente con las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, también les pueden ayudar a sobrevivir en estos ambientes (Puente *et al.*, 2004; Bashan *et al.*, 2007).

La promoción del crecimiento vegetal por los microorganismos en cactáceas se ha reportado en *Opuntia cholla*, *Pachycereus pringlei*, *Stenocereus thurberi* (Puente *et al.*, 2004), *Mammillaria fraileana* (López *et al.*, 2011), *Mammillaria carnea*, *Opuntia pillifera* y *Stenocereus stellatus* (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). También se ha reportado que algunos microorganismos, principalmente hongos, pueden incrementar la germinación de algunas cactáceas que presentan latencia, principalmente fisiológica, por la producción de enzimas que degradan la testa (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010, 2011, 2013). Por lo que se sugiere que la asociación cactus-microorganismos es trascendental para la sobrevivencia y desarrollo de estas plantas en lugares áridos y semiáridos. Sin embargo, aún son escasos este tipo de estudios, para especies de la familia Cactaceae (Puente *et al.*, 2004; Aguirre-Garrido *et al.*, 2012; Delgado-Sánchez *et al.*, 2011, 2013).

Dentro de la familia Cactaceae, el género *Opuntia* tiene una gran distribución geográfica en las zonas áridas y semiáridas, y muchas de sus especies crecen en suelos degradados, mostrando gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales (Rzedowski, 2006; Peña *et al.*, 2008). Poseen gran importancia ecológica ya que muchas especies contribuyen a la estabilidad de los suelos evitando su erosión y proporcionan sitios de anidación y alimento para una gran variedad de insectos, aves, roedores y lagomorfos (Soberon *et al.*, 2001), además representan una gran importancia económica y social para México (Aguilar *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2009).

En general, las semillas del género *Opuntia* tienen bajos porcentajes de germinación (Mandujano *et al.*, 2007; Orozco-Segovia *et al.*, 2007; Baskin & Baskin, 2014). El proceso de germinación de las semillas involucra una activación del metabolismo del embrión, que inicia con la absorción de agua y rehidratación de sus tejidos, terminando con el alargamiento del eje embrionario o radícula, considerándose que la semilla ha germinado cuando su radícula ha atravesado la cubierta seminal o testa (Bewley & Black, 1994). Este proceso es una etapa crucial en el ciclo de vida de las plantas donde diversos factores, principalmente ambientales influyen en él, por ejemplo la disponibilidad de agua, la temperatura, la luz, la salinidad, el pH, entre otros. Sin embargo, la latencia que presentan algunas semillas, principalmente de especies desérticas, influye directamente en este proceso impidiéndole que germine (Baskin & Baskin, 2014). Una semilla que tiene latencia no tiene la capacidad para germinar en un período de tiempo específico aún si se encuentra viable y tiene todas las condiciones ambientales favorables para hacerlo (agua, temperatura, luz, etc.) (Baskin & Baskin, 2004). Por lo que se requiere de la aplicación de diversos métodos o tratamientos a las semillas para que logre germinar, éstos dependiendo del tipo de latencia que presente, que puede ser fisiológica, morfológica, morfo-fisiológica, física o una combinación de las anteriores (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Baskin & Baskin, 2013).

Se ha sugerido que las semillas de *Opuntia* spp. presentan latencia fisiológica, (Mandujano *et al.*, 2007; Orozco-Segovia *et al.*, 2007; Baskin & Baskin, 2013) ya que el embrión tiene un bajo potencial de crecimiento lo que impide la emergencia de la radícula, por lo que necesitan de un período de post-maduración para poder romper esta latencia (Orozco-Segovia *et al.*, 2007; Baskin & Baskin, 2013). También, algunos autores sugieren que presentan latencia física (Olvera-Carrillo, 2003), sin embargo, con la latencia física las semillas son impermeables al agua, y estudios han demostrado que se embeben sin necesidad de escarificación (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). En este caso, la latencia es del tipo

mecánica, en la cual aunque el embrión esté maduro y germine, la radícula no tiene la capacidad de romper la testa (Delgado-Sánchez *et al.*, 2011).

En estudios preliminares se han utilizado diversos tratamientos en *Opuntia* spp. para incrementar su porcentaje de germinación, donde el uso del GA<sub>3</sub> y la inoculación con microorganismos, principalmente hongos, han incrementado significativamente su germinación (Cuadro 1):

**Cuadro 1.** Tratamientos utilizados para romper la latencia de semillas de *Opuntia* spp.

Especie	Tratamiento	Germinación (%)		Autor
		Control	Tratamiento	
<i>O. discata</i>	Escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado durante 30 min a 20° C.	36%	83%	Potter <i>et al.</i> (1984).
<i>O. joconostle</i>	Escarificación mecánica + imbibición en GA <sub>3</sub> 40 ppm durante 30 min.	1%	80%	Sánchez-Venegas (1997).
<i>O. leucotricha</i>	Uso de <i>Trichoderma harzianum</i> .	0%	40%	Delgado-Sánchez <i>et al.</i> (2010).
<i>O. leucotricha</i>	Luz + <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Phoma medicaginis</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> .	<5%	40%	Delgado-Sánchez <i>et al.</i> (2013).
<i>O. lindheimeri</i>	Escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado durante 30 min a 30° C	2%	34%	Potter <i>et al.</i> (1984).
<i>O. microdasys</i>	Agar 1% + GA <sub>3</sub> 500 ppm.	5%	35%	Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> (2011).
<i>O. rastrera</i>	Agar 1% + GA <sub>3</sub> 1000 ppm.	5%	40%	Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> (2011).
<i>O. rastrera</i>	Agar 1% + GA <sub>3</sub> 1000 ppm	25%	40%	Rojas-Aréchiga <i>et al.</i> (2011).
<i>O. robusta</i>	Luz + <i>Trichoderma koningii</i> .	>5%	70%	Delgado-Sánchez <i>et al.</i> (2013).
<i>O. streptacantha</i>	Uso de <i>Phoma</i> spp.	1%	68%	Delgado-Sánchez <i>et al.</i> (2010).
<i>O. streptacantha</i>	Luz + <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Phoma medicaginis</i> , <i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> .	>10%	<70%	Delgado-Sánchez <i>et al.</i> (2013).
<i>O. streptacantha</i>	Reducción de la testa con un corta uñas.	51%	63%	Romo-Campos <i>et al.</i> (2010).
<i>O. tomentosa</i>	Escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> durante 90 min.	20%	60%	Olvera-Carrillo <i>et al.</i> (2003).

<i>O. tomentosa</i>	Escarificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> durante 90 min + imbibición en GA <sub>3</sub> 2 mg/ml a 24° C.	4%	≈50 %	Olvera-Carrillo <i>et al.</i> (2003).
<i>Opuntia spp.</i>	Medio MS 25%+ GA <sub>3</sub> 25 ppm	33%	85%	Ochoa <i>et al.</i> (2015).

Se ha reportado que las giberelinas son capaces de romper la latencia fisiológica (Gubler *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009) mediante la estimulación de la síntesis de hidrolasas, especialmente  $\alpha$ -amilasas, que se encargan de degradar el almidón presente en el endospermo para formar azúcares simples que el embrión utiliza para su expansión y crecimiento celular y por ende para la germinación (Baskin & Baskin, 2004; Yamaguchi, 2008; Miransari & Smith, 2014). También, la latencia fisiológica de algunas plantas depende de la relación entre los niveles del ácido abscísico (ABA, hormona inhibidora del crecimiento) y del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>, promotora del crecimiento), donde a una mayor concentración del GA<sub>3</sub> disminuyen las concentraciones del ABA y, por lo tanto, se promueve la germinación (Baskin & Baskin, 2004; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011). Las auxinas, principalmente el AIA, por sí solas no son necesarias para la germinación, sin embargo, están presentes en la punta de la radícula de las semillas después de la germinación. Este proceso también es necesario para las etapas relacionadas con el crecimiento del embrión después de la emergencia (Miransari & Smith, 2014), además, su interacción con giberelinas puede influir directamente en la germinación (Fu & Harberd, 2003). Algunos estudios reportan el incremento de la germinación de *Zea mays* por la producción de AIA de PGPR como *Streptomyces* sp. (Aldesuquy *et al.*, 1998; Tokala *et al.*, 2002; El-Tarabily, 2008).

Por otro lado, en las zonas áridas y semiáridas está muy bien documentado que el nitrógeno y el fósforo son los principales nutrientes que por lo general se encuentran deficientes o de forma no disponible para la planta, donde las PGPRs juegan un papel muy importante en su disposición (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012). Sin embargo, el hierro (Fe) por lo general también está limitado y se le ha dado menor atención estudiar su disposición, a pesar de la importancia que tiene para los microorganismos y para la planta como un micronutriente esencial debido a que participa en múltiples procesos de su metabolismo (Colombo *et al.*, 2014). Por ejemplo, en las plantas forma parte de los grupos catalíticos de muchas enzimas redox del tipo hemoproteínas, como en los citocromos que son indispensables para el transporte de electrones durante la fotosíntesis (Azcón-Bieto & Talón, 2008). Bajo condiciones aerobias y valores de pH superiores a 7 se ha estimado que la concentración de Fe es de alrededor de 10<sup>-10</sup> M, es decir, de entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> M más bajo que la concentración que requieren las plantas para su óptimo crecimiento (Saha *et al.*, 2015). Por lo tanto, la deficiencia de Fe es un problema

frecuente para muchas plantas, particularmente en suelos calcáreos (Mengel *et al.*, 2001), suelos característicos de muchas zonas áridas y semiáridas. Dado que la geoquímica del Fe está estrictamente relacionada con los procesos físico-químicos y biológicos que ocurren en el suelo (Carrillo-González *et al.*, 2006), los factores que influyen en estos procesos podrían afectar significativamente la presencia relativa de las diferentes formas de Fe y, a su vez, la disponibilidad del micronutriente para los microorganismos y las plantas. El Fe fundamentalmente se encuentra en forma de  $\text{Fe}^{+3}$  formando parte de sales e hidróxidos de muy baja solubilidad, éstos pueden ser específicamente disueltos por bacterias a través de su solubilización (quelación), por ejemplo, por acción de *Thiobacillium* sp. y *Metallogenium* sp. El medio principal por el cual los microorganismos del suelo adquieren el Fe se basa en la síntesis y liberación de sideróforos en respuesta a la deficiencia del mismo Fe. Éstos forman complejos con el hierro que son transportados a las células microbianas a través de transportadores específicos de membrana Fe-sideróforos (Neilands, 1981), y que a su vez pueden ser transportados de la solución del suelo hasta las raíces (Raaijmakers *et al.* 1995). Estos complejos presentan una alta estabilidad incluso mayores a los quelatos sintéticos de Fe utilizados en suelos agrícolas con deficiencia de este micronutriente (Lucena, 2000). También, el secuestro de Fe por parte de las bacterias puede inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Saha *et al.*, 2015). Por lo tanto, también sería de gran relevancia identificar PGPRs asociadas a *Opuntia* spp. que pudieran estar produciendo sideróforos, permitiéndole a la planta adquirir hierro, pudiendo ser otra estrategia para sobrevivir en las zonas áridas y semiáridas.

Así, es de gran relevancia conocer si los microorganismos promotores del crecimiento vegetal incrementa la capacidad de *Opuntia* spp. para establecerse en las zonas áridas y semiáridas, a través de la promoción de la germinación de sus semillas (rompiendo su latencia) y del crecimiento mediante la producción de fitohormonas, COVs y sideróforos. Entender los procesos que mejoran la capacidad de adaptación de las cactáceas, principalmente *Opuntia* spp., puede ser de gran utilidad para su conservación y para desarrollar aplicaciones biotecnológicas en su producción agrícola.

## Hipótesis

*Opuntia* spp. establece interacciones interespecíficas positivas con bacterias endófitas de semillas y rizosféricas, dicho efecto puede verse reflejado en otras especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* L., utilizada como planta modelo, incrementando la germinación de sus semillas y promoviendo su crecimiento a través de la producción de fitohormonas (principalmente ácido indolacético), compuestos orgánicos volátiles y sideróforos.

## Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de la rizósfera y endósfera de semillas de *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* con la capacidad para producir ácido indolacético (AIA), compuestos orgánicos volátiles (COVs) y sideróforos, y probar su efecto en la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L utilizada como planta modelo.

## Objetivos específicos:

- ✓ Evaluar el efecto de la aplicación exógena de distintas concentraciones de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en la germinación de *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta*.
- ✓ Aislar bacterias promotoras del crecimiento vegetal de semillas y de rizósfera de *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta*, y caracterizarlas a través de la producción de AIA, compuestos volátiles y sideróforos.
- ✓ Identificar taxonómicamente las bacterias con mayor producción de AIA, compuestos volátiles y sideróforos mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.
- ✓ Evaluar el potencial de las bacterias para promover la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L. como planta modelo bajo condiciones de laboratorio.

# Materiales y métodos

## 1. Especie de estudio

Se aislaron bacterias de la rizósfera y endófitas de semillas de tres especies de *Opuntia* que a continuación se describe su distribución y usos:

- *Opuntia leucotricha* DC.: crece en diferentes condiciones ambientales y se distribuye principalmente en la zona centro de San Luis Potosí y Zacatecas, pero también en Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro y Tamaulipas. Se utiliza tanto como alimento (principalmente la tuna), forraje, medicina, así como cerca viva y ornamental (Bravo-Hollis, 1978).
- *Opuntia robusta* H.L.Wendl. ex Pfeiff.: crece de forma silvestre en el Distrito Federal y sur de Hidalgo, extendiéndose hasta San Luis Potosí, Zacatecas y Durango (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991). Se utiliza principalmente como alimento (cladodios y frutas), forraje, medicinal, como cerca viva (Bravo-Hollis, 1978) y en restauración de suelos debido a su hábito semi-rastrero que ayuda a que se acumule el suelo (Guzmán *et al.*, 2003).
- *Opuntia streptacantha* Lem.: es un nopal silvestre que se distribuye en Aguascalientes, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Guzmán *et al.*, 2003). Se utiliza principalmente como alimento (cladodios y frutas), forraje, medicinal, como cerca viva y artesanal (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991).

La tres especies representan en las zonas áridas y semiáridas de México un recurso de gran valor económico, principalmente para las personas de comunidades rurales (Bravo-Hollis, 1978).

## 2. Recolección de las muestras de la rizósfera de *Opuntia* spp.

El muestreo se realizó durante la temporada de lluvias en un sitio cercano a la cabecera municipal de Mexquitic de Carmona, S.L.P. (Coordenadas aproximadas: 22°16'2'' N y 101°06'42'' W). El sitio pertenece a la zona semiárida del Altiplano Potosino al sur del Desierto Chihuahuense, y en éste se encuentran poblaciones silvestres de las tres especies de *Opuntia*.

Se recolectaron muestras por triplicado de la rizósfera de tres plantas de una especie de *Opuntia* con una pala previamente desinfectada con etanol y se colocaron en tubos falcón de 15 mL, se conservaron en hielo hasta su

almacenamiento en un refrigerador a 4°C para ser procesadas en el laboratorio en un tiempo no mayor a 24 h. Lo anterior se realizó para cada especie de *Opuntia*.

### **3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera**

En el laboratorio, las tres muestras de cada planta se mezclaron para formar una sola muestra y se tamizaron para homogeneizarlas y eliminar restos vegetales y conglomerados del suelo que pudieran interferir o dificultar el aislamiento de las bacterias. Lo anterior se realizó para todas las muestras de las tres plantas de cada especie.

Se tomó 1 g de una muestra de la rizósfera y se diluyó en 99 mL de buffer de fosfatos estéril y se agitó vigorosamente en vortex por 1 min. De esta solución se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de buffer de fosfatos estéril (1ª dilución). Lo anterior se realizó sucesivamente cinco veces más hasta llegar a una dilución de  $10^{-6}$  (diluciones seriadas). Se inocularon tres cajas Petri que tenían medio Tripteína soya agar (TSA), tres cajas de medio Rennie y tres cajas de medio Mineral con una alícuota de 1 mL de la última dilución cada una, se identificaron y se sellaron con parafilm. Lo anterior se realizó para las muestras de las tres especies de *Opuntia*. Las cajas Petri se incubaron en cuarto oscuro a 28° C durante siete días y se observó el crecimiento microbiano. Todas las colonias bacterianas que crecieron en las cajas Petri se aislaron haciéndolas crecer nuevamente en el mismo medio en una nueva caja Petri, manteniendo cada colonia bacteriana como cultivo puro.

### **4. Semillas de *Opuntia* spp.**

Las semillas de las tres especies de *Opuntia* fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las semillas de *O. streptacantha* Lem. se recolectaron en el año 2007 y las semillas de *O. leucotricha* DC. y *O. brobusta* H.L.Wendl. ex Pfeiff. se recolectaron en el año 2008. A 100 semillas de cada especie se les realizó una estimación rápida de viabilidad mediante la técnica de tetrazolio al 0.5%.

La técnica de tetrazolio consiste en embeber las semillas en una solución incolora de la sal cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio. En las células vivas de los tejidos de las semillas se lleva a cabo una reacción química de óxido-reducción en la que participan las enzimas deshidrogenasas, los protones de hidrógeno liberados en el proceso de respiración reducen a la sal de tetrazolio a formazán. El formazán es una sustancia estable de color rojizo que permite distinguir las zonas vivas de las

semillas (de color rojo o rosado) de las zonas muertas (de color blanco), por lo que el color rojo del embrión de las semillas una vez embebidas es un indicativo de su viabilidad (ISTA, 2005).

## **5. Aislamiento de bacterias endófitas de las semillas**

Las semillas de cada especie de *Opuntia* se lavaron y se desinfectaron para realizar el aislamiento de bacterias como se menciona a continuación (modificado de Puente *et al.*, 2004):

1. 3 g de semillas se colocaron en un tubo Falcón de 50 mL.
2. Se lavaron con Tween 20 al 2% durante 10 min.
3. Se enjuagaron 10 veces con agua destilada.
4. Se lavaron con etanol al 96% por un minuto.
5. Se lavaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 min.
6. Se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril.
7. Se enjuagaron 5 veces con tiosulfato de sodio al 2%.
8. Se enjuagaron 10 veces con agua destilada estéril.

Para corroborar la esterilidad de las semillas se inocularon cajas de medio TSA con el agua del último lavado de las semillas y se llevaron a incubar a un cuarto oscuro a 28° C por siete días para observar que no hubiera crecimiento bacteriano.

Una vez desinfectadas, las semillas se trituraron con un mortero estéril y se colocaron en 30 mL de buffer de fosfatos estéril y se mezcló por pipeteo. Se tomó una alícuota de 1 mL y se colocó en un tubo de ensayo previamente llenado con 9 mL de buffer de fosfatos. Se inocularon tres cajas Petri que tenían medio TSA, tres cajas de medio Rennie y tres cajas de medio Mineral con una alícuota de 1 mL de la dilución cada una, se identificaron y se sellaron con parafilm. Las cajas se incubaron en un cuarto oscuro a 28° C durante siete días y se observó el crecimiento microbiano. Las bacterias que crecieron en el medio TSA, Rennie y Mineral se aislaron haciéndolas crecer nuevamente en el mismo medio, manteniéndolas como cultivos puros. Cada colonia se describió morfológicamente.

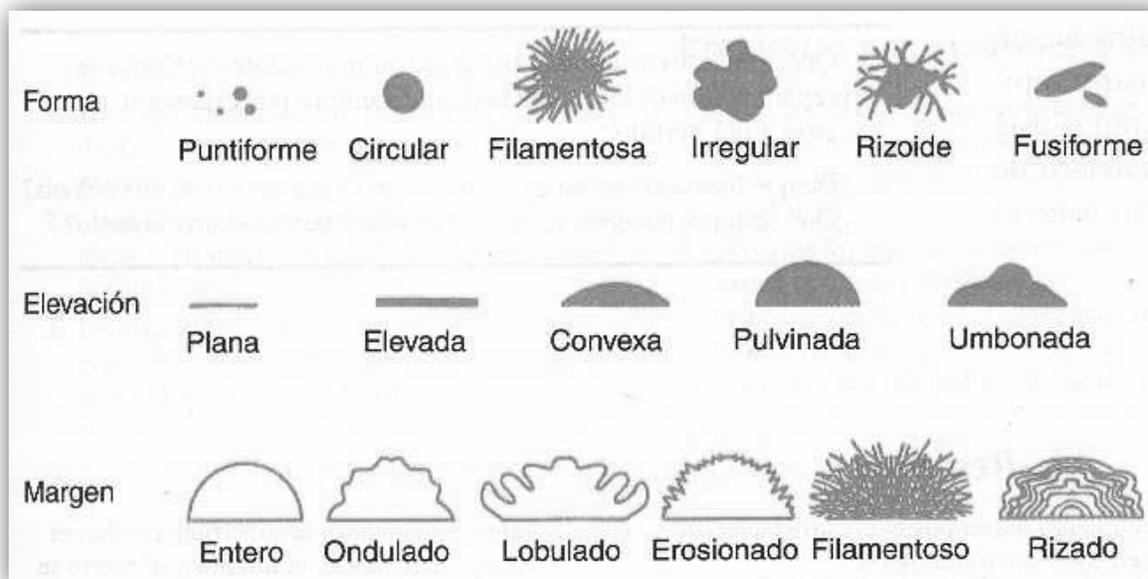
## **6. Descripción morfológica de las colonias bacterianas**

Se describieron características macroscópicas de todas las colonias bacterianas aisladas para su identificación preliminar a través de su examen visual y se descartaron aquellas que fueran muy parecidas o iguales. Se clasificaron de

acuerdo a las características mostradas en el Cuadro 2. Algunas de estas características se ilustran en la Figura 1 (Barragán *et al.*, 2010).

**Cuadro 2.** Características morfológicas utilizadas para la descripción de las colonias bacterianas.

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
<b>Tamaño</b>	Diámetro (mm)
<b>Forma</b>	Puntiforme
	Circular
	Irregular
<b>Elevación</b>	Filamentosa
	Plana
	Elevada
	Convexa baja
	Abovedada
	Umbonada
	Papilada convexa
<b>Borde</b>	Crateriforme
	Entero
	Estriado
	Ondulado
	Dentado
	Lobulado
<b>Color</b>	Rizoide
	Blanco, amarillo, negro, naranja, etc.
<b>Superficie</b>	Brillante
	Mate
<b>Densidad</b>	Opaca
	Translúcida
	Transparente
<b>Consistencia</b>	Cremosa
	Viscosa
	Membranosa
	Quebradiza
	Rugosa



**Figura 1.** Ilustración de las características morfológicas de colonias bacterianas utilizadas para su descripción (Barragán *et al.*, 2010).

## 7. Selección de las cepas bacterianas

A todas las cepas bacterianas con distinta morfología se les realizó una prueba para identificar la producción de la auxina AIA. Aquellas que produjeron mayor concentración de AIA, y a todas las bacterias endófitas aisladas de las semillas, se les realizó la técnica para identificar la producción de sideróforos. A las 7 cepas bacterianas que produjeron la mayor concentración de AIA se les realizó una prueba de hemólisis. Las técnicas empleadas serán descritas a continuación:

### 7.1 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA) de las cepas bacterianas

Para la determinación de la producción de AIA por las cepas bacterianas se siguió el siguiente protocolo basado en la prueba de Salkowski (Salkowski, 1985):

#### 7.1.1 Preparación del reactivo Salkowski

Se prepararon 100 mL del reactivo Salkowski utilizando:

- 2 mL de  $\text{FeCl}_3$  a una concentración 0.5 M.
- 49 mL de ácido perclórico al 70%.
- 49 mL de agua destilada.

### **7.1.2 Preparación del medio de cultivo YEM adicionado con triptófano**

Se preparó medio de cultivo líquido YEM (Yeast extract - Manitol) adicionado con triptofano utilizando los siguientes reactivos:

- Extracto de levadura.....0.70 g
- Manitol (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>).....7.00 g
- Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).....0.35 g
- Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>).....0.14 g
- Cloruro de sodio (NaCl).....0.07 g
- Triptofano.....1% (0.7 g)
- Agua destilada.....700 mL

Se esterilizó en autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb de presión.

### **7.1.3 Incubación de las bacterias**

En tubos falcón de 15 mL se colocaron 5 mL del medio YEM estéril. Con palillos de mesa estériles se tomó una muestra de una cepa bacteriana y se introdujo en un tubo de ensaye, éste se etiquetó de acuerdo a la identificación de la caja de Petri y se incubó en un cuarto oscuro a 28° C en agitación durante 6 días.

### **7.1.4 Ajuste de la densidad óptica celular de las bacterias**

A los seis días de incubación se midió la absorbancia (ABS) del cultivo bacteriano con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.

Se tomaron 2 mL del medio donde se hizo crecer la cepa bacteriana y se colocaron en una celda de cuarzo. Se midió su ABS a una longitud de onda de 560 nm y si la ABS fue superior a 0.400 ABS se diluyó con medio YEM hasta alcanzar un valor igual o aproximado a 0.400 ABS. Una vez alcanzada la ABS deseada se conservó la alícuota en un tubo eppendorf.

### **7.1.5 Preparación de la curva de calibración de AIA**

Se realizaron diluciones de AIA utilizando la hormona comercial (3-indoleacetic acid 98%, SIGMA-ALDRICH) mezclándola en medio YEM para conseguir soluciones con concentraciones de 5, 10, 15, 20, 40 y 100 ppm y el blanco (0 ppm) fue medio YEM sin AIA adicionado.

Para realizar las diluciones se partió de una solución “stock” a 100 ppm que se realizó mezclando 1.5 mg de AIA en 15 mL de acetona (el AIA no es soluble en agua por eso se disuelve en acetona). A partir de la solución “stock”, en tubos falcón de 15 mL se realizaron las siguientes mezclas para obtener las soluciones a las concentraciones deseadas (Cuadro 3):

**Cuadro 3.** Diluciones de AIA para la curva de calibración.

<b>Concentración inicial de la solución (ppm)</b>	<b>Cantidad de la solución inicial (mL)</b>	<b>Cantidad del medio YEM (mL)</b>	<b>Concentración final (ppm)</b>
100 (stock)	5	5	50
100 (stock)	4	6	40
100 (stock)	1	9	10
50	1	9	5
50	3	7	15
40	5	5	20
Blanco	0	5	0

#### ***7.1.6 Incubación de las reacciones y lectura de absorbancia***

Para leer la absorbancia de los cultivos se utilizó un espectrofotómetro para microplacas Epoch con capacidad de 300  $\mu$ L por pozo. Se realizaron tres repeticiones por cultivo. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

1. De los cultivos ajustados previamente a la densidad óptica de 0.400 ABS se tomaron 1.5 mL y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, luego se centrifugaron a 13000 x g (10774 rpm) durante 5 minutos.
2. En los primeros siete pozos se colocaron 100  $\mu$ L de las diluciones de AIA (curva de calibración) comenzando por el blanco o concentración cero y terminando con la concentración más alta, en los siguientes pozos se colocaron 100  $\mu$ L del sobrenadante de los cultivos centrifugados.
3. Se agregaron 200  $\mu$ L del reactivo Salkowski a cada muestra y se mezclaron muy bien con una pipeta multicanal.
4. Se dejó incubar durante 30 min en condiciones de oscuridad (las placas se cubrieron completamente con dos capas papel aluminio).
5. Se leyó la absorbancia de la muestras en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTeK Instruments Inc.) a una longitud de onda de 530 nm.

## **7.2 Producción de sideróforos**

Para evaluar la producción de sideróforos por las bacterias se utilizó la técnica del cromo azurol sulfonato (CAS, Schwyn & Neilands, 1987) que a continuación se describe:

#### ***7.2.1 Preparación del medio NFb líquido para el crecimiento de las cepas***

Las bacterias se hicieron crecer en medio líquido NFb (Nitrogen free broth) que se encuentra compuesto de los siguientes reactivos:

- Ácido málico.....3.7 g
- $K_2HPO_4$  al 10%.....5 mL
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al 10%.....2 mL
- NaCl al 10%.....1 mL
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  al 1%.....2 mL
- Solución de micronutrientes.....2 mL
- Agua destilada.....1000 mL
- Se adiciona con  $NH_4NO_3$ .....1 g/L

Se ajustó el pH a 6.8 con perlas de KOH.

La solución de micronutrientes utilizada está compuesta por:

- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ .....0.200 g
- $MnSO_4 \cdot H_2O$ .....0.235 g
- $H_3BO_3$ .....0.280 g
- $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ .....0.008 g
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .....0.024 g
- $H_2O$ .....200 mL

El medio líquido NFb se esterilizó en la autoclave por 15 minutos a 120° C y 15 lb.

Se sembró una porción de una colonia aislada en 3 mL de medio NFb líquido. Se incubó durante 48 h en agitación en un cuarto oscuro a 28° C. Se tomó una alícuota de 2 mL y se ajustó la DO con el mismo medio estéril a una ABS de 0.2 a 560 nm.

### **7.2.2 Preparación del colorante CAS 10x (50 mL)**

**Solución A:** se pesaron 0.03025 g del colorante CAS y se disolvieron en 25 mL de agua destilada pH 7 (la solución adquiere un color rojizo). Se agregaron 50  $\mu$ L de KOH al 10% (p/ v) (se adquiere un color verde azulado) y después 5 mL de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  1 mM (cambia la solución a color rojizo). Se agregaron 50  $\mu$ L de KOH al 10% (p/ v) y se adquirió nuevamente un color azulado.

**Solución B:** se pesaron 0.03645 g de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) y se disolvieron en 20 mL de agua destilada pH 7. La mezcla se agitó durante varios minutos hasta que no quedaron sólidos sin disolver.

Se agregó lentamente la solución A a la solución B (que adquirió nuevamente un color rojizo) y se agitó nuevamente. Se agregaron 3 mL de KOH 10% (p/v), la mezcla adquirió un color verde azulado. Se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

### **7.2.3 Preparación del medio de cultivo (medio + PIPES)**

Se utilizó 120 mL del medio de cultivo NFb líquido y se le agregaron 4.575g de PIPES (ácido piperazín-N, N'-bis (2-etanosulfónico)) (pH 7). El PIPES baja el pH del medio a un valor de aproximadamente 3, a este pH el PIPES no se disuelve por lo que se llevó nuevamente el pH a 6.8 con KOH para que el PIPES se disolviera.

La mezcla se llevó a un volumen final de 135 mL con el mismo medio NFb y se agregaron 2.3 g de agar. La mezcla resultante se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

### **7.2.4 Preparación del Agar-CAS**

Una vez esterilizado el medio + PIPES se dejó enfriar un poco y se agregaron 15 mL del colorante CAS 10X (estéril), la mezcla se agitó y se vació en cajas Petri libres de Fe<sup>+3</sup>.

### **7.2.5 Inoculación y determinación de sideróforos**

Una caja Petri que contiene agar-CAS se inoculó con 10 µL de la suspensión bacteriana ajustada a una ABS de 0.2. Lo anterior se realizó por triplicado para cada cepa a ensayar. Una vez inoculadas, las cajas Petri se dejaron en la campana de flujo laminar hasta que se secura la suspensión bacteriana y se incubaron en un cuarto oscuro a 28°C durante 7 días.

La producción de sideróforos se observó por el cambio de color del agar CAS del verde azulado del medio a naranja, lo que produce la formación de un halo claro alrededor de cada una de las colonias.

## **7.3 Prueba de hemólisis**

Esta técnica se utiliza para identificar de forma rápida y sencilla microorganismos con posible potencial de ser patógenos del hombre. Cuando se inocula agar-sangre con un microorganismo patógeno es posible observar la reacción de hemólisis, en la que se destruyen los eritrocitos presentes en la sangre del medio de cultivo mediante la producción de toxinas. Se han observado tres tipos de hemólisis:

- Alfa: es una hemólisis parcial y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo color verdoso.
- Beta: es una hemólisis total y la zona de crecimiento aparece rodeada de un halo totalmente transparente.
- Gama: no hay una hemólisis producida por el microorganismo y por lo tanto no hay halo alrededor de la zona de crecimiento.

### **7.3.1 Agar-sangre**

Para la preparación del Agar-Sangre se utilizó como base el medio TSA (agar rico en nutrientes) al cual se le añadieron 5% de sangre desfibrinada (Nakano *et al.*, 1988). A continuación se describe la técnica de preparación del medio:

#### **7.3.1.1 Preparación de la sangre desfibrinada:**

1. Se obtuvieron asépticamente 20 mL de sangre humana (aunque preferiblemente puede ser de conejo o carnero) y se vertieron en un matraz estéril que contenía perlas de vidrio estériles.
2. Se agitó moderadamente por 10 min para romper la fibrina formada durante la coagulación (desfibrinación).
3. Se mantuvo en refrigeración hasta el momento de usarla (aproximadamente 10 min).

#### **7.3.1.2 Preparación del medio TSA**

Se preparó medio TSA para ser utilizado como base:

- Tripteína.....6 g
- Peptona de soya.....2 g
- Cloruro de sodio.....2 g
- Agar.....6 g
- Agua.....400 mL

Se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

#### **7.3.1.3 Preparación del Agar-Sangre:**

Al agar TSA, una vez esterilizado y enfriado a 45-50° C, se le añadió 5% de sangre desfibrinada, se mezcló bien y se vació en cajas Petri. En este medio se inocularon las cepas bacterianas que produjeron la mayor concentración de AIA, cada una se inoculó por triplicado.

## **8. Identificación de las bacterias mediante el gen 16s**

Las bacterias con mayor producción de AIA y sideróforos fueron identificadas mediante la amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA. A continuación se describe la metodología:

### **8.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó para las siete cepas bacterianas que produjeron la mayor concentración de AIA y para las 14 bacterias endófitas.

La extracción se realizó con el kit comercial “Quick-DNA Fungal/ Bacterial Miniprep kit” (Zymo Research) siguiendo su protocolo:

1. Toda la masa microbiana de la bacteria que creció en la caja Petri se colocó en un tubo ZR BashingBead Lysis Tube y se añadieron 750  $\mu$ L de Lysis Solution.
2. El tubo se centrifugó a 10,000 x g por 1 min.
3. Se transfirieron 400  $\mu$ L del sobrenadante a Zymo-Spin IV Spin Filter (de tapa naranja) que este a su vez estaba en un tubo colector, y se centrifugó a 7000 rpm (7000 x g) por un minuto.
4. Al filtrado colectado en el tubo se le añadieron 1200  $\mu$ L de fungal/Bacterial DNA Binding Buffer y se mezcló perfectamente.
5. 800  $\mu$ L de la mezcla se transfirieron a Zymo-Spin IIC Column que a su vez estaba en un tubo colector y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto.
6. El filtrado colectado en el tubo se desechó y se volvió a repetir el paso anterior, después la Zymo-Spin IIC Column se colocó en un nuevo tubo colector.
7. Se añadieron 200  $\mu$ L de DNA Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin IIC Column y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto
8. Se añadieron 500  $\mu$ L de Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer al Zymo-Spin IIC Column y se centrifugó a 10,000 x g por un minuto.
9. Se transfirió el Zymo-Spin IIC Column a un tubo limpio de 1.5 mL y se le añadió 100  $\mu$ L de DNA Elution Buffer. Se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos para diluir el DNA.
10. El DNA recolectado en el tubo se etiquetó y se conservó en el ultracongelador (-20° C) para experimentos posteriores.

## 8.2 Amplificación del gen 16S rRNA

Para la identificación de las cepas bacterianas se realizó la amplificación del gen 16S rRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

Se utilizaron los primers universales 27 F/ 1492 R (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', respectivamente), que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400 pares de bases (pb). La reacción se realizó en un volumen de 50  $\mu$ L por muestra (Cuadro 4):

**Cuadro 4.** Concentración y volumen de reactivos utilizados para la PCR.

Reactivo	Concentración del "stock"	Concentración final en la reacción	Vol ( $\mu\text{L}$ )
Buffer	10x	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 mM	1
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1
Primer 27F	10 mM	0.2 mM	1
Primer 1492R	10 mM	0.2 mM	1
Taq DNA Polimerasa	5 U/ $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$	0.4
DMSO	100%	5 %	2.5
BSA	1 mg/ mL	0.5 mg/ mL	25
H <sub>2</sub> O	--		11.1
Muestra ADN	--		2
<b>Total</b>			<b>50</b>

Se incluyó un control negativo agregando agua destilada estéril en lugar de la muestra de ADN y un control positivo utilizando una muestra de ADN de *Geobacter* sp.

La amplificación se efectuó en un termociclador (DNA Bio-Rad C 1000™) siguiendo las siguientes condiciones de reacción (Cuadro 5):

**Cuadro 5.** Pasos de la PCR utilizados en el termociclador

Paso de la reacción	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95° C	10 min
<b>30 ciclos conformados por las etapas de:</b>		
Desnaturalización	95° C	1 min
Alineamiento	52° C	2 min
Extensión	72° C	3 min
<b>Extensión final</b>	72° C	10 min

Para verificar si se logró amplificar la región deseada del 16s rRNA en los productos de PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% verificando el tamaño en pb del producto.

El gel se preparó utilizando 0.3 g de agarosa disueltos en 30 mL de TAE 1x. La cámara de electroforesis se llenó hasta su marca de máximo volumen con TAE 1x. La solución de carga se preparó mezclando 1  $\mu\text{L}$  de Loading Buffer (6x, azul de bromofenol) con 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR de una muestra. La mezcla de la muestra se cargó en uno de los pozos del gel de agarosa, y así se hizo para el resto de las muestras, en otro de los pozos se cargó 4  $\mu\text{L}$  del marcador de peso

molecular y se corrió el gel a 100 V por 40 min. Terminado el proceso, el gel se dejó en una solución de bromuro de etidio (40 µl bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ ml diluido en 200 ml de agua desionizada) por 15 min y se lavó con agua destilada. El gel se reveló en un fotodocumentador (MiniBIS PRO DNR) y se visualizó si había la presencia de bandas en el gel, confirmando la amplificación de las muestras de ADN. Si la PCR fue exitosa el producto de PCR se purificó.

### **8.3 Purificación**

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit “Wizard® Gel and PCR Clean-Up System Protocol” (Promega) siguiendo su protocolo.

### **8.4 Secuenciación**

Una vez purificados, a los productos de PCR se les determinó la concentración de ADN con un Nanodrop (ND-1000 Thermo Scientific), y se prepararon a una concentración de 10 ng/ µL en 20 µL. Se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del IPICYT, utilizando la técnica de Sanger. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences), y se compararon usando BLAST en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, por sus siglas en inglés).

## **9. Efecto exógeno de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en la germinación de las tres especies de *Opuntia*.**

Para comprobar si hay un efecto del AIA y del GA<sub>3</sub> en la promoción de la germinación de las tres especies de *Opuntia* se prepararon soluciones de estas hormonas a diferentes concentraciones con las que se inocularon semillas. Además, para ver el efecto de la microbiota de la cubierta de la semilla en su germinación, se lavaron semillas siguiendo el protocolo descrito en el apartado de “Aislamiento de bacterias de las semillas”. A continuación se describe el procedimiento:

### **9.1 Preparación de las soluciones de AIA y GA<sub>3</sub>**

Se prepararon concentraciones de 0, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 ppm de cada fitohormona vegetal, como se muestra en el cuadro 6:

**Cuadro 6.** Cantidad (g) de AIA y GA<sub>3</sub> utilizadas para preparar distintas concentraciones de las hormonas.

Concentración deseada de la hormona (ppm)	Cantidad de GA <sub>3</sub> (mg)*	Cantidad de AIA (mg)*
0	0	0
25	3.75	4.03
50	7.49	7.41
100	30.00	31.10
250	37.5	37.73
500	74.99	75.34
1000	149.99	150.04

\*Para obtener la concentración deseada, la cantidad de la hormona se disolvió en 150 mL de agua destilada.

### 9.2 Diseño experimental

La preparación del ensayo se realizó dentro de la campana de flujo laminar. En una caja Petri (unidad experimental) se colocó un círculo de algodón previamente esterilizado en autoclave. Se colocaron 10 semillas lavadas de una especie de *Opuntia* y se le pusieron 10 mL de una concentración de una hormona, se selló con parafilm y se puso en una cámara de germinación (Lumistell ICP-19 d-c/ iv) a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad durante 30 días. Lo anterior se realizó para las tres especies de *Opuntia*, para todas las concentraciones de ambas fitohormonas y para las semillas lavadas y no lavadas. Se tuvieron 4 cajas Petri (repeticiones) para cada concentración de hormona. Teniendo en total 28 cajas Petri para cada concentración de la hormona, 128 cajas para cada especie de *Opuntia*, 192 cajas para AIA y 192 cajas para GA<sub>3</sub>, y 192 cajas para el tratamiento de lavado de semillas y 192 para las semillas no lavadas.

### 9.3 Evaluación de la germinación

La germinación de las semillas se consideró como la emergencia de la radícula a través de la testa (Baskin & Baskin, 2014). A partir del inicio de cada experimento se registraron el porcentaje de germinación que corresponde a la proporción de semillas germinadas durante el tiempo que duró el experimento (40 días) (Flores *et al.*, 2005). Se calculó en base a la siguiente fórmula: % de germinación= [(número total de semillas germinadas/ número total de semillas colocadas en la unidad experimental)\* 100].

## 10. Evaluación *in vitro* del efecto de las bacterias en la promoción de la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L.

### 10.1 Preparación de las cepas bacterias

Las cepas bacterianas que produjeron mayor concentración de AIA y una cepa de *E. coli* (control negativo) se hicieron crecer en medio YEM adicionado con triptófano siguiendo el protocolo descrito en el apartado de 5.1.3 *Incubación de las bacterias*. El ajuste de la densidad óptica se realizó tomando tres muestras de 1 mL de cada una de cada cepa bacteriana en la campana de flujo laminar y en el espectrofotómetro se midió su ABS. Se ajustó su ABS a una densidad óptica ( $DO_{560\text{ nm}}$ ) de 0.400 con el medio YEM utilizado. Una vez ajustada a la ABS deseada se anotó cuanto medio YEM se utilizó y se calculó un promedio de las tres muestras para cada cepa. En la campana de flujo laminar se tomó 1 mL de cada cepa, se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL y se ajustó su densidad óptica con la cantidad de medio YEM estéril calculado. Los tubos se conservaron en hielo hasta la inoculación de las cajas Petri.

### 10.2 Semillas de *Arabidopsis thaliana* L.

Se trabajó con semillas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Col-0 que fueron proporcionadas por el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont de la División de Biología Molecular del IPICYT. *A. thaliana* L. se utiliza ampliamente como planta modelo en investigación debido a que tiene un tamaño pequeño, estructura simple, organización genética simple y extensa literatura que define muchos aspectos de su crecimiento en condiciones experimentales (Dubrovsky *et al.*, 1994; García-Juárez *et al.*, 2010).

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5% durante 10 min, se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se dejaron secar en la campana de flujo laminar.

### 10.3 Preparación del medio Murashige & Skoog (MS)

Se preparó medio MS al 0.5x utilizando (Murashige & Skoog, 1962):

- Medio MS.....2.2 g
- Sacarosa.....15 g
- Agar.....15 g
- Agua destilada.....1000 mL

Se esterilizó en la autoclave por 15 min a 120°C y 15 lb.

Se vació en cajas Petri con división y sin división para los bioensayos posteriores.

Las cajas con división se utilizaron para probar el efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de *A. thaliana* por COVs, y las cajas sin

división se utilizaron para probar el efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de *A. thaliana* por compuestos solubles, en este caso por hormonas (AIA).

## **10.4 Diseño experimental**

### **10.4.1 Fitohormonas (compuestos solubles)**

En un extremo de una caja Petri (unidad experimental) con medio MS (al 0.5x, pH de 5.7; Murashige & Skoog, 1962) se colocaron 10 semillas de *A. thaliana* previamente desinfectadas y en el otro extremo se colocaron por separado 3 gotas de 20  $\mu$ L c/u de cultivo de una cepa bacteriana preparado como se indicó en la sección 10.1. Se dejaron secar las gotas en la campana de flujo laminar y después se sellaron perfectamente con parafilm. Lo anterior se realizó para todas las cepas bacterianas (5 cepas mayor productoras de AIA) a evaluar y la cepa de *E. coli* (utilizada como control negativo). Las cajas Petri se incubaron en una cámara de germinación (Lumistell ICP-19 d-c/ iv) a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad durante 40 días colocadas de manera vertical. Se tuvieron 5 cajas Petri (repeticiones) por cepa bacteriana y *E. coli* (tratamientos) y 5 cajas Petri sin inocular (testigo).

### **10.4.2 Compuestos orgánicos volátiles (COVs)**

En una sección de una caja Petri con división (unidad experimental) con medio MS (al 0.5x, pH de 5.7; Murashige & Skoog, 1962) se colocaron 10 semillas de *A. thaliana* previamente desinfectadas y en la otra sección de la caja se colocaron 3 gotas de 20  $\mu$ L c/u de una cepa bacteriana. Se dejaron secar las gotas en la campana de flujo laminar y después se sellaron perfectamente con parafilm. Lo anterior se realizó para todas las cepas bacterianas a evaluar. Las cajas Petri se incubaron en una cámara de germinación (Lumistell ICP-19 d-c/ iv) a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad durante 30 días. Se tuvieron 5 cajas Petri (repeticiones) por cepa bacteriana (tratamientos) y 5 cajas Petri sin inocular (testigo).

## **10.5 Evaluación de la germinación**

La germinación de las semillas se evaluó como se describe en el apartado 7.3 *Evaluación de la germinación*.

## **10.6 Evaluación del crecimiento de las plántulas**

Para evaluar el crecimiento de las plántulas de *A. thaliana*, a los 40 días después de que se colocaron las semillas a germinar, se tomaron imágenes de alta resolución de las cajas Petri que tenían plántulas y con el programa Imagen J (<http://imagej.nih.gov/ij/>) se determinó el crecimiento del tallo y raíz.

## 11. Análisis estadísticos

El porcentaje de germinación de las semillas de *Opuntia* spp. se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de tres vías, siendo los factores: la concentración de la hormona (siete niveles), el lavado de las semillas (dos niveles) y la especie de *Opuntia* (tres niveles). Este análisis se realizó por separado para cada hormona.

El porcentaje de germinación y el crecimiento de *A. thaliana* L. se analizó mediante un ANOVA de dos vías, siendo los factores: la cepa bacteriana (siete niveles, incluido el testigo y el control negativo) y el tipo de promoción del crecimiento (dos niveles: compuestos volátiles y compuestos solubles).

Si los ANOVAs fueron significativos se procedió a realizar una prueba de comparaciones múltiples de medias (Tukey,  $p= 0.05$ ) para determinar los efectos de los diferentes tratamientos en las variables de respuesta.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA y las gráficas en el programa de Excel del paquete Office.

## Resultados

### 1. Aislamiento de cepas bacterianas de la rizósfera y endósfera de *Opuntia* spp.

Tomando en cuenta la morfología macroscópica de cada cepa bacteriana aislada, se aislaron 108 cepas bacterianas de la rizósfera (Cuadro 7) y 14 cepas bacterianas de la endósfera de las semillas con morfologías coloniales diferentes (Cuadro 8).

De las 108 cepas aisladas de la rizósfera, 37 cepas se aislaron de *O. robusta*, 48 cepas de *O. leucotricha* y 23 cepas de *O. streptacantha*. Considerando la fuente de aislamiento o el medio de cultivo, se aislaron 40 cepas en medio TSA, 53 en medio Rennie y 15 en medio mineral (Cuadro 7). El mayor número de cepas se aisló en el medio Rennie en la especie *O. leucotricha*.

**Cuadro 7.** Número de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de las tres especies de *Opuntia*.

		<i>O. robusta</i>	<i>O. leucotricha</i>	<i>O. streptacantha</i>	Total
Medio	TSA	12	19	9	40
	Rennie	21	22	10	53
	Mineral	4	7	4	15
	<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>48</b>	<b>23</b>	<b>108</b>

De las 14 cepas aisladas de la endósfera de las semillas, 5 cepas se obtuvieron de *O. robusta*, 4 cepas de *O. leucotricha* y 5 cepas de *O. streptacantha*. Considerando el medio de cultivo, se aislaron 9 cepas en medio TSA, 3 en medio Rennie y 2 en medio mineral (Cuadro 8). En el medio TSA se aisló la mayor cantidad de bacterias, así como de las especies *O. robusta* y *O. streptacantha*.

**Cuadro 8.** Número de cepas bacterianas aisladas de las semillas de las tres especies de *Opuntia*.

		<i>O. robusta</i>	<i>O. leucotricha</i>	<i>O. streptacantha</i>	Total
Medio	TSA	4	3	2	9
	Rennie	1	0	2	3
	Mineral	0	1	1	2
	<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>14</b>

En total se aislaron 122 bacterias, aislándose considerablemente más de la rizósfera de las plantas que de la endosfera de las semillas.

## 2. Selección de las bacterias

### 2.1 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA) por las bacterias

La producción de la auxina AIA por todas las cepas bacterianas fue detectada y cuantificada mediante el método de Salkowski. Veinticinco cepas bacterianas produjeron más de 5 ppm de AIA, sin embargo, sólo siete cepas produjeron concentraciones por arriba de 20 ppm. La cepa MIN-END-OS-1-3-DE-1-2 y TSA-END-OL-1-3 produjeron concentraciones mayores a 100 ppm (Cuadro 9). Se seleccionaron las siete cepas que produjeron concentraciones mayores a 20 ppm para continuar con los ensayos de producción de sideróforos y hemólisis.

**Cuadro 9.** Cuantificación de la producción de AIA por las cepas bacterianas mediante el método de Salkowski.

#	ID	[AIA] µg/ mL
*1	MIN END OS 1-3 DE 1-2	175.10
*2	TSA END OL 1-3	119.31
*3	R-S13 7-3	79.86
*4	RE END OS 2-2	73.02
*5	RE S13 7-5 MP	28.00
*6	TSA END OL 1-3 DE MIN 1-2	23.75
*7	MIN END OL 1-3 DE 1-1	23.62
8	R-S13 9-1	17.33
9	TSA END OR 1-2 1	16.88
10	M-L32 1-2	16.69
11	R-S13 8-2	15.23
12	TSA-L32 13-2	12.08
13	TSA-L23 2 30-Sep	11.47
14	TSA-L13 1-1 29-Sep	10.26
15	R-L13 4-2	10.11
16	TSA-L31 9-2	9.23
17	R-R32-3-2	8.63
18	RE L32 9-3 MP	8.56
19	R-L32 11-2	8.04
20	TSA END OR 3-6	7.24
21	TSA-S22 4-2	7.14
22	TSA-L32 11-2	6.39

23	R-S11 3-2	6.23
24	R-R12 1-1 29-Sep	5.94
25	TSA-S22 5-2	5.15
26	R-L23 7-2	4.21
27	TSA-L11 3-2	4.05
28	R-S12 5-2	4.01
29	RE END OR 1-3	3.79
30	R-L32 10-2	3.50
31	R-R13 22-2	3.28
32	RE END OS 1-3	2.76
33	M-S32 1-1 29-Sep	2.56
34	TSA-L11 2-2	2.47
35	TSA-S32 6-2	2.23
36	M-L12 8-2	2.20
37	TSA-S32 7-2	2.17
38	TSA L11 2-3 MP	1.80
39	TSA-L32 14-2	1.76
40	M-R32 3-2	1.58
41	TSA-S33 16-2	1.49
42	M-S21 1-1 29-Sep	1.32
43	R-L32 12-2	1.13
44	TSA L32 13-4	1.11
45	R-R11 1-2	0.99
46	M-L21 1-1 29-Sep	0.87
47	TSA-R33 2-1	0.82
48	R-L13 3 6-Oct	0.60
49	R-L23 12-2	0.54
50	R-R21 5-2	0.47
51	TSA-S11 1-2	0.46
52	TSA-L23 15-1	0.46
53	R-L11 3 6-Oct	0.45
54	TSA-L13 1	0.43
55	R-R32 1 6-Oct	0.42
56	TSA-R12 9-2	0.42
57	R-L32 2-1 21-Sep	0.42
58	R-L22 2-1 29-Sep	0.42
59	TSA-L12 4-2	0.41
60	R-R21 4-2	0.41
61	R-R32 20-2	0.41
62	TSA-R21 10-2	0.40
63	TSA-R31 4-2	0.40
64	R-L11 2 6 Oct	0.33
65	TSA-R13 1-1	0.25

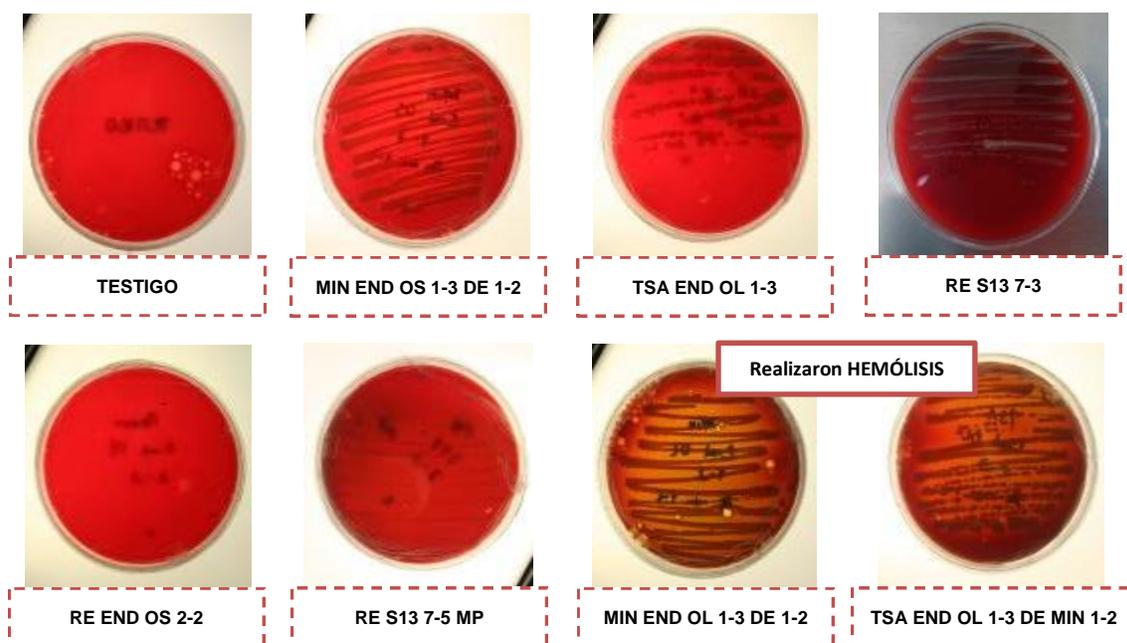
66	TSA-R22 6-2	0.18
67	R-L32 3 6-Oct	0.03
68	R-L32 9-2	0.01
69	R-S11 2-2	0.00
70	TSA END OL 3-3	0.00
71	R-S11 1-2	0.00
72	TSA-R12 2	0.00
73	R-R11 3-1	0.00
74	R-S22 6-1	0.00
75	R-R22 9-2	0.00
76	R-L22 1-1 30-Sep	0.00
77	TSA-L33 6-2	0.00
78	R-R21 7-2	0.00
79	M-L32 9-2	0.00
80	M-L25 2-2	0.00
81	TSA END OL 2-3	0.00
82	TSA END OS 2-4	0.00
83	R-R33 10-2	0.00
84	TSA-R22 7-2	0.00
85	R-L12-3-2	0.00
86	TSA-R11 2-1	0.00
87	TSA-L31 8-2	0.00
88	M-R12 1-2	0.00
89	R-R22 8-2	0.00
90	R-L11 1-2	0.00
91	M-S23 21-2	0.00
92	M-L22 3-2	0.00
93	M-R11 2-2	0.00
94	M-R33 4-1 29-Sep	0.00
95	R-L13 5-2	0.00
96	TSA-S12 2-2	0.00
97	R-R21 6-2	0.00
98	R-L23 3 6-Oct	0.00
99	R-L23 4 6-Oct	0.00
100	M-S13-1-1 29-Sep	0.00
101	TSA-S32 8-2	0.00
102	R-S11 4-2	0.00
103	R-L21 6-2	0.00
104	R-R31 1-1 29-Sep	0.00
105	TSA END OS 1-4	0.00
106	TSA-R11 2 30-Sep	0.00
107	R-R11 2-2	0.00
108	R-L25 8-2	0.00

109	TSA-L22 16-1	0.00
110	TSA-L11 1-7	0.00
111	TSA R23 8-2	0.00
112	TSA-L33 1-2	0.00
113	R-R31 2	0.00
114	R-L33 13-2	0.00
115	R-L31 2	0.00
116	TSA-L31 10-2	0.00
117	TSA-S23 3-2	0.00
118	R-L31 15-2	0.00
119	TSA END OS 1-3	0.00

\* Cepas seleccionadas para las pruebas siguientes.

## 2.2 Prueba de hemólisis

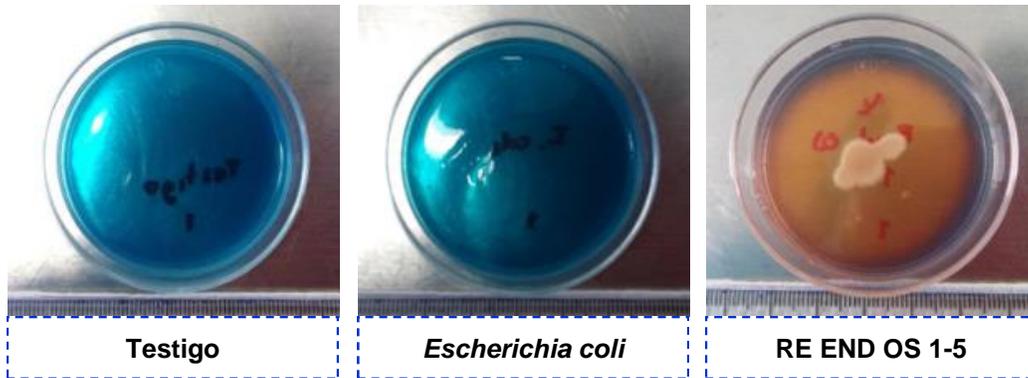
Se realizó la prueba de hemólisis a las siete cepas bacterianas que produjeron mayor concentración de AIA para descartar que fueran microorganismos patógenos para el ser humano. Las cepas bacterianas MIN END OL 1-3 de MIN-1-2 y TSA END OL 1-3 de MIN 1-2 realizaron hemólisis ya que presentaron halos hemolíticos incoloros alrededor de su crecimiento, indicando que hubo una degradación de los glóbulos rojos presente en el agar-sangre, por lo que se determinó que realizaron una hemólisis del tipo Beta (halos incoloros) (Figura 2). No se observaron halos hemolíticos del tipo Beta alrededor del crecimiento de las otras cinco cepas bacterianas por lo que se determinó que realizaron una hemólisis del tipo Gamma (inexistencia de halos alrededor del crecimiento bacteriano) (Figura 2).



**Figura 2.** Prueba de hemólisis de las siete cepas bacterianas que presentaron mayor producción de AIA. Sólo las cepas MIN END OL 1-3 de MIN 1 y TSA END OL 1-3 de MIN 1 realizaron hemólisis del tipo Beta.

### 2.3 Producción de sideróforos

Se realizó esta técnica a las cinco cepas bacterianas que produjeron concentraciones mayores a 20 ppm de AIA y que no realizaron hemólisis del tipo Beta. Esta prueba también se le realizó a las 14 bacterias aisladas de la endósfera de las semillas. Del total de las bacterias a las que se les realizó la prueba, sólo la cepa RE-END-OS 1-5 produjo sideróforos, ya que se observó un cambio de coloración del medio Agar-CAS de azul a amarillo, confirmando de forma cualitativa la producción de sideróforos (Figura 3), esta cepa fue identificada como *Burkholderia* sp. (Cuadro 10).



**Figura 3.** Crecimiento de las cepas bacterianas en el medio agar-CAS. La cepa RE END OS 1-5 (*Burkholderia* sp.) dio positivo para la producción de sideróforos por el cambio de color del medio de azul a naranja.

### 3. Identificación de las cepas bacterianas

Las siete bacterias con mayor producción de AIA y sideróforos se identificaron mediante la secuenciación del gen 16s rRNA mediante un fragmento de aproximadamente 500 pb. A continuación se muestra una lista de las cepas bacterianas y sus referencias del GENBANK más cercanas en identidad una vez que se compararon las secuencias en la base de datos del NCBI (Cuadro 10). La lista también muestra información sobre la producción de AIA, sideróforos y hemólisis.

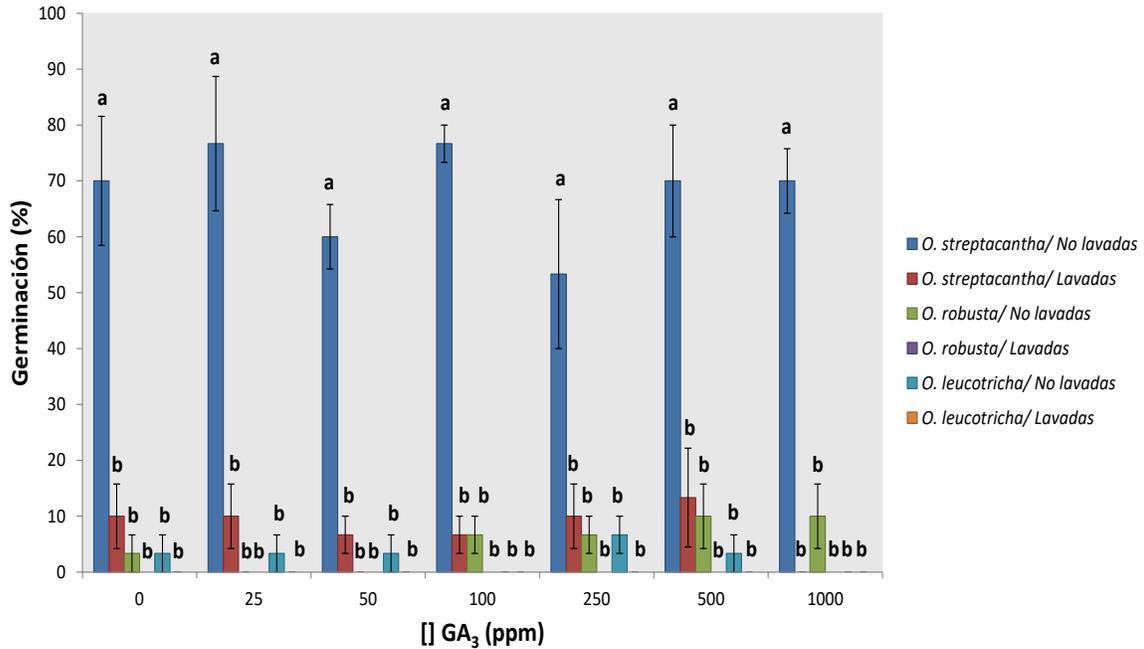
**Cuadro 10.** Cepas bacterianas identificadas mediante la secuenciación del gen 16s rRNA y resultados de las pruebas de caracterización.

ID	Fuente de Aislamiento	Medio de crecimiento	No. de accesión GenBank	% de identidad	□ producción de AIA	Sideróforos	Hemólisis	
1	MIN END OL 1-3 DE MIN 1-2	Semillas de <i>O. leucotricha</i>	Mineral	<i>Micrococcus luteus</i> cepa SSA-1 (KY486008.1)	100	23.62	-	+
				<i>Micrococcus yunnanensis</i> cepa V8Pb (KY419163.1)	100			
				<i>Micrococcus yunnanensis</i> cepa WJB23 (KU877632.1)	100			
				<i>Micrococcus aloe verae</i> cepa PP-06 (KX082870.1)	100			
2	RE S13- 7-5	Rizósfera de <i>O. streptacantha</i>	Rennie	<i>Ensifer</i> sp. Car_E8 (KU510026.1)	100	32.04	-	-
				<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa SH23 (KC172024.1)	100			
				<i>Ensifer</i> sp. L1GRs3 (KX266938.1)	100			

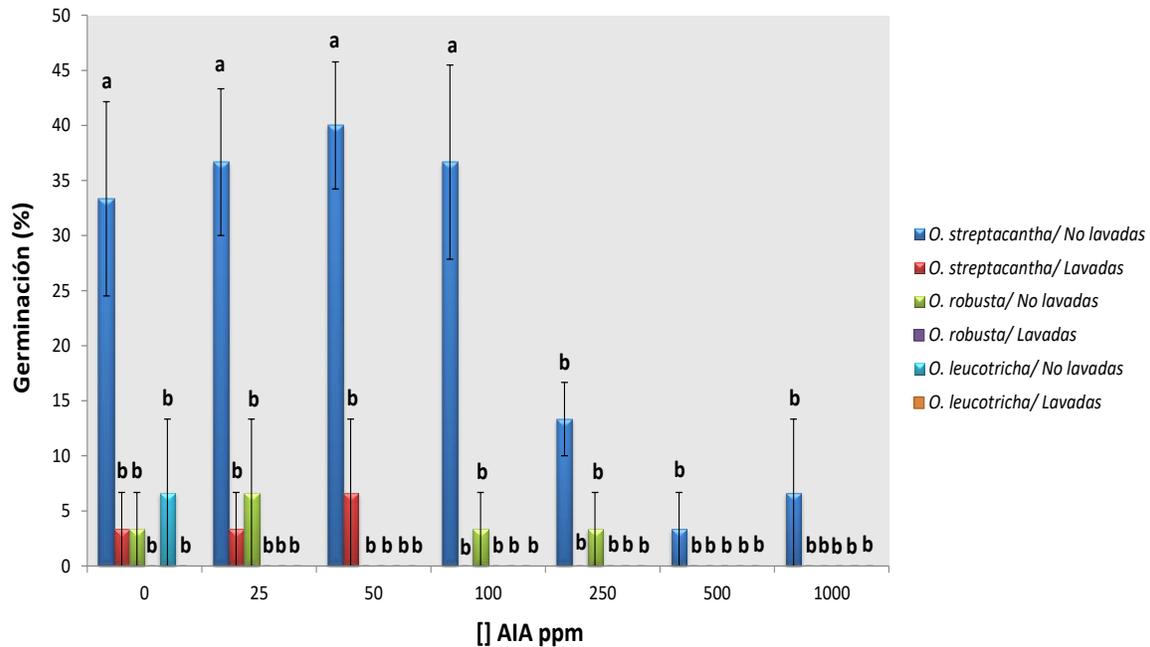
				<i>Sinorhizobium fredii</i> cepa DB6-1 (KU862346.1)	100			
3	RE S13 7-3	Rizósfera de O. <i>streptacantha</i>	Rennie	Uncultured bacterium clone T1_1111_67 (KP686864.1)	100	30.36	-	-
				<i>Variovorax</i> <i>paradoxus</i> cepa NG- T6 (KF844058.1)	100			
4	RE END OS 2-2	Semillas de O. <i>streptacantha</i>	Rennie	<i>Endobacter</i> <i>medicaginis</i> cepa M1MS02 (NR_132395.1)	100	87.92	-	-
				Uncultured clon bacteria FL2xa10_18024 (JQ383784.2)	100			
				<i>Endobacter</i> <i>medicaginis</i> cepa M1MS02 (NR_132395.1)	100			
				<i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i> clon CFN-CF52 (AY230812.1)	100			
5	TSA END OL 1-3	Semillas de O. <i>leucotricha</i>	TSA	<i>Kocuria rhizophila</i> cepa SL-08 (KX082875.1)	100	119.3	-	-
				Uncultured clon bacteria ncd1017c10c1 (KF083457.1)	100			
				<i>Kocuria rhizophila</i> cepa IS39 (MF125904.1)	100			
				<i>Kocuria sp.</i> cepa KOCH_198.F (KY434635.1)	100			
6	TSA END OL 1-3 DE MIN 1-2	Semillas de O. <i>leucotricha</i>	TSA	<i>Micrococcus</i> <i>aloeverae</i> cepa ST_BT4S_210 (LT800158.1)	100	23.75	-	+
				<i>Micrococcus luteus</i> cepa SSA-1 (KY486008.1)	100			
				<i>Micrococcus luteus</i> cepa SSW15 (KU922513.1)	100			
				<i>Micrococcus</i> <i>aloeverae</i> cepa PP- 06 (KX082870.1)	100			
7	MIN END OS 1-3 DE MIN 1-2	Semillas de O. <i>streptacantha</i>	Mineral	<i>Kocuria rhizophila</i> cepa IS39 (MF125904.1)	100	175.09	-	-
				<i>Kocuria rhizophila</i> cepa I49 (KU922406.1)	100			
8	RE END OS 1-5	Semillas de O. <i>streptacantha</i>	Rennie	<i>Burkholderia</i> <i>contaminans</i> DNA, scaffold: scaffold03, strain: CH-1 (AP018359.1)	100	-	+	No se ensayó por cuestiones de tiempo.

#### 4. Efecto exógeno de ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en la germinación de *Opuntia* spp.

La aplicación de AIA y GA<sub>3</sub> en diferentes concentraciones a las semillas de las tres especies de *Opuntia* no tuvo efectos significativos en su germinación, pero si se observó un efecto del lavado de las semillas para las tres especies ( $F= 229.76$ ,  $P< 0.0001$ , Figura 4;  $F= 66.27$ ,  $P< 0.0001$ , Figura 5). Por lo tanto, no hubo un efecto de la aplicación exógena de estas dos fitohormonas a diferentes concentraciones en la promoción de la germinación de las tres especies de *Opuntia*, sin embargo, el lavado de las semillas disminuyó la germinación de las mismas en las tres especies.



**Figura 4.** Porcentaje de germinación de las semillas de las tres especies de *Opuntia*, lavadas y no lavadas, bajo diferentes concentraciones de GA<sub>3</sub>. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ( $F= 229.76$ ,  $P< 0.0001$ ).



**Figura 5.** Porcentaje de germinación de las semillas de las tres especies de *Opuntia*, lavadas y no lavadas, bajo diferentes concentraciones de AIA. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ( $F= 66.27$ ,  $P< 0.0001$ ).

Las semillas de *Opuntia streptacantha* tuvieron mayor porcentaje de germinación en ambas hormonas vegetales y en el tratamiento de no lavadas, en comparación con la germinación de las otras dos especies. Sin embargo, también su germinación disminuyó cuando se lavaron las semillas (Figuras 4 y 5), por lo que al menos en esta especie es probable que no se requiera de algún pretratamiento para romper su latencia y que pueda germinar, probablemente porque se haya roto la latencia con el período de almacenamiento que tuvieron.

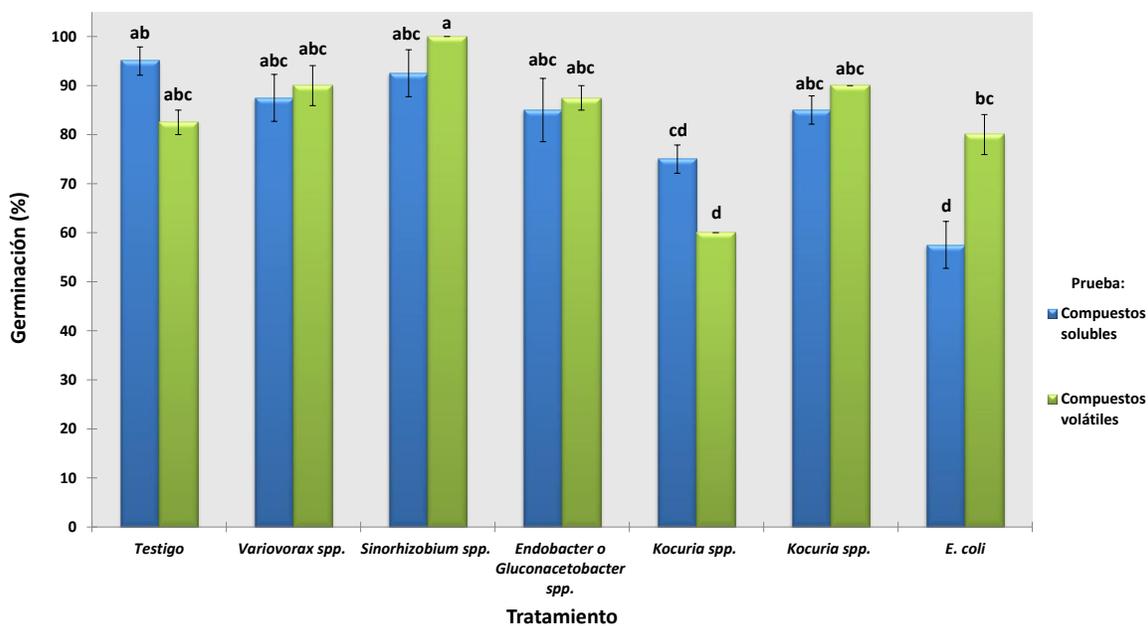
Las semillas de *O. leucotricha* y *O. robusta* presentaron bajos porcentajes de germinación (menos del 10 %) en ambas fitohormonas y no germinaron cuando se lavaron las semillas (Figuras 4 y 5), por lo tanto, estas semillas requieren de otros pretratamientos para romper su latencia y que puedan germinar.

## 5. Efecto de las bacterias seleccionadas en la germinación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L.

A los diez días de sembrar las semillas de *Opuntia* sp. se evaluó este el porcentaje de germinación. En general, el porcentaje de germinación de las semillas de *A. thaliana* fue mayor al 60% en todos los tratamientos (cepas bacterianas, testigo y control negativo), así como en la prueba para volátiles y compuestos solubles (cajas Petri con división y sin división, respectivamente) ( $F= 11.40$ ,  $P< 0.05$ ; Figura 6).

La bacteria identificada como *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) mostró una tendencia a promover más la germinación de las semillas comparado con los otros tratamientos, en específico en la prueba de compuestos volátiles (porcentaje de germinación superior al 95%), pero en la prueba de compuestos solubles también hubo un alto porcentaje de germinación (mayor al 90%).

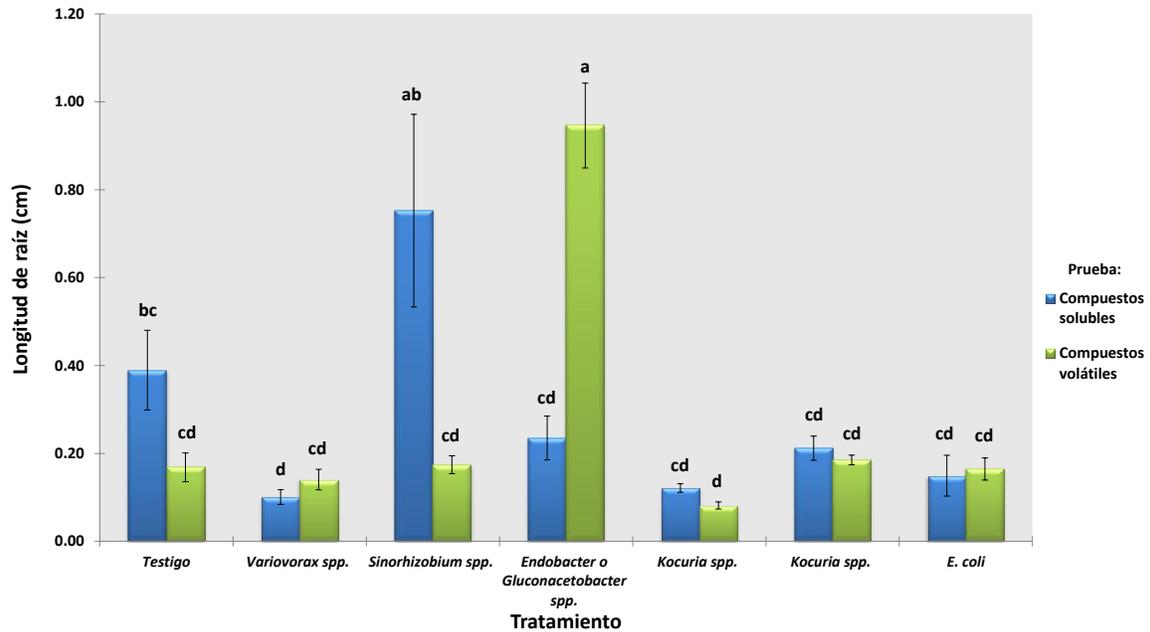
Las bacterias identificadas como *Variovorax* sp., *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) y una cepa de *Kocuria* sp. presentaron porcentajes de germinación superior al 80% en la prueba de compuestos solubles y volátiles, sin embargo, no se puede decir que hubo una promoción de la germinación por estas bacterias ya que estadísticamente el porcentaje de germinación fue igual comparado con el testigo. La bacteria de *Kocuria* sp. y la cepa de *E. coli* inhibieron la germinación de *A. thaliana*.



**Figura 6.** Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en la germinación de *A. thaliana* L. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $F= 11.40$ ,  $P < 0.05$ ).

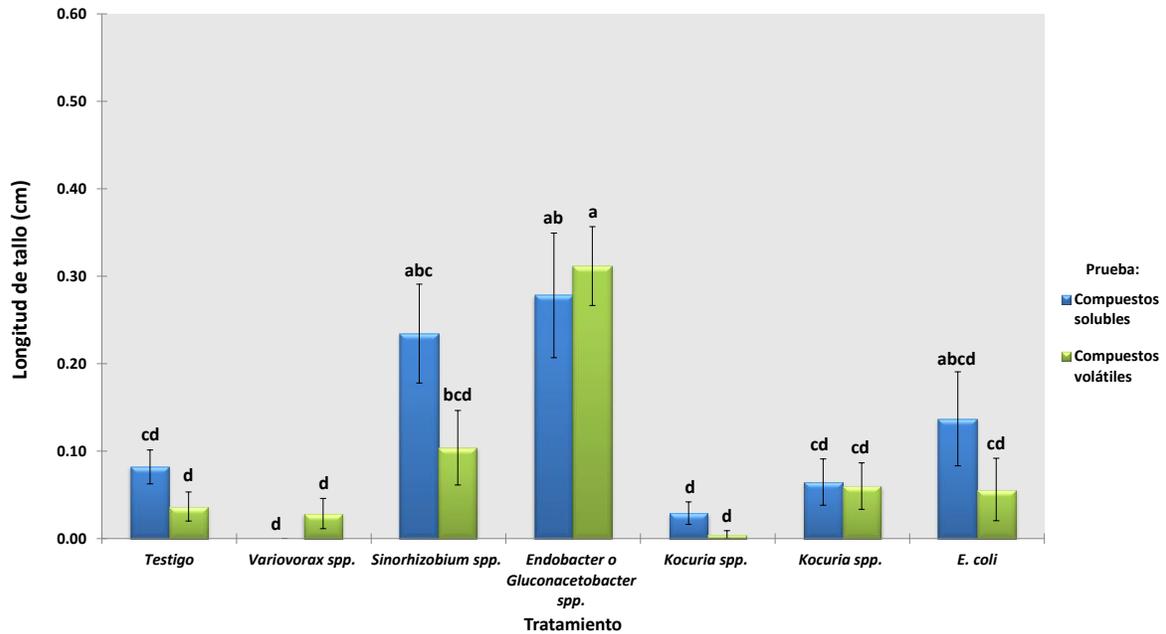
El crecimiento de la raíz de *A. thaliana* fue mayor en el tratamiento de *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) en la prueba de volátiles y en el tratamiento de *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) en la prueba de compuestos solubles, comparado con el resto de los tratamientos y el testigo donde no se vio un efecto de la inoculación de las bacterias en la promoción del crecimiento de las raíces (Figura 7).

*Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) promovió 82% más el crecimiento de la raíz de *A. thaliana* comparado con el testigo, siendo estadísticamente la bacteria que mayor promovió su crecimiento en la prueba de compuestos volátiles ( $F= 14.88$ ,  $P < 0.05$ ). *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) promovió 48% más el crecimiento de las raíces comparado con el testigo, mostrando una tendencia a promover más el crecimiento de *A. thaliana* en la prueba de compuestos solubles (Figura 7).



**Figura 7.** Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de raíz de *A. thaliana*. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ( $F= 14.88$ ,  $P < 0.05$ ).

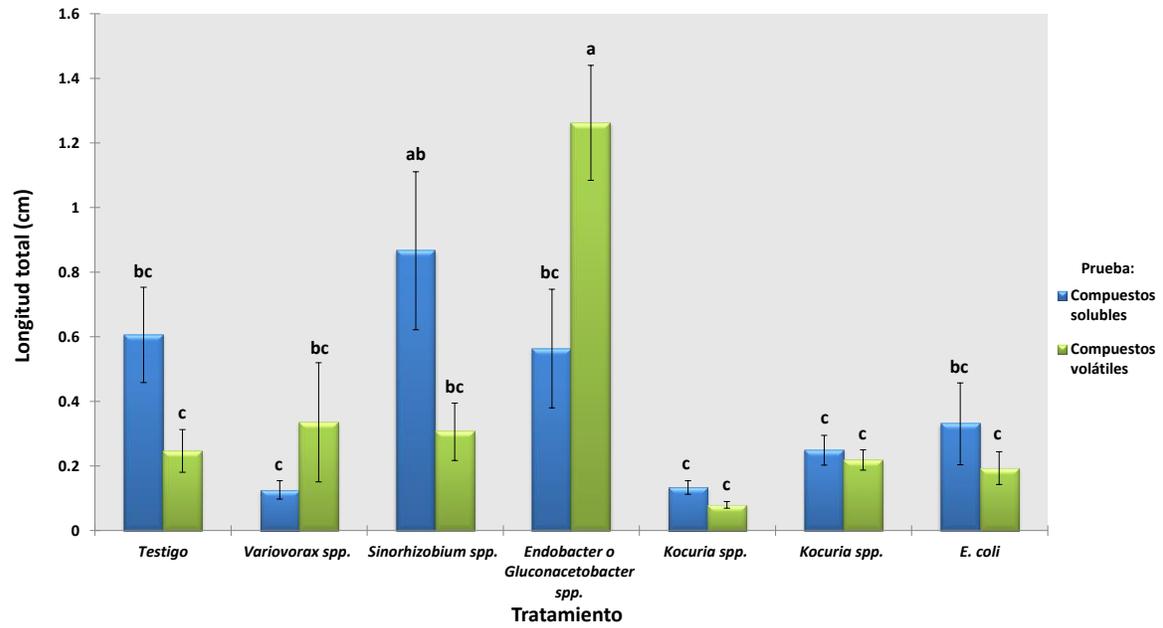
La bacteria *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) en ambas pruebas (compuestos solubles y volátiles) promovió más el desarrollo del tallo comparado con el testigo, sin embargo fue similar al crecimiento promovido por *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) y *E. coli* sp. en la prueba de compuestos solubles. En la prueba de compuestos solubles, *Endobacter*, promovió 71% más el crecimiento en comparación con el testigo y en la prueba de compuestos volátiles promovió 88% más el crecimiento ( $F= 7.86$ ,  $P < 0.05$ ). La bacteria *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) en la prueba de compuestos solubles promovió 65% más el crecimiento comparado con el testigo pero fue menor al crecimiento promovido por *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) (Figura 8).



**Figura 8.** Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento del tallo de *A. thaliana*. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ( $F= 7.86$ ,  $P< 0.05$ ).

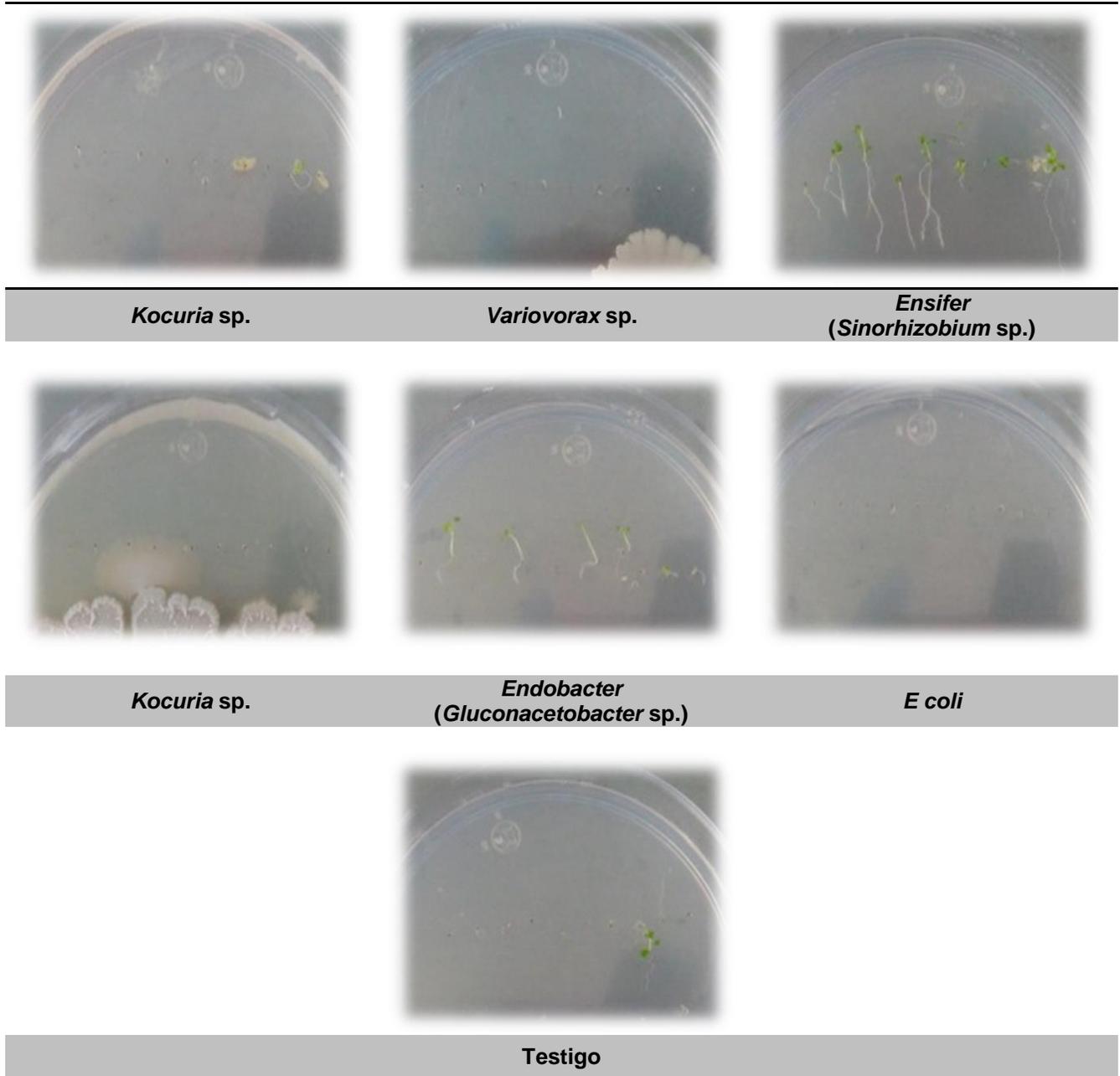
*Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) en la prueba de compuestos volátiles fue la que estadísticamente promovió más el crecimiento de *A. thaliana* (80%) comparado con el testigo y el resto de los tratamientos ( $F= 13.76$ ,  $P< 0.05$ ). La misma bacteria pero en la prueba de compuestos solubles no mostró diferencias en el crecimiento comparado con el testigo y el resto de los tratamientos.

*Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) en la prueba de compuestos solubles promovió 30% más el crecimiento total de las plantas comparado con el testigo, pero no mostró diferencias estadísticamente significativas, siendo también menor la promoción del crecimiento comparado con *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) en la prueba de volátiles (Figura 9).



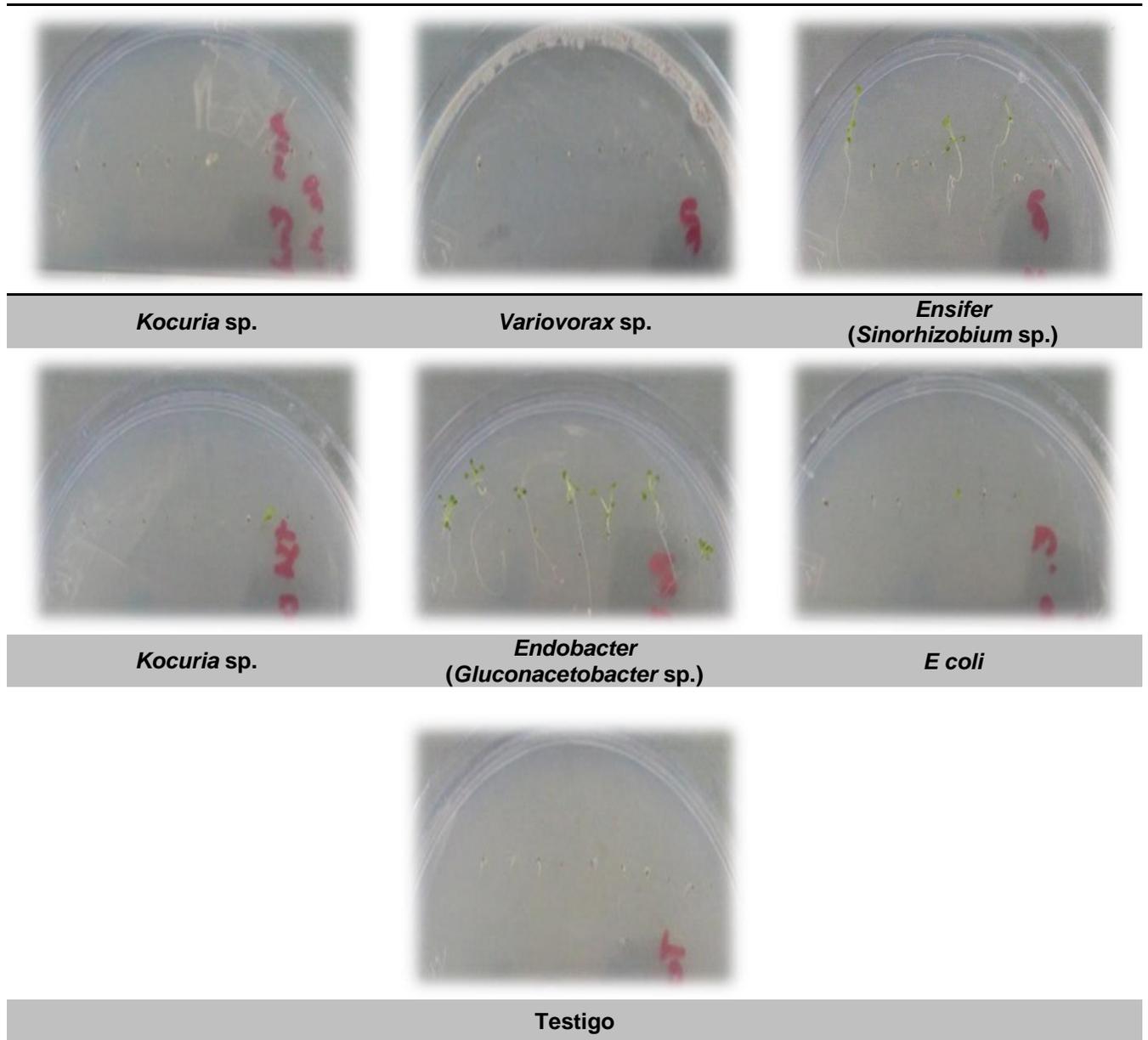
**Figura 9.** Efecto de la inoculación de las cepas bacterianas en el crecimiento de *A. thaliana*. Letras diferentes indican diferencias significativas en los tratamientos ( $F=13.76$ ,  $P<0.05$ ).

Las bacterias *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) y *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) también fueron las que mayor promovieron el crecimiento de *A. thaliana* en la prueba de compuestos solubles (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto de la inoculación de las bacterias en el crecimiento de *A. thaliana* L. por compuestos solubles (en cajas Petri sin división).

Las bacterias *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp) y *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) también fueron las que mayor promovieron el crecimiento de *A. thaliana* en en la prueba de compuestos volátiles (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la inoculación de las bacterias en el crecimiento de *A. thaliana* L. por compuestos volátiles (en cajas Petri con división).

## Discusión

El objetivo del presente trabajo de investigación fue aislar y caracterizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal a partir de la rizósfera y endósfera de semillas de *Opuntia streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* con la capacidad para producir ácido indolacético (AIA), compuestos orgánicos volátiles (COVs) y sideróforos, y probar su efecto en la germinación y el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L utilizada como planta modelo. En los bioensayos se observó que dos cepas bacterianas (*Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) y *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.)), identificadas como productoras de AIA, fueron capaces de promover el crecimiento de raíz y tallo de *A. thaliana*, este efecto puede atribuirse a la producción de AIA, algún compuesto orgánico volátil u otro compuesto promotor del crecimiento vegetal. Por cuestiones técnicas (tiempo de duración del programa de posgrado) no se logró comprobar que las bacterias aisladas de la endósfera de las semillas y rizósfera de *O. streptacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* les puedan ayudar a estas especies a romper la latencia de sus semillas y promover el crecimiento de sus plántulas.

En este estudio se lograron aislar en total 122 cepas bacterianas, de las cuales, el mayor número se obtuvieron de la rizósfera de *Opuntia* spp. (108 cepas bacterianas) en comparación con el número de cepas aisladas de la endósfera de las semillas (14 cepas bacterianas). Se ha descrito que las bacterias aisladas de la rizósfera de las plantas se pueden cultivar más fácilmente que las bacterias endófitas (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Bafana, 2012). Lo anterior debido a que las bacterias endófitas están más estrechamente relacionadas con las plantas, ya que se encuentran dentro de sus órganos (raíz, tallo, hojas), principalmente entre los espacios intercelulares y en los vasos xilemáticos (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006), considerado un lugar más limitado y estable que la rizósfera, por lo que probablemente requieren de ciertas condiciones y nutrientes más específicos para que se puedan aislar. Se ha encontrado que el medio de cultivo que se utiliza para aislar bacterias influye fuertemente en el número de bacterias y la diversidad de bacterias que se pueden aislar (Eevers *et al.*, 2015).

A pesar de que se utilizaron tres medios de cultivo, existe una gran cantidad de microorganismo endófitos de las plantas que aún no se pueden cultivar con las metodologías actuales (Maruwa *et al.*, 2016). También se ha encontrado que la composición y la cantidad de compuestos orgánicos de las semillas influyen mucho en la comunidad bacteriana que puede soportar y, por lo tanto, que se pueden aislar, ya que las propias semillas pueden producir compuestos antimicrobianos que seleccionan fuertemente a los microorganismos que las

colonizan (Roberts *et al.*, 2009). En nuestros cultivos inoculamos una solución de semillas trituradas la cual podría contener este tipo de compuestos antimicrobianos. Así, se ha sugerido que la riqueza de especies bacterianas que se detectan de la endósfera de las semillas es menor que de especies de la rizósfera de la planta (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

Con respecto a los medios de cultivos utilizados, se tuvo el mayor número de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera en el medio TSA y Rennie, y de la endósfera de las semillas en el medio TSA. Los medios ricos en nutrientes o medios complejos, como el TSA, producen un ambiente rico para que gran cantidad de bacterias heterótrofas se reproduzcan. Por otra parte, los medios pobres en nutrientes, como el medio mineral, contienen una composición más baja de nutrientes y nulas fuentes de carbono que los medios complejos, lo que origina que sólo algunas bacterias oligótrofas o autótrofas puedan crecer después de varios días (Eevers *et al.*, 2015). Por lo anterior, un mayor número de bacterias heterótrofas y de rápido crecimiento se desarrollan en medios ricos en nutrientes o complejos en comparación con los medios mínimos (Hottes *et al.*, 2004; Majzlik *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2009; Eevers *et al.*, 2015).

El medio de cultivo Rennie se utiliza principalmente para aislar bacterias con posibilidades de fijar nitrógeno atmosférico, ya que este medio carece de fuentes de nitrógeno (Rennie, 1981). Los suelos de las zonas áridas y semiáridas en general presentan bajo contenido de nitrógeno (Celaya & Castellanos, 2011), así que muchas bacterias de las comunidades microbianas de la rizósfera desempeñan un papel fundamental en la fijación biológica de nitrógeno (Pii *et al.*, 2015), lo que puede explicar el mayor número de cepas bacterianas aisladas en el medio de cultivo Rennie y de la rizósfera de *Opuntia* spp. con respecto a los otros medios de cultivo.

La diferencia en el número de cepas bacterianas aisladas y géneros identificados entre las tres especies de *Opuntia* spp., principalmente en la rizósfera, puede deberse a que las plantas seleccionan su microbiota bacteriana de la rizósfera a través de exudados de carbono y otros metabolitos que producen (Hardoim *et al.*, 2008; Doornbos, *et al.*, 2012; Marasco *et al.*, 2012), estimulando microorganismos que son benéficos para su crecimiento (Compant *et al.*, 2010). El genotipo de la planta es un factor determinante en la estructura y composición de la comunidad microbiana en la rizósfera de la planta. Aún cuando hablamos de plantas de la misma especie, dependiendo de su salud, estado fisiológico, edad (Berg & Smalla, 2009; Lundberg *et al.*, 2012; Mendes *et al.*, 2013) y el entorno al que están sometidas (por ejemplo por el efecto de algún estrés hídrico), la composición de su microbiota puede variar (Berg & Smalla, 2009; Mendes, *et al.*, 2013; Haney *et al.*, 2015)(Mendes *et al.*, 2013). Lo anterior también se ha observado en los

microorganismos que viven dentro de la planta (endósfera) (Hardoim *et al.*, 2008; Marasco *et al.*, 2012).

Existe una gran diversidad de microorganismos que habitan la rizósfera y la endósfera de las plantas. Los principales géneros bacterianos de la rizósfera reportados como promotores del crecimiento de las plantas incluyen a *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Bashan & De Bashan, 2005; Bhattacharyya & Jha, 2012; Majeed *et al.*, 2015) y los principales microorganismos endófitos incluyen a los géneros *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Lodewyckx *et al.*, 2002; Bashan & De Bashan, 2005; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). De todas las bacterias aisladas de la rizósfera y endósfera de las semillas de las tres especies *Opuntia*, se identificaron las siete cepas con mayor producción de AIA. Estas correspondieron a los géneros ***Micrococcus*** (MIN END OL 1-3 DE MIN 1-2 y TSA END OL 1-3 DE MIN 1-2; Actinobacteria, Actinomycetales), ***Ensifer (Sinorhizobium)*** (RE S13-7-5, Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhizobiales), ***Variovorax*** (RE S13 7-3; Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales), ***Endobacter (Gluconacetobacter)*** (RE END OS 2-2; Proteobacteria, Alphaproteobacteria, Rhodospirillales) y ***Kocuria*** (TSA END OL 1-3 y MIN END OS 1-3 DE MIN 1-2; Actinobacteria, Actinomycetales); y la cepa que produjo sideróforos se identificó como *Burkholderia* sp. (RE END OS 1-5; Proteobacteria, Betaproteobacteria, Burkholderiales). Se ha reportado que especies del género *Burkholderia* muestran importantes actividades antimicrobianas contra hongos y bacterias fitopatógenos (Deng *et al.*, 2016; Sivaji *et al.*, 2016), y también se ha reportado que promueve el crecimiento vegetal mediante la fijación de N<sub>2</sub> y solubilización de fósforo (Castro-González *et al.*, 2011; Sivaji *et al.*, 2016), por lo que sería de gran relevancia continuar trabajando con esta cepa para evaluar estas características.

De estos géneros, sólo ***Micrococcus*** y ***Burkholderia*** se han reportado como aislados de la rizósfera de otra cactácea (*Stenocereus stellatus*) (Aguirre-Garrido *et al.*, 2012), por lo que en el presente trabajo se reportan otros géneros de bacterias aisladas de *Opuntia* que no se habían reportado antes, sin embargo, si se han aislado de otras familias de plantas, principalmente de cultivos agrícolas.

Varias especies del género ***Micrococcus*** se han aislado de *Brassica napus* L. (canola, Germida *et al.*, 1998), de las raíces de *Polyspora axillaris* (Zhao *et al.*, 2009), de la endósfera de *Oryza sativa* (arroz) y de los tejidos internos de tubérculos de *Solanum tuberosum* (papa; De Boer & Copeman, 1974; Sturz *et al.*, 1998), de *Triticum* sp. (trigo, Germida *et al.*, 1998) y del interior de las raíces de *Trifolium pratense* L. (trébol, Sturz *et al.*, 1998). Este género está compuesto de

microorganismos Gram-positivos, con forma de esfera y que por lo general se encuentran en tétradas o grupos irregulares generalmente inmóviles (Kocur *et al.*, 2006; Huber & Prangishvili, 2006). El principal hábitat de este género es la piel de los mamíferos, encontrándose en la piel humana, pero también se ha encontrado en el suelo, en el lodo marino, en el agua dulce y salina, en las plantas, en el polvo y el aire (Kocur *et al.*, 2006), lo cual sugiere que es un heterótrofo generalista.

Algunas especies de este género habitan la piel humana, en particular *M. luteus*, que es considerada como patógeno oportunista en los humanos, principalmente cuando el sistema inmune está inmunocomprometido, provocando algunas enfermedades (Souhami *et al.*, 1979; Fosse *et al.*, 1985). Las cepas aisladas de *Micrococcus* (MIN END OL 1-3 de MIN-1-2 y TSA END OL 1-3 de MIN 1-2) identificadas con un 100% de identidad con la especie *M. luteus*, dieron positivo en la prueba de hemólisis, por lo que se considera que pueden ocasionar alguna enfermedad humana, tomándose la decisión de ya no seguir trabajando con ellas ya que para aplicaciones biotecnológicas futuras esto podría representar una limitación.

Se ha descrito en los últimos años que muchos microorganismos patógenos de humanos se pueden encontrar en la rizósfera y en los tejidos vegetales (Tyler & Triplett, 2008; Mendes *et al.*, 2013). Tyler & Triplett (2008) han sugerido que los microorganismos patógenos de humanos pueden utilizar a las plantas como un huésped alternativo para sobrevivir en el ambiente, ya que es un hábitat con un alto contenido nutricional, los protegen de la radiación UV y de la desecación, además de utilizarlas como medio de transporte para volver a colonizar a los animales o humanos una vez ingeridos. Sin embargo, también algunas especies de este género exhiben ciertos atributos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal como la solubilización de fósforo, producción de AIA (Dastager *et al.*, 2010; Shahzad *et al.*, 2017), actividad de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa y producción de sideróforos (Dastager *et al.*, 2010). Dentro de la producción de auxinas, las cepas de *Micrococcus* del presente trabajo produjeron de entre 23.62 y 23.75 µg/ mL de AIA (Cuadro 9), en otros estudios también se ha reportado la producción en condiciones *in vitro* de esta hormona (Dastager *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2009; Shahzad *et al.*, 2017).

Otro de los géneros aislados fue ***Variovorax***, que también se ha aislado de los tejidos internos de *Cucurbita pepo* (calabaza; Eevers *et al.*, 2015), de *Gossypium hirsutum* L. (algodón; McInroy & Kloepper, 1995), *Triticum* sp. (trigo; Chen *et al.*, 2007), de *Trifolium pratense* L. (Sturz *et al.*, 1998), de *Solanum tuberosum* L. (papa; Belimov *et al.*, 2015) y de *Pisum sativum* L. (chícharo, Wang *et al.*, 2016). Especies del género *Variovorax* sp. son bacterias aerobias Gram-negativas que se encuentran presentes en diversos ambientes (Willems, 1991) y que se ha

asociado con la degradación de diversos compuestos contaminantes, principalmente con herbicidas como la atrazina (Smith *et al.*, 2005), pero también se ha descrito como promotora del crecimiento vegetal, catalogándola como una PGPR (Lin *et al.*, 2002; Maimaiti *et al.*, 2007; Jamieson *et al.*, 2009; Belimov *et al.*, 2009). Se ha identificado que algunas especies de este género producen AIA y que han promovido el crecimiento de diversas plantas, principalmente cultivadas. En este estudio también se identificó como una cepa (RE S13 7-3) productora de AIA (30.36 µg/ mL), sin embargo no originó una promoción del crecimiento de *A. thaliana* L. En contraste, Mahmood *et al.*, (2016) reportaron una producción de 3.25 µg/ mL de AIA por una especie de este género y su inoculación en *Cucumis sativus* L. (pepino) promovió el crecimiento de su raíz 29% y la longitud de su tallo 23%. En otro estudio se reportó una producción de AIA de entre 4 y 73 µg/ mL y su inoculación en *Brassica juncea* L. (mostaza parda) promovió 20% la longitud de la raíz (Belimov *et al.*, 2005), además de ser atribuida la promoción del crecimiento a una alta actividad de la enzima de ACC-deaminasa (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), la cual disminuye las concentraciones de etileno en la planta cuando éste se encuentra en concentraciones muy altas, principalmente cuando la planta está estresada (Belimov *et al.*, 2005; Belimov *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016).

Las cepas TSA END OL 1-3 y MIN END OS 1-3 DE MIN 1-2 correspondieron al género ***Kocuria***. Anteriormente el género ***Kocuria*** formaba parte del género ***Micrococcus***, sin embargo fue reclasificado en este nuevo grupo filogenético (Stackebrandt *et al.*, 1996). Diversas especies de este género han sido aisladas de diferentes fuentes como el aire, alimentos fermentados como el queso, la carne de pollo, de la piel de los mamíferos, del agua dulce y salina, del sedimento marino y del suelo desértico (Huber & Prangishvili, 2006; Kaur *et al.*, 2011). De las plantas se han aislado de la rizósfera de *Suaeda fruticosa* (planta halófila), donde se ha identificado que también producen AIA y sideróforos (Goswami *et al.*, 2014), de las raíces de *Prosopis glandulosa* (mezquite) con capacidad para realizar fijación de N<sub>2</sub> (Villegas-Espinoza *et al.*, 2014), del tejido de raíces de *Tagetes erecta* (cempasúchil; Sturz & Kimpinski, 2004), de la rizósfera de *Typha angustifolia*, donde se aisló por primera vez la especie *K. rhizophila* (Kovacs *et al.*, 1999), y de la rizósfera de *Vitis vinífera* (uva; Salomon *et al.*, 2014). *K. rhizophila* es una bacteria Gram-positiva en forma esférica, aerobia, quimioorganotrófica, se puede encontrar en pares o tetradas de 1.0-1.5 µm de diámetro, y no presenta motilidad (Kovacs *et al.*, 1999).

Aunque se detectó una alta producción *in vitro* de AIA por las cepas de *Kocuria* aisladas en el presente trabajo (175.09 µg/ mL producidos por MIN END OS 1-3 DE MIN 1-2 y 119.3 µg/ mL producidos por TSA END OL 1-3), ninguna promovió

el crecimiento de *A. thaliana* comparado con el testigo en la prueba de promoción del crecimiento por compuestos solubles y volátiles (cajas sin y con división, respectivamente) al igual que *Variovorax*. La alta producción de AIA en proporciones similares a las encontradas en esta investigación ya había sido reportada previamente (Yuan *et al.*, 2011). Sin embargo, en ese trabajo no se evaluó su capacidad como promotor del crecimiento. En otro trabajo, una especie de *Kocuria* produjo una menor cantidad de AIA y su inoculación en *Arachis hypogaea* L. (maní) promovió un crecimiento del 18% en la longitud total en comparación con el control, además se identificó que solubiliza fósforo y produce sideróforos (Goswami *et al.*, 2014).

Especies del género ***Sinorhizobium*** se han aislado de diversas especies vegetales, de hecho es uno de los grupos más estudiados de fijadoras de N. Por dar algunos ejemplos de la variedad de plantas de las que se han aislado tenemos a *Acacia laeta* (Martens *et al.*, 2007), *Gliricidia sepium* (cocuite, Acosta-Durán & Martínez-Romero, 2002; Martens *et al.*, 2007), *Glycine max* (soya, Scholla & Elkan, 1984; Chen *et al.*, 1988; Martens *et al.*, 2007), *Ipomoea batatas* (camote; Reiter *et al.*, 2003), *Leucaena leucocephala* (guaje, Wang *et al.*, 2002; Martens *et al.*, 2007), *Lotus corniculatus* var. *tenuifolium*, (Martens *et al.*, 2007), *Medicago sativa* (alfalfa, Muñoz *et al.*, 2001; Martens *et al.*, 2007), *Medicago murex* (Howieson & Ewing, 1986), *Medicago truncatula* (Martens *et al.*, 2007), *Phaseolus vulgaris* (frijol; Rogel *et al.*, 2001, Martens *et al.*, 2007), *Pisum sativum* (chícharo; Martens *et al.*, 2007), *Pithecellobium dulce* (guamúchil; Martens *et al.*, 2007), *Prosopis chilensis* (Martens *et al.*, 2007), *Psoralea corylifolia* L. (Sorty *et al.*, 2016), *Sesbania grandiflora*, *Sesbania herbácea* y *Sesbania rostrata* (Martens *et al.*, 2007). Este género está compuesto por bacterias Gram-negativas, aeróbicas y móviles, que no forman esporas y que pueden existir como saprófitos del suelo en vida libre o como simbiote de las raíces de varias especies de leguminosas fijando nitrógeno (Howieson *et al.*, 1986; Reeve *et al.*, 2010; Reeve *et al.*, 2014), por ejemplo *Sinorhizobium meliloti* en *Medicago sativa* (Mitsui *et al.*, 2004).

El género *Sinorhizobium* tiene reportadas once especies (Martens *et al.*, 2007). La comparación de las secuencias de nuestras cepas con la base de datos del NCBI indica que tienen 100% de similitud con *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii* y con el género ***Ensifer***. Análisis filogenéticos indican que *Sinorhizobium* está estrechamente relacionado con el género *Ensifer* por lo que pueden ser considerados como un solo taxón (Willems *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 2007). La cepa RE S13-7-5 identificada como *Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) fue la que más promovió el crecimiento de la raíz, el tallo y la longitud total de *A. thaliana* en la prueba por compuestos solubles (cajas sin división) comparado con el resto de los tratamientos y el testigo. Como se mencionó anteriormente, la principal

característica de este género es que sus especies, principalmente *Sinorhizobium meliloti*, fijan nitrógeno atmosférico (Yan *et al.*, 2017), sin embargo, también se ha descrito que algunas especies de este género producen algunas fitohormonas como AIA (Barnett *et al.*, 2004; Sorty *et al.*, 2016) y citocininas que promueven el crecimiento (Xu *et al.*, 2012). En esta investigación únicamente se comprobó la producción de AIA mediante la técnica de Salkowski, indicando la producción de 32.04 µg/ mL de esta hormona (Cuadro 9), y que a pesar de que produjo menor cantidad de AIA comparado con las otras cepas evaluadas (por ejemplo, 175.09 µg/ mL producidos por *Kocuria* sp.-MIN END OS 1-3 DE MIN 1-2; 119.3 µg/ mL producidos por la otra cepa de *Kocuria* sp.-TSA END OL 1-3; y 87.92 µg/ mL de AIA producidos por *Endobacter (Gluconacetobacter-RE END OS 2-2)* fue la cepa que promovió en mayor medida el crecimiento total y de la raíz de *A. thaliana* en la prueba por compuestos solubles (cajas sin división), pudiéndoselo atribuir al AIA.

Sin embargo, como mencionamos anteriormente, existen otros compuestos producidos por las bacterias que también promueven el crecimiento vegetal, los cuales no evaluamos en el presenta trabajo pero que pudieron haber tenido un efecto positivo en el crecimiento de *A. thaliana*.

En general, el AIA promueve la división y diferenciación celular y estimula el crecimiento de las raíces cuando éste se encuentra dentro de un rango de concentración óptimo, incrementando la longitud de las raíces, su área superficial y la cantidad de pelos radiculares, proporcionándole a la planta un mayor acceso y absorción de los nutrientes (Ahemad & Kibret, 2014). El AIA también puede promover la exudación de compuestos que estimulan una mayor colonización de las raíces por los microorganismos promotores del crecimiento (Spaepen & Vanderleyden, 2011), por lo que también se identifica como una molécula efectora en la interacción planta-microorganismo (Ahemad & Kibret, 2014).

Se ha descrito que para que ocurra una simbiosis efectiva entre la planta-microorganismo se requiere de una comunicación molecular entre los organismos participantes mediada por exudados de la planta huésped y de los microorganismos (Mitsui *et al.*, 2004), donde el AIA puede estar jugando un papel muy importante en el establecimiento de esta interacción y promover el crecimiento. Sin embargo, también se ha descrito que a concentraciones más altas, el AIA bacteriano puede inhibir el crecimiento de las raíces primarias (Davies, 1995). El AIA secretado por las bacterias actúa en conjunto con el suministro endógeno de AIA de la planta, por lo que la concentración de AIA bacteriano sobre las plantas puede ser positivo o negativo, dependiendo del nivel de AIA producido (Ali *et al.*, 2010). Las plantas mantienen la homeostasis de AIA en su organismo, sin embargo, altos niveles de AIA derivados de las bacterias pueden anular la regulación de AIA y tener efectos perjudiciales (Davies, 1995).

También se ha reportado que la presencia de triptófano, vitaminas, sal, oxígeno, pH, temperatura, fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno son otros factores que contribuyen en la regulación de la biosíntesis de AIA (Apine & Jadhav, 2011) y que los microorganismos varían en sus fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno para la producción de esta hormona (Sridevi *et al.* 2008), lo que influye directamente en la producción de AIA que puede estimular el crecimiento de la planta. Los niveles de producción de AIA de las bacterias que nosotros reportamos son en condiciones ideales y en presencia de todos los recursos necesarios para su producción (por ejemplo el medio está adicionado con triptófano, molécula precursora del AIA), sin embargo, el ensayo de promoción del crecimiento se realizó en un medio diferente (medio MS, ideal para el crecimiento de tejidos vegetales), carente de aminoácidos y de triptófano lo que también pudo influir en la producción de AIA por las bacterias y en la promoción del crecimiento de *A. thaliana*.

Por lo anterior, a pesar de que *Variovorax* y *Kocuria* fueron las cepas que produjeron la mayor concentración de AIA en condiciones *in vitro* (junto con *Micrococcus*), no promovieron el crecimiento de *A. thaliana* posiblemente por la explicación dada de que altos niveles producidos de AIA por las bacterias, puede afectar la regulación endógena de AIA de la planta y tener efectos negativos en su crecimiento (Davies, 1995), o porque las condiciones y/ o la composición nutricional del medio no fueron los adecuados para que las bacterias produjeran AIA, por lo que sería importante estudiar si pueden producirlo bajo otras condiciones como por ejemplo con diferente medio de cultivo o directamente en el suelo, aunado a la identificación de otros compuestos promotores del crecimiento.

El género *Endobacter* se ha propuesto como un nuevo género de la familia Acetobacteraceae, muy cercano al género *Gluconacetobacter* por lo que la secuencia de la cepa RE END OS 2-2 comparada en la base de datos del NCBI dio como resultado 100% de similitud con ambos géneros y en muchas ocasiones se manejan como un mismo género en la literatura. *Endobacter medicaginis* fue reportado como la primera especie aislada de este género a partir de nódulos de raíz de *Medicago sativa* (alfalfa) (Ramírez-Bahena *et al.*, 2013).

Las especies de *Endobacter (Gluconacetobacter)* son bacterias Gram-negativas, aeróbicas y en forma de cocoide o bacilo, móviles, y algunas pueden fijar grandes cantidades de nitrógeno atmosférico, principalmente en la caña de azúcar, sin embargo es un género que puede habitar diversas especies vegetales y no requiere de la formación de nódulos con las raíces vegetales para fijar nitrógeno como otras especies (Eskin *et al.*, 2014). Se ha identificado también por su capacidad para producir fitohormonas, principalmente AIA (Patil *et al.*, 2011). En esta investigación esta cepa produjo 87.92 µg/ mL de AIA (Cuadro 9), pero no

se observó una promoción del crecimiento de raíz comparado con el testigo. Sin embargo, si promovió 71% la longitud del tallo de *A. thaliana* en la prueba de compuestos volátiles. En otros estudios, esta especie ha producido 26.28 µg/mL de AIA, promoviendo el crecimiento de la raíz en un 35% y del tallo en un 43% en *Zea mays* (maíz) (Patil *et al.*, 2011). En otros estudios sólo se identificó que produce entre 4 y 7 µg/ mL de AIA (Lee *et al.*, 2004; Anitha *et al.*, 2010) y 4.32 µg/ mL de AIA (De Carvalho & Soares De Melo, 2012). También se ha reportado que produce giberelinas, realiza solubilización de fósforo y zinc y que es un antagonista de fitopatógenos (Eskin *et al.*, 2014). Sin embargo, en el presente trabajo no se observó una promoción del crecimiento de *A. thaliana* mediante métodos directos (sólo en el crecimiento del tallo), más bien fue mayor la promoción del crecimiento por métodos indirectos, posiblemente por COVs lo cual inferimos de los resultados de los ensayos. Sin embargo, no hay reportes previos sobre la producción de compuestos volátiles por *G. diazotrophicus* que estimulen el crecimiento, sólo hay un reporte donde se indica que inhibió el crecimiento del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por la producción de COVs, sin embargo, no se identificó el o los tipos de compuestos volátiles que lo hicieron (Logeshwarn *et al.*, 2011).

Se sabe que las PGPR producen una gran diversidad de COVs de los cuales solo algunos se han reportado como promotores del crecimiento vegetal, dentro de los que destacan aldehídos, alcoholes, cetonas, índoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmonatos (Van Loon, 2007). Sin embargo, sólo 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) y 2, 3-butanodiol se han reportado como COVs promotores del crecimiento vegetal de *A. thaliana* producidos por *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*; y además se comprobó mediante la aplicación exógena de 2,3-butanodiol la estimulación del crecimiento de plántulas (Ryu *et al.*, 2003).

También, se ha reportado que estos compuestos pueden originar en la planta una resistencia sistémica contra microorganismos fitopatógenos (Ryu *et al.*, 2003; Rudrappa *et al.*, 2010). Otro estudio reportó que el 2,3-butanodiol producido por *Pseudomonas chlororaphi* no sólo promovió el crecimiento de *A. thaliana*, sino que le indujo resistencia o tolerancia a la sequía (Cho *et al.*, 2008). Otros COVs que se han identificado como promotores del crecimiento de *A. thaliana* son 2-etil 1-hexanol producido por las rizobacterias *Bacillus megaterium* y *Arthrobacter agilis*, el cual promovió la formación de raíces laterales (García-Juárez *et al.*, 2010). En otro estudio se reportó que la producción del compuesto 2-pentilfurano aumentó la biomasa de *A. thaliana* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

En general, *G. diazotrophicus* ha mostrado gran capacidad para ser inoculado con éxito en plantas como *A. thaliana* y promover su crecimiento (Eskin *et al.*, 2014). En el presente estudio una cepa relacionada con esta especie promovió el crecimiento de *A. thaliana*, sin embargo no por métodos directos, sino por métodos

indirectos como es la producción de COVs, por lo que sería de relevancia analizar el tipo de COVs que puede producir esta cepa, ya que se ha visto que los COVs activan las vías de producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocininas, ácido salicílico y brasinosteroides promoviendo el crecimiento de *A. thaliana* (Zhang, 2007).

En el presente trabajo no se tuvo el objetivo de evaluar la promoción del crecimiento de *A. thaliana* por la mezcla de varias bacterias. Sin embargo, durante el experimento, en una de las repeticiones creció una mezcla de varias de las cepas evaluadas de forma individual (*Variovorax* sp., *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) y *Kocuria* sp., tal vez mezcladas por error o por contaminación accidental). Esta mezcla promovió un 83% el crecimiento la raíz y un 94% el tallo de *A. thaliana* comparado con el control (Figura 12). De las cepas probadas de forma individual, sólo *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) promovió el crecimiento de *A. thaliana* bajo la misma condición (cajas con división), por lo que consideramos relevante reportarlo.



**Figura 12.** Efecto de la promoción del crecimiento de *A. thaliana* por la combinación de *Variovorax* sp., *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.) y *Kocuria* sp.

La presencia e interacción de más de una especie bacteriana puede potenciar la producción de algún compuesto promotor del crecimiento debido a su mutua estimulación, algo que no sucede cuando crecen de forma individual. Muchas

especies bacterianas regulan la producción de diversos compuestos mediante “*quorum sensing*”, un mecanismo de señalización que se puede activar cuando la bacteria interactúa con otros organismos o para regular su crecimiento poblacional (Gray & Smith, 2005; Czárán & Hoekstra, 2009).

Dias *et al.*, (2009) mencionan que la promoción del crecimiento de las plantas no necesariamente es impulsada por una sola especie, ya que en el ambiente éstas conviven con cientos de microorganismos que en conjunto estimulan el crecimiento de la planta mediante diversos métodos y compuestos, por lo que la elección de las bacterias con diferentes capacidades de promoción del crecimiento vegetal sería lo ideal para formar un consorcio que promueva este crecimiento.

También, como se mencionó anteriormente, las bacterias que promueven el crecimiento vegetal no necesariamente son las que mayor producen AIA, como se observó en este experimento. La estimulación del crecimiento de las plantas ocurre por la expresión de una o más características de las bacterias promotoras del crecimiento a través de mecanismos directos o indirectos y por diversos compuestos que promueven el crecimiento. Por lo que es de gran importancia que las bacterias se seleccionen *in vitro* buscando algún rasgo o característica como promotor del crecimiento vegetal y que después se evalúen en campo o en condiciones de invernadero para verificar su respuesta como promotora del crecimiento vegetal para que después puedan ser utilizadas en diversas aplicaciones biotecnológicas, como los biofertilizantes (Araújo & Guerreiro, 2010; Rana *et al.*, 2011).

Con respecto al ensayo de inoculación de las semillas de las tres especies de *Opuntia*. con distintas concentraciones de GA<sub>3</sub> y AIA, con la finalidad de comprobar si estas hormonas promueven su germinación, no se observó dicho efecto. Se ha reportado que en algunas cactáceas el GA<sub>3</sub> ha promovido su germinación (Sánchez-Venegas, 1997; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011; Ochoa *et al.*, 2015), así como el AIA (Chávez-Ambriz *et al.*, 2016), sin embargo, también se ha reportado que no se ha visto tal efecto en otras cactáceas, por lo que no existe un patrón claro del efecto de estas hormonas en la germinación de cactáceas (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011).

También, algunos autores han reportado que la aplicación de la hormona GA<sub>3</sub> en combinación con métodos mecánicos ha incrementado significativamente la germinación de *Opuntia* spp. (Sánchez-Venegas, 1997; Olvera-Carillo *et al.*, 2003; Orozco-Segovia *et al.*, 2007), atribuyéndole en ocasiones el incremento de la germinación al tratamiento químico o mecánico más que a las hormonas (Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011), ya que estos tratamientos también pueden promover o

incrementar la germinación de semillas con latencia fisiológica no profunda (Baskin & Baskin, 2004),

Las semillas de *Opuntia* spp. presentan una testa muy dura, lo que impide que el embrión pueda romperla y germinar, por lo que es necesario el desgaste de éstas mediante diversos métodos químicos o mecánicos para reducir la resistencia mecánica a la germinación (Delgado-Sánchez *et al.* 2010, 2011; Sánchez-Coronado *et al.*, 2011), dentro de los que destacan escarificación con ácido sulfúrico, escarificación mecánica, estratificación con frío, lixiviación, el paso a través del tracto digestivo de animales, remojo en agua caliente, largos períodos de almacenamiento (Mandujano *et al.*, 2005), o más recientemente el uso de microorganismos (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010; 2011; 2013). El uso de microorganismos, principalmente hongos, han incrementado significativamente la germinación de *Opuntia* spp. (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010; 2011; 2013) debido a que como crecen en la testa de las semillas pueden desgastarla, a través de la producción y acción de enzimas, reduciendo la resistencia mecánica a la germinación (Morpeth & Hall, 2000).

Esto puede explicar por qué se tuvo mayor porcentaje de germinación en las semillas que no se lavaron en comparación con las lavadas en las tres especies de *Opuntia*, lo cual está indicando que la microbiota de la testa está jugando un papel muy importante en la promoción de la germinación. Lavar las semillas elimina su microbiota la cuál puede ser muy importante en el desgaste de la testa, lo que disminuye la germinación (Delgado-Sánchez, *et al.*, 2011).

Otra posible explicación de los bajos porcentajes de germinación en semillas lavadas es que alguno de los compuestos utilizados en el lavado haya tenido una concentración muy alta que pudo haber dañado o matado el embrión, afectando directamente la germinación de estas especies. Cabe señalar que la prueba de tetrazolio indicó que el 98% de las semillas de las especies de *Opuntia* eran viables, por lo que el embrión de las semillas estaba vivo antes de realizar estos ensayos.

Por lo anterior, sería necesario realizar otras pruebas a las bacterias aisladas en este trabajo para detectar si producen algún compuesto que pueda desgastar la testa de las semillas, por ejemplo enzimas, así como combinarlo con otro tratamiento, por ejemplo físico o mecánico, para incrementar la germinación de las semillas.

## Conclusiones

Se comprobó la hipótesis de que bacterias endófitas de semillas y rizosféricas de *Opuntia* spp. pueden establecer interacciones interespecíficas positivas a través de la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* L., utilizada como planta modelo, posiblemente por la producción de fitohormonas (principalmente ácido indolacético) y compuestos orgánicos volátiles.

*Ensifer* (*Sinorhizobium* sp.) y *Endobacter* (*Gluconacetobacter* sp.), previamente identificadas como productoras de AIA, fueron las que promovieron el crecimiento de raíz y tallo de *A. thaliana*, lo cual se puede atribuir a la producción de AIA, a algún COV u otro compuesto promotor del crecimiento vegetal que no se identificó en el presente trabajo pero que sería relevante hacerlo para utilizarse en alguna aplicación biotecnológica. Además se identificó una cepa como *Burkholderia* sp. con capacidad para producir sideróforos, pudiendo ser capaz de promover el crecimiento vegetal e inhibir el crecimiento de fitopatógenos a través de este compuesto.

Las aplicación exógena de las fitohormonas AIA y GA<sub>3</sub> no promovió la germinación de las tres especies de *Opuntia*, pero si se observó un efecto del lavado de las semillas, lo que propone que su microbiota esta jugado un papel muy importante en el rompimiento de la latencia fisiológica de las semillas y por lo tanto, en su germinación.

## Bibliografía

- Acosta-Durán, C. & Martínez-Romero, E. (2002). Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Arch Microbiol* 178, 161-164.
- Aguilar, E. M. L.; C. Pérez Olvera, S. Pérez Olvera. (2004). La flora del escudo nacional mexicano. *Polibotánica*. 18, 53-73.
- Aguirre-Garrido, J. F., Montiel-Lugo, D., Hernández-Rodríguez, C., Torres-Cortes, G., Millán, V., Toro, N., Ramírez-Saad, H. C. (2012). Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(4), 891-904. <http://doi.org/10.1007/s10482-012-9705-3>.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <http://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>.
- Aldesuquy H, Mansour F, Abo-Hamed S (1998) Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiol (Praha)* 43, 465-470.
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K., Hasnain, S. (2009). Auxin production by plant associated bacteria: Impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5), 542–547. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02565.x>
- Ali, S., Charles, T. C., Glick, B. R. (2012). Delay of flower senescence by bacterial endophytes expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1139–1144. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05409.x.
- Ali, S., Charles, T. C., Glick, B. R., (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 160–167.
- Anitha, K. G., (2010). Enhancing seed germination of mono and dicotyledons through IAA production of PPFM Trends. *Soil Sci Plant Nutr* 1: 14-18.
- Apine, O. A., Jadhav, J. P. (2011). Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *J Appl Microbiol* 110, 1235-1244.
- Araújo, F. F., Guerreiro, R. T., (2010). Bioprospeção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciênc Agrotec*; 34(4), 837–44.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana. 2º edición. Barcelona.

- Barragán Reynaga, D. M., Bonilla Moreno, M., Cabrera Díaz, E., Cárdenas Ortega, A., Casas Solís, J., Claudio Gracia, L. E., (2010). *Microbiología: manual de prácticas*. Guadalajara, Jalisco. Editorial Universitaria: Universidad de Guadalajara.
- Bafana, A. (2012). Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World J Microb Biot* 29: 63–74.
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F., Long, S. R. (2004). A dual- genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote–host interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16636–16641.
- Bashan, Y., & De-Bashan, L. E. (2005). Bacteria/Plant growth-promotion. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 1, 103–115. <http://doi.org/10.1007/s00284-005-4584-8>.
- Bashan, Y., Khaosaad, T., Salazar, B. G., Ocampo, J. A., Wiemken, A., Oehl, F., Vierheilig, H., (2007). Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, Mexico. *Trees Struct. Funct.* 21: 329-335.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2013). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Baskin, C. C. & Baskin, J. M. (2014). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press Elsevier.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1). <http://doi.org/10.1079/SSR2003150>.
- Belimov, A. A., Dodd, I. C., Hontzeas, N., Theobald, J. C., Safronova, V. I., Davies, W. J. (2009). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling, 413–423.
- Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern), 37, 241–250. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.033>.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1994). *Seeds—physiology of development and germination*, 2nd edn. New York, NY, USA: Plenum Press.
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture, 1327–1350. <http://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>.
- Bravo-Hollis H. (1978). *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 743.
- Bravo-Hollis H. & Sánchez-Mejorada. 1991. *Las Cactáceas de México II*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 404.

- Carrillo-González, R., Šimunek, J., Sauvé, S., Adriano, D. (2006). Mechanisms and pathways of trace elements mobility in soils. *Adv Agron* 91: 112–178.
- Castro-González, R., Martínez-Aguilar, L., Ramírez-Trujillo, A., Estrada de los Santos, P., & Caballero-Mellado, J. (2011). High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 345(1), 155–169. <http://doi.org/10.1007/s11104-011-0768-0>.
- Celaya, M. H., Castellanos, V. A. E. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoam*. 2011; 29: 343-56.
- Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. *Applied Soil Ecology*, 95, 38–53. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>.
- Chen, B. G., Turner, L., Berg, H. C. (2007). The wetting agent required for swarming in *Salmonella enterica* serovar typhimurium is not a surfactant. *J Bacteriol*, 189(23): 8750-8753.
- Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y.H., Cho, B. H., Yang, K. Y., Ryu, C. M., Kim, Y. C. (2008). 2R, 3RButanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Inter* 21:1067–1075.
- Cline, W. R. (2007). *Global Warming and Agriculture: Impact Estimates by Country*. Washington, DC: Center for Global Development and Peterson Institute for International Economics.
- Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porrás-Alfaro, A., Stursova, M. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in arid land ecosystems. *J. Ecol.* 96: 413-420.
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J., Pinton, R., Cesco, S. (2014). Review on iron availability in soil : interaction of Fe minerals, plants , and microbes, 1, 538–548. <http://doi.org/10.1007/s11368-013-0814-z>.
- Compant, S., G. A. van der Heijden, M., Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73, 197–214.
- Czárán, T., Hoekstra, R. F. (2009). Microbial Communication, Cooperation and Cheating: Quorum Sensing Drives the Evolution of Cooperation in Bacteria. *PLoS ONE* 4 (8): e6655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006655>.
- Davies, P. (Ed). (1995). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Pág. 833. Dordrecht, Kluwer Acad. Press.
- Dastager, S. G., Deepa, C. K., Pandey, A. (2010). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 987–992. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.09.006>.

- De Boer, S. H. & Copeman, R. J. (1974). Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Can. J. Plant Sci.* 54: 115–122.
- De Carvalho Costa, E. F., & Soares De Melo, I. (2012). Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *African Journal of Microbiology Research*, 6(6), 1345–1353. <http://doi.org/10.5897/AJMR11.1503>.
- Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Guerrero-González, M. de la L., Flores, J. (2013). Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. *Journal of Plant Research*, 126(5), 643–649. <http://doi.org/10.1007/s10265-013-0558-2>.
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Jiménez-Bremont, J. F., Flores, J. (2011). Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology*, 13(1), 154–159. <http://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00333.x>.
- Delgado-Sánchez, P., Ortega-Amaro, M. A., Rodríguez Hernández, A. A., Jimenez-Bremont, J. F., Flores-Rivas, J. (2010). Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 1229–1230. <http://doi.org/10.1111/j.1438>.
- Deng, P., Wang, X., Baird, S. M., Showmaker, K. C., Smith, L., Peterson, D. G., & Lu, S. (2016). Comparative genome-wide analysis reveals that *Burkholderia contaminans* MS14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 5(3), 353–369. <http://doi.org/10.1002/mbo3.333>.
- Dighton, J., & Krumins, J. A. (2014). *Interactions in Soil: Promoting Plant Growth* (Vol. 1).
- Dias, A. C. F., Costa, F. E. C., Andreote, F. D., Lacava, P. T., Teixeira, M. A., Assumpção, L. C. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol* 2009; 25: 189–95.
- Doornbos, R. F., Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227–243. <http://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>.
- Dubrovsky, J. G., Puente, M. E., & Bashan, Y. (1994). *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *azospirillum brasilense* Sp-245 on root hair growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 26(12), 1657–1664. [http://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90318-2](http://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90318-2).
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J., & Weyens, N. (2015). Optimization of isolation and

- cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial Biotechnology*, 8(4), 707–715. <http://doi.org/10.1111/1751-7915.1229>.
- El-Tarably, K. A. (2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant Soil* 308:161–174.
- Eskin, N., Vessey, K., Tian, L., Eskin, N., Vessey, K., & Tian, L. (2014). Research Progress and Perspectives of Nitrogen Fixing Bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. *International Journal of Agronomy*, 2014, 1–13. <http://doi.org/10.1155/2014/208383>.
- Flores, J., Arredondo, A. Jurado, E. (2005). Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* 25: 183-187.
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination - Finch-Savage - 2006 - *New Phytologist* - Wiley Online Library. *The New Phytologist*, 171(3), 501–23. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01787.x>.
- Fosse, T., Peloux, Y., Granthil, C., Toga, B. Bertrando, J., Sethian, M. (1985). Meningitis due to *Micrococcus luteus*. *Infection*; 13: 280.281.
- Fu, X. & Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421: 740–743.
- García-Juárez, P., Altamirano-Hernández, J., López-Bucio, J., Valencia-, E. Macías-rodríguez, L. (2010). Efecto del perfil de compuestos volátiles de distintas rizobacterias en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, 12(1), 20–27.
- Germida, J. J., Siciliano, S. D., Freitas, J. R., Seib, A. M., (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 43–50.
- Gibson, A. C. & Nobel, P. S. (1986). *The Cactus Primer*. United States of America: Harvard University Press.
- Glick, B. R., (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, Article ID 963401.
- Glick, B. R., (2015). *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer, Heidelberg.
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., Thakker, J. N. (2014). Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 566–576. <http://doi.org/10.1080/17429145.2013.871650>.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1–19. <http://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>.

- Gubler F, Hughes T, Waterhouse P, Jacobsen J (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: Effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. *Plant Physiol* 147:886–896.
- Granados Sánchez, D. Hernández García, M. A. López Ríos, G. F. (2012). *Ecología de los desiertos del mundo*. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Gray, E. J. & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.*, 37, 395-412.
- Guzmán U. S. Arias, P. Dávila. (2003). *Catálogo de cactáceas mexicanas*. UNAM/CONABIO. México 315.
- Haney, C. H., Samuel, B. S., Bush, J., Ausubel, F. M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. *Nature Plants*, 1(6), 15051. <http://doi.org/10.1038/nplants.2015.51>.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Elsas, J. D. van. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16(10), 463–471. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>.
- Hottes, A.K., Meewan, M., Yang, D., Arana, N., Romero, P., McAdams, H.H., and Stephens, C. (2004) Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. *J Bacteriol* 186: 1448–1461.
- Howieson, J. G., Ewing, M. A. (1986). Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Aust J Agric Res* 1986; 37:55- 64.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579–598. <http://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>.
- Huber, H., & Prangishvili, D. (2006). *The Prokaryotes*. Genome. <http://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>.
- ISTA, (2005). *International rules for seed testing*. International Seed Testing Association. Bassersdorf, Switzerland: 243 pp.
- Jamieson, W. D., Pehl, M. J., Gregory, G. A., Orwin, P. M. (2009). Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. *BMC Microbiology*, 9(1), 124. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-9-124>.
- Kaur, C., Kaur, I., Raichand, R., Chandra Bora, T., Mayilraj, S. (2011). Description of a novel actinobacterium *Kocuria assamensis* sp. nov., isolated from water sample collected from the river Brahmaputra, Assam, India. *Current Microbiology*, 62(3), 1039–1043. <http://doi.org/10.1007/s00284-010-9822-z>.
- Kocur, M., Kloos., W. E., Schleifer, K. H. (2006). The Genus *Micrococcus*, in *Prokaryotes* 3: 961–971.
- Kovacs, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E., & Marialigeti, K. (1999). *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha*

- angustifolia). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 167–173. <http://doi.org/10.1099/00207713-49-1-167>.
- Lacava, P. T. & Azevedo, J. L. (2013). Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In Maheshwari, D. K., Sarah, M., Aeron, A. (eds) *Bacteria in agrobiological: crop productivity*. Springer. Berlin, pp 1-44.
- Lee, S., Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Garcia-Flores, L., Escamilla, J.E., Kennedy, C., (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in Cytochrome c biogenesis genes. *J. Bacteriol.* 186, 5384–5391.
- Lin, P. H., Su, S. C., Tsai, Y. C., Lee, C. Y. (2002). Identification and characterization of a new gene from *Variovorax paradoxus* Iso1 encoding N-acyl-D-amino acid amidohydrolase responsible for D-amino acid production. *European Journal of Biochemistry*, 269(19), 4868–4878. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03190.x>.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., & der Lelie, D. van. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583–606. <http://doi.org/10.1080/0735-260291044377>.
- Logeshwarn, P., Thangaraju, M., & Rajasundari, K. (2011). Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(3), 216–223. <http://doi.org/10.1080/03235400902952707>.
- López, B. R., Bashan, Y., Bacilio, M. (2011). Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology*, 193(7), 527–541. <http://doi.org/10.1007/s00203-011-0695-8>.
- Lucena, J. J. (2000). Effect of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. *Areview. J Plant. Nutr.* 23:1591–1606.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86.
- Mahmood, S., Maqshoof, N., Muhammad, A., Imran, M., Ahmad, Z., & David, Z. (2016). Relationship between in vitro characterization and comparative efficacy of plant growth - promoting rhizobacteria for improving cucumber salt tolerance. *Archives of Microbiology*, 198(4), 379–387. <http://doi.org/10.1007/s00203-016-1197-5>.
- Maimaiti, J. Y., et al. (2007). Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environ. Microbiol.* 9:435–444.
- Mandujano, M. C., Golubov, J., Rojas-Aréchiga, M., (2007). Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 52: 46-52.

- Majeed, A., Kaleem Abbasi, M., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>.
- Majzlik, P., Strasky, A., Adam, V., Nemeč, M., Trnkova, L., Zehnalek, J., et al. (2011) Influence of Zinc (II) and Copper (II) ions on *Streptomyces* bacteria revealed by electrochemistry. *Int J Electrochem Sci* 6: 2171–2191.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Daffonchio, D. (2012). A Drought Resistance-Promoting Microbiome Is Selected by Root System under Desert Farming, 7(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048479>.
- Márquez-Guzmán, J. Collazo Ortega, M. Martínez Gordillo, M. Orozco Segovia, A. Vázquez Santana, S. 2013. *Biología de las Angiospermas, La familia Cactaceae*. UNAM, México.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 489–503. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>.
- Marulanda, A., Barea, J. M., Azcon, R., (2009). Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environment. Mechanisms related to bacterial effectiveness. *J. Plant Growth Regu.* 28, 115–124.
- Maruwa Chimwamuombe, P., Lasse Grönemeyer, J., Reinhold-Hurek, B. (2016). Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), 1–11. <http://doi.org/10.1093/femsec/fiw083>.
- McInroy, J. A., Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173: 337–342.
- 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(5), 634–663. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>.
- Mengel, K., Kirkby, E., Kosegarten, H., Appel, T. (2001). Iron. In: Mengel K, Kirkby EA (eds) *Mineral nutrition*, 5th edn. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 553–571.
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110–121. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>.
- Mitsui, H., Sato, T., Sato, Y., Ito, N., Minamisawa, K. (2004). *Sinorhizobium meliloti* RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Molecular*

- Genetics and Genomics, 271(4), 416–425. <http://doi.org/10.1007/s00438-004-0992-x>.
- Montesinos, E. (2003) Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. *Int Microbiol* 6:221–223. doi: 10.1007/s10123-003-0141-0.
- Morpeth D.R., Hall A.M. (2000) Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* 'Laxa'. *Seed Science Research*, 10, 489–494
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Muñoz, E., Villadas, P. J. Toro, N. (2001). Ectopic transposition of a group II intron in natural bacterial populations. *Mol Microbiol* 41, 645–652.
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Arshad, M. (2009). Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt affected fields. *Can J Microbiol*; 55: 1302–9.
- Nakano, M. M., M. A. Marahiel, P. Zuber. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipo-peptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 170:5662-5668.
- Naveen Kumar, A. (2013). *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances*. Springer, India.
- Neilands, J. B. (1981) Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu Rev Nutr* 1:27–46.
- Nobel, P. S. (2002). *Cacti, Biology and Uses*. University California Press.
- Nobel, P. S. (2010). *Desert Wisdom/ Agaves and Cacti: CO<sub>2</sub>, Water, Climate Change*. NewYork, NY.
- Ochoa, M. J., González-Flores, L. M., Cruz-Rubio, J. M., Portillo, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2015). Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 17, 50–60.
- Olvera-Carillo, Y., Marquez-Guzman, J., Barradas, V., Sanchez-Coronado, E., & Orozco-Segovia, A. (2003). Germination of hard seed coated *Opuntia tomentosa* S D., cacti from the Mexico Valley. *J. Arid. Environ.*, 55, 29–42.
- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M. E., Gamboa De Buen, A., Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (2007). Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany*, 99(4), 581–592. <http://doi.org/10.1093/aob/mcm001>.
- Patil, N. B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S. S., Gunjal, A. B., Kapadnis, B. P. (2011). Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(1), 295–302. <http://doi.org/10.6088/ijes.00202010031>.

- Peña, V. C., B. M. Luna, C., J. A. Carranza, S. J. A. Reyes A., A. Flores. (2008). Morphological characterization of *Opuntia* spp.: A multivariate analysis. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 10: 1-10.
- Pij, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biology and Fertility of Soils*, 51(4), 403–415. <http://doi.org/10.1007/s00374-015-0996-1>.
- Potter, R. L., Petersen, J. L., Ueckert, D. N. (1984). Germination Responses of *Opuntia* spp. to Temperature , Scarification , and Other Seed Treatments. *Weed Science Society of America and Allen Press*, 32(1), 106–110.
- Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C. Y., & Lebsky, V. K. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 6(5), 629–642. <http://doi.org/10.1055/s-2004-821100>.
- Raaijmakers, J., Van de Sluis, L., KosterM, Bakker PAHM, Weisbeek, P. J., Schippers, B. (1995). Utilisation of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Can J Microbiol* 41:126–135.
- Ramírez-Bahena, M. H., Tejedor, C., Martín, I., Velázquez, E., Peix, A. (2013). *Endobacter medicaginis* gen. nov., sp. nov., isolated from alfalfa nodules in an acidic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART 5), 1760–1765. <http://doi.org/10.1099/ij.s.0.041368-0>.
- Rana A, Saharan B, Joshi M, Prasanna R, Kumar K, Nain L. (2011). Identification of multi- trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Ann Microbiol*; 61(4): 893–900.
- Reeve, W., Chain, P., O'Hara, G., Ardley, J., Nandesena, K., Bräu, L., Howieson, J. (2010). Complete genome sequence of the *Medicago* microsymbiont *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *medicae* strain WSM419. *Standards in Genomic Sciences*, 2(1), 77–86. <http://doi.org/10.4056/signs.43526>.
- Reeve, W., Tian, R., Bräu, L., Goodwin, L., Munk, C., Detter, C., Willems, A. (2014). Genome sequence of *Ensifer arboris* strain LMG 14919T; a microsymbiont of the legume *Prosopis chilensis* growing in Kosti, Sudan. *Standards in Genomic Sciences*, 9, 462–472. <http://doi.org/10.4056/sig>
- Reiter, B., Bürgmann, H., Burg, K., and Sessitsch, A. 2003. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can. J. Microbiol.* 49:549- 555.
- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene- reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J Microbiol* 27: 8–14.
- Reyes A., J A.; J. R. Aguirre-Rivera; F. Carlín C.; A. González D. (2009). Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Altiplanicie Meridional de México. UASLP, SAGARPA y CONACYT. San Luís Potosí, S.L.P. México. 350 pp.

- Rogel, M. A., Hernández-Lucas, I., Kuykendall, L. D., Balkwill, D. L. & Martínez-Romero, E. (2001). Nitrogen fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl Environ Microbiol* 67, 3264–3268.
- Rojas-Aréchiga, M., Ma. Aguilar, K., Golubov, J., Mandujano, M. C. (2011). Effect of Gibberellic Acid on Germination of Seeds of Five Species of Cacti From the Chihuahuan Desert, Northern Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 56(3), 393–400. <http://doi.org/10.1894/N01-DW-126.1>.
- Romo Campos, L., Flores Flores, J. L., Flores, J., & Álvarez Fuentes, G. (2010). Seed germination of *Opuntia* species from an aridity gradient in Central Mexico. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 181–198.
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 19(8), 827–837. <http://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Pare, P. W., Bais, H. P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol* 148:1547–1556
- Roos, I. M. M. & Hattingh, M. J. (1983). Scanning electron microscopy *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet cherry leaves. *Phytopathol. Z.* 108,18–25.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications, 278, 1–9. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>
- Ryu, C. M., Farag, M. a, Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4927–32. <http://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.
- Rzedowski, J. (2006). Relaciones geográficas y posibles orígenes de la flora. En *La vegetación de México*. CONABIO. Primera edición digital.
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2015). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>.
- Sahin, F., Cakmacki, R., Kantar, F. (2004). Sugarbeet and barley in relation to inoculation with nitrogen fixing and phosphate solubilising bacteria. *Plant Soil* 265:123–129.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Saeed, A. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture, 635–648. <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0240-6>.
- Salkowski, E. (1885). Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus. *Z. Physiol. Chem.* 9: 23–33.

- Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M., Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of *Vitis vinifera* retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in in vitro cultured grapevine. *Physiologia Plantarum*, 151(4), 359–374. <http://doi.org/10.1111/ppl.12117>.
- Sánchez-Venegas, G. (1997). Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma Cuaresmero. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 42:16-21.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92–99. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.
- Scholla, M. H. & Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 34, 484–486.
- Schwyn, B. & Neilands, J. (1987). Universal chemical assays for the detection and determination of siderophores. *Analy. Biochem*, 160: 47-56.
- Scott, R. I., Chard, J. M., Hocart, M. J., Lennard, J. H., Graham, D. C. (1996). Penetration of potato tuber lenticels by bacteria in relation to biological control of blackleg disease. *Potato Res.* 39, 333–344.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., Yamaguchi, S., 2009. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol.* 69, 463–472.
- Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Al-Hosni, K., Kang, S. M., Seo, C. W., & Lee, I. J. (2017). Indoleacetic acid production and plant growth promoting potential of bacterial endophytes isolated from rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *Acta Biologica Hungarica*, 68(2), 175–186. <http://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.5>.
- Sivaji, M., Vinoth, R., Tamilkumar, P., Kumar, S. S., Chandrasekar, A., & Syamala, M. (2016). Isolation and characterization of plant growth promoting *Burkholderia* spp. *International Journal of Plant Protection*, 9(1), 223–229. <http://doi.org/10.15740/HAS/IJPP/9.1/223-229>.
- Smith, D., S. Alvey, D. E. Crowley. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53:265–273.
- Soberon, J., Golubov, J., Sarukhán, J. (2001). The Importance of *Opuntia* in Mexico and Routes of Invasion and Impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) Author (s): J. Soberon, J. Golubov, J. Sarukhán. Source: *The Florida Entomologist*, Vol. 84, No. 4 (Dec, 2001), pp., 84(4), 486–492.
- Sørensen, J., Sessitsch, A., (2015). Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In: van Elsas, J. D., et al. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. 2nd edn. CRC Press, 2006, pp. 211–236.

- Sokolova, M. G., Akimova, G. P., Vaishlya, O. B. (2011). Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), 274–278. <http://doi.org/10.1134/S0003683811030148>
- Sorty, A. M., Meena, K. K., Choudhary, K., Bitla, U. M., Minhas, P. S., Krishnani, K. K. (2016). Effect of Plant Growth Promoting Bacteria Associated with Halophytic Weed (*Psoralea corylifolia* L) on Germination and Seedling Growth of Wheat Under Saline Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(5), 872–882. <http://doi.org/10.1007/s12010-016-2139-z>.
- Sounhami, L. Feld, R. Tuffnel PG, Feller T. (1979). *Micrococcus luteus* pneumonia: case report and review of the literature, *Med Pediatr Oncol*, 7: 309-314.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), 1–13. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>.
- Sridevi, M., Yadav, N., Mallaiah, K. (2008). Production of indole- acetic-acid by *Rhizobium* isolates from *Crotalaria* species. *Res. J. Microbiol.* 3: 276–281.
- Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., & Schumann, P. (1996). Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 366–366. <http://doi.org/10.1099/00207713-46-1-366>.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G. (1998). Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Can. J. Microbiol.* 44:162–167.
- Sturz, A. V., & Kimpinski, J. (2004). Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant and Soil*, 262(1–2), 241–249. <http://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000037046.86670.a3>.
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., Bailey, J. F., Morra, M. (2002). Novel plant- microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* 68:2161–2171.
- Tyler, H. L. & Triplett, E. W. (2008). Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 46: 53–73.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moenne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dye, F. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4, 356.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth- promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119: 243–254.
- Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez, LI., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Flores-Cortez, I., Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies

- dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil* 339: 329–340. doi:10.1007/s11104-010-0583-z.
- Villegas-Espinoza, J., Rueda-Puente, E., Murillo-Amador, B., Puente, M., Ruiz-Espinoza, H., Zamora-Salgado, S., Beltran, F. (2014). Bacterias promotoras de crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina). Stunz \* Native plant growth promoting bacteria and their effect on *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz Resumen Introducción. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 1041–1053.
- Vijaya Kumar, V. (2016). Plant Growth-Promoting Microorganisms: Interaction with Plants and Soil. in *Plant, Soil and Microbes*. K.R. Hakeem et al. (eds.). Springer. Switzerland.
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B. & Martínez-Romero, E. (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1687–1693.
- Wang, Q., Dodd, I. C., Belimov, A. A., Jiang, F. (2016). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na<sup>+</sup> accumulation. *Function. Plant Biol* 43: 161–172.
- Willems, A., De Ley, J., Gillis, M., Kersters, K., (1991). Comamonadaceae, a new family encompassing the Acidovorans rRNA complex, including *V. paradoxus* gen. nov., comb. nov., for *Alcaligenes paradoxus* (Davis 1969). *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 445–450.
- Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Gillis, M. (2003). Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1207–1217. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.02264-0>.
- Xu, J., Li, X-L., Luo, L. (2012). Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress. *Appl Environ Microbiol* 78:8056–8061.
- Yamaguchi, S., (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Ann Rev Plant Biol*. 59, 225–251.
- Yan, A. M., Wang, E. T., Kan, F. L., Tan, Z. Y. (2017). *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China, (2000), 1887–1891.
- Yang, J., Kloepper, J. W., Ryu, C. (2008). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1–4.

- Yuan, C. L., Mou, C. X., Wu, W. L., Guo, Y. Bin. (2011). Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 322–329. <http://doi.org/10.1007/s11368-010-0315-2>.
- Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S., Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta* 226:839–851.
- Zhao, G. Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y. Q., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., Li, W. J. (2009). *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2383–2387. <http://doi.org/10.1099/ijs.0.010256-077>.
- Zhou, D., Huang, X. F., Chaparro, J. M., Badri, D. V., Manter, D. K., Vivanco, J. M., Guo, J. (2016). Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant and Soil*, 401(1–2), 259–272. <http://doi.org/10.1007/s11104-015-2743-7>.

## Anexo

Análisis de varianza del efecto del lavado de las semillas y de la aplicación del ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en la germinación de las tres especies de *Opuntia*.

	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
<b>Intercepto</b>	1	24864.29	24864.29	352.0112	0.000000
<b>Especies de Opuntia</b>	2	36461.90	18230.95	258.1011	0.000000
<b>Semillas lavadas/ semillas no lavadas</b>	1	16229.37	16229.37	229.7640	0.000000
<b>Diferente [GA<sub>3</sub>]</b>	6	252.38	42.06	0.5955	0.733096
<b>Especies de Opuntia * Semillas lavadas/ semillas no lavadas</b>	2	21944.44	10972.22	155.3371	0.000000
<b>Especies de Opuntia * Diferente [GA<sub>3</sub>]</b>	12	738.10	61.51	0.8708	0.579022
<b>Semillas lavadas/ semillas no lavadas * Diferente [GA<sub>3</sub>]</b>	6	242.86	40.48	0.5730	0.750737
<b>Especies de Opuntia * Semillas lavadas/ semillas no lavadas * Diferente [GA<sub>3</sub>]</b>	12	833.33	69.44	0.9831	0.471645
<b>Error</b>	84	5933.33	70.63		
<b>Total</b>	125	82635.71			

Niveles del factor	Nivel del factor	Nivel del factor	N	% germinación	Desviación estándar	Error estándar
			126	14.05	25.71	2.29
<b>O. streptacantha</b>			42	38.10	32.93	5.08
<b>O. robusta</b>			42	2.62	5.44	0.84
<b>O. leucotricha</b>			42	1.43	3.54	0.55
<b>Semillas no lavadas</b>			63	25.40	32.12	4.05
<b>Semillas lavadas</b>			63	2.70	6.27	0.79
<b>[0] de GA<sub>3</sub></b>			18	14.44	27.06	6.38
<b>[25] de GA<sub>3</sub></b>			18	15.00	29.75	7.01
<b>[50] de GA<sub>3</sub></b>			18	11.67	22.82	5.38
<b>[100] de GA<sub>3</sub></b>			18	15.00	28.75	6.78
<b>[250] de GA<sub>3</sub></b>			18	12.78	21.09	4.97
<b>[500] de GA<sub>3</sub></b>			18	16.11	26.82	6.32

[1000] de GA <sub>3</sub>		18	13.33	26.79	6.31
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	21	68.10	16.01	3.49
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	21	8.10	8.73	1.90
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	21	5.24	6.80	1.48
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	21	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	21	2.86	4.63	1.01
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	21	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	[0] de GA <sub>3</sub>	6	40.00	35.78	14.61
<b>O. streptacantha</b>	[25] de GA <sub>3</sub>	6	43.33	39.33	16.06
<b>O. streptacantha</b>	[50] de GA <sub>3</sub>	6	33.33	30.11	12.29
<b>O. streptacantha</b>	[100] de GA <sub>3</sub>	6	41.67	38.69	15.79
<b>O. streptacantha</b>	[250] de GA <sub>3</sub>	6	31.67	28.58	11.67
<b>O. streptacantha</b>	[500] de GA <sub>3</sub>	6	41.67	34.30	14.00
<b>O. streptacantha</b>	[1000] de GA <sub>3</sub>	6	35.00	38.86	15.86
<b>O. robusta</b>	[0] de GA <sub>3</sub>	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. robusta</b>	[25] de GA <sub>3</sub>	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	[50] de GA <sub>3</sub>	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	[100] de GA <sub>3</sub>	6	3.33	5.16	2.11
<b>O. robusta</b>	[250] de GA <sub>3</sub>	6	3.33	5.16	2.11
<b>O. robusta</b>	[500] de GA <sub>3</sub>	6	5.00	8.37	3.42
<b>O. robusta</b>	[1000] de GA <sub>3</sub>	6	5.00	8.37	3.42
<b>O. leucotricha</b>	[0] de GA <sub>3</sub>	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. leucotricha</b>	[25] de GA <sub>3</sub>	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. leucotricha</b>	[50] de GA <sub>3</sub>	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. leucotricha</b>	[100] de GA <sub>3</sub>	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[250] de GA <sub>3</sub>	6	3.33	5.16	2.11
<b>O. leucotricha</b>	[500] de GA <sub>3</sub>	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. leucotricha</b>	[1000] de GA <sub>3</sub>	6	0.00	0.00	0.00
<b>Semillas no lavadas</b>	[0] de GA <sub>3</sub>	9	25.56	35.04	11.68
<b>Semillas no lavadas</b>	[25] de GA <sub>3</sub>	9	26.67	39.05	13.02
<b>Semillas no lavadas</b>	[50] de GA <sub>3</sub>	9	21.11	29.77	9.92
<b>Semillas no lavadas</b>	[100] de GA <sub>3</sub>	9	27.78	37.01	12.34
<b>Semillas no lavadas</b>	[250] de GA <sub>3</sub>	9	22.22	26.35	8.78
<b>Semillas no lavadas</b>	[500] de GA <sub>3</sub>	9	27.78	33.46	11.15
<b>Semillas no lavadas</b>	[1000] de GA <sub>3</sub>	9	26.67	33.54	11.18

<b>Semillas lavadas</b>		[0] de GA <sub>3</sub>	9	3.33	7.07	2.36
<b>Semillas lavadas</b>		[25] de GA <sub>3</sub>	9	3.33	7.07	2.36
<b>Semillas lavadas</b>		[50] de GA <sub>3</sub>	9	2.22	4.41	1.47
<b>Semillas lavadas</b>		[100] de GA <sub>3</sub>	9	2.22	4.41	1.47
<b>Semillas lavadas</b>		[250] de GA <sub>3</sub>	9	3.33	7.07	2.36
<b>Semillas lavadas</b>		[500] de GA <sub>3</sub>	9	4.44	10.14	3.38
<b>Semillas lavadas</b>		[1000] de GA <sub>3</sub>	9	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	70.00	20.00	11.55
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	76.67	20.82	12.02
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	60.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	76.67	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	53.33	23.09	13.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	70.00	17.32	10.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	70.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	10.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	10.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	6.67	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	6.67	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	10.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	13.33	15.28	8.82
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	6.67	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	6.67	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	10.00	10.00	5.77
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	10.00	10.00	5.77

<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas Semillas no lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	6.67	5.77	3.33
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[0] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[25] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[50] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[100] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[250] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[500] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[1000] de GA <sub>3</sub>	3	0.00	0.00	0.00

**Análisis de varianza del efecto del lavado de las semillas y de la aplicación del ácido indolacético (AIA) en la germinación de las tres especies de *Opuntia*.**

	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P
<b>Intercepto</b>	1	3050.79	3050.794	87.36364	0.000000
<b>Especies de Opuntia</b>	2	4220.63	2110.317	60.43182	0.000000
<b>Semillas lavadas/ semillas no lavadas</b>	1	2314.29	2314.286	66.27273	0.000000
<b>Diferente [AIA]</b>	6	1182.54	197.090	5.64394	0.000058
<b>Especies de Opuntia * Semillas lavadas/ semillas no lavadas</b>	2	3014.29	1507.143	43.15909	0.000000
<b>Especies de Opuntia * Diferente [GA<sub>3</sub>]</b>	12	1779.37	148.280	4.24621	0.000032
<b>Semillas lavadas/ semillas no lavadas * Diferente [AIA]</b>	6	807.94	134.656	3.85606	0.001905
<b>Especies de Opuntia * Semillas lavadas/ semillas no lavadas * Diferente [AIA]</b>	12	1096.83	91.402	2.61742	0.005155
<b>Error</b>	84	2933.33	34.921		
<b>Total</b>	125	17349.21			

Nivel del factor	Nivel del factor	Nivel del factor	N	% de germinación	Desviación estándar	Error estándar
			126	4.92	11.78	1.05
<b>O. streptacantha</b>			42	13.10	17.18	2.65
<b>O. robusta</b>			42	1.19	3.95	0.61
<b>O. leucotricha</b>			42	0.48	3.09	0.48
<b>Semillas no lavadas</b>			63	9.21	15.27	1.92
<b>Semillas lavadas</b>			63	0.63	3.04	0.38
<b>[0] de AIA</b>			18	7.78	13.96	3.29
<b>[25] de AIA</b>			18	7.78	14.78	3.48
<b>[50] de AIA</b>			18	7.78	15.92	3.75
<b>[100] de AIA</b>			18	6.67	14.95	3.52
<b>[250] de AIA</b>			18	2.78	5.75	1.35
<b>[500] de AIA</b>			18	0.56	2.36	0.56
<b>[1000] de AIA</b>			18	1.11	4.71	1.11
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas		21	24.29	17.77	3.88

<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	21	1.90	5.12	1.12
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	21	2.38	5.39	1.18
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	21	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	21	0.95	4.36	0.95
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	21	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	[0] de AIA	6	18.33	19.41	7.92
<b>O. streptacantha</b>	[25] de AIA	6	20.00	20.00	8.16
<b>O. streptacantha</b>	[50] de AIA	6	23.33	20.66	8.43
<b>O. streptacantha</b>	[100] de AIA	6	18.33	22.29	9.10
<b>O. streptacantha</b>	[250] de AIA	6	6.67	8.16	3.33
<b>O. streptacantha</b>	[500] de AIA	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. streptacantha</b>	[1000] de AIA	6	3.33	8.16	3.33
<b>O. robusta</b>	[0] de AIA	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. robusta</b>	[25] de AIA	6	3.33	8.16	3.33
<b>O. robusta</b>	[50] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	[100] de AIA	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. robusta</b>	[250] de AIA	6	1.67	4.08	1.67
<b>O. robusta</b>	[500] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	[1000] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[0] de AIA	6	3.33	8.16	3.33
<b>O. leucotricha</b>	[25] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[50] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[100] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[250] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[500] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	[1000] de AIA	6	0.00	0.00	0.00
<b>Semillas no lavadas</b>	[0] de AIA	9	14.44	17.40	5.80
<b>Semillas no lavadas</b>	[25] de AIA	9	14.44	18.78	6.26
<b>Semillas no lavadas</b>	[50] de AIA	9	13.33	20.62	6.87
<b>Semillas no lavadas</b>	[100] de AIA	9	13.33	19.36	6.45
<b>Semillas no lavadas</b>	[250] de AIA	9	5.56	7.26	2.42
<b>Semillas no lavadas</b>	[500] de AIA	9	1.11	3.33	1.11
<b>Semillas no lavadas</b>	[1000] de AIA	9	2.22	6.67	2.22
<b>Semillas lavadas</b>	[0] de AIA	9	1.11	3.33	1.11
<b>Semillas lavadas</b>	[25] de AIA	9	1.11	3.33	1.11

lavadas						
<b>Semillas lavadas</b>	[50] de AIA		9	2.22	6.67	2.22
<b>Semillas lavadas</b>	[100] de AIA		9	0.00	0.00	0.00
<b>Semillas lavadas</b>	[250] de AIA		9	0.00	0.00	0.00
<b>Semillas lavadas</b>	[500] de AIA		9	0.00	0.00	0.00
<b>Semillas lavadas</b>	[1000] de AIA		9	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[0] de AIA	3	33.33	15.28	8.82
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[25] de AIA	3	36.67	11.55	6.67
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[50] de AIA	3	40.00	10.00	5.77
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[100] de AIA	3	36.67	15.28	8.82
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[250] de AIA	3	13.33	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[500] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas no lavadas	[1000] de AIA	3	6.67	11.55	6.67
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[0] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[25] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[50] de AIA	3	6.67	11.55	6.67
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[100] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[250] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[500] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. streptacantha</b>	Semillas lavadas	[1000] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[0] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[25] de AIA	3	6.67	11.55	6.67
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[50] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[100] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[250] de AIA	3	3.33	5.77	3.33
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[500] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas no lavadas	[1000] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[0] de AIA	3	0.00	0.00	0.00

<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[25] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[50] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[100] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[250] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[500] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. robusta</b>	Semillas lavadas	[1000] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[0] de AIA	3	6.67	11.55	6.67
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[25] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[50] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[100] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[250] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[500] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas no lavadas	[1000] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[0] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[25] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[50] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[100] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[250] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[500] de AIA	3	0.00	0.00	0.00
<b>O. leucotricha</b>	Semillas lavadas	[1000] de AIA	3	0.00	0.00	0.00