



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL

CIIDIR MICHOACÁN



INDUCCIÓN DEL DESARROLLO VEGETAL DE
Euphorbia antisiphilitica MEDIANTE *Bacillus* sp

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN:
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

Presenta:

MARTHA GEORGINA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

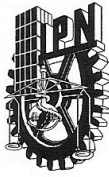
Director de tesis

DR. CARLOS VÍCTOR MUÑOZ RUIZ

Codirector de tesis

DR. FRANCISCO COVARRUBIAS VILLA

Jiquilpan de Juárez, Michoacán, Diciembre 2012.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 10:00 horas del día 12 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

“Inducción del desarrollo vegetal de *Euphorbia antisiphilitica* mediante *Bacillus sp.*”

Rodríguez	Hernández	Martha Georgina
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre
Con registro:		
B	1	0
1	0	1
5	2	1

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruíz

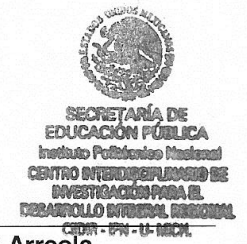
Dr. Francisco Covarrubias Villa.

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dra. María de Jesús Perea Flores

Dr. Guillermo Herrera Arreola.
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 28 del mes Noviembre del año 2012, el (la) que suscribe Martha Georgina Rodríguez Hernández alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable con número de registro B101521, adscrito a C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán, manifiesta que son autores (as) intelectuales del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruiz y Dr. Francisco Covarrubias Villa y cede los derechos del trabajo intitulado “Inducción del desarrollo vegetal de *Euphorbia antisiphilitica* mediante *Bacillus* sp”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección cvmunoz@ipn.mx, pancheco@prodigy.net.mx y martha_georginar@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MARTHA G. RODRIGUEZ HERNANDEZ.
Martha Georgina Rodríguez Hernández

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado en la beca de estudio a partir del año 2010 desde el ingreso al Centro de Investigación CIIDIR-Unidad Michoacán, con la cual he podido realizar mis estudios de posgrado hasta su término.

Al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) por el apoyo durante la realización de esta investigación.

A la Fundación San Ignacio de Loyola, en especial al Padre Víctor Manuel Verdín y al Padre Luis Ramón Avitia por su confianza y apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Del mismo modo agradezco al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán por permitirme desarrollarme profesionalmente durante el periodo de formación como investigadora dentro de sus instalaciones, así como al personal que en él labora.

Además extiendo mi agradecimiento al Centro Universitario de la Ciénega de la Universidad de Guadalajara (CUCI de la U. de G.), así como al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional (CNMA del IPN) por permitirme desarrollar parte de mi investigación dentro de sus instalaciones.

Quiero agradecer principalmente al Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruiz por haber dirigido mi proyecto de maestría y por el apoyo otorgado durante estos años.

Así mismo quiero agradecer a aquellas personas involucradas en el desarrollo de esta investigación, al Dr. Francisco Covarrubias Villa por su apoyo y contribución en esta investigación así como en mi formación profesional y por aceptar ser el Co-director de este proyecto, a la Dra. Hortencia G. Mena Violante y la Dra. María Valentina Angoa Pérez por sus consejos y apoyo constante, muchas gracias.

De la misma manera también extendiendo mi agradecimiento a la M.C. Guadalupe Oyoque Salcedo por todos estos años de amistad, por sus consejos y apoyo incondicional.

A Eréndira Jazmín Medellín por su amistad y haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco también al M.C. Daniel Rojas Bravo y al Ing. Juan José Solís Magaña por el apoyo brindado en la realización de una parte importante de mi trabajo de investigación.

Asimismo, agradezco a los investigadores: Dra. María de Jesús Perea Flores, M.C. Luis Alberto Moreno Ruiz, M.C. Claudia Jazmín Ramos Torres y el Ing. Alberto Peña Barrientos, por su amistad y colaboración durante mi estancia en el laboratorio y permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigador.

Gracias también a mis compañeros, que me permitieron entrar en sus vidas durante estos dos años y de convivir dentro y fuera del salón de clase.

DEDICATORIA

A Dios por brindarme apoyo para alcanzar todas mis metas.

A mí Mamá por darme apoyo en los momentos difíciles y por infundirme paciencia cuando creí que esto no sería posible.

A mí Papa por darme el ejemplo de no desfallecer y luchar por lo que se quiere.

A mis hermanos por su apoyo y todo lo que aprendo y comparto con ellos día a día.

A mis tíos por la confianza y apoyo constante a pesar de la distancia.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Condiciones socioeconómicas	8
2.2. Caracterización biológica de la Candelilla	11
2.3. Microorganismos asociados a los tejidos vegetales	15
2.4. Objetivo	20
2.4.1. Objetivos específicos	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Determinar las condiciones socioeconómicas de la explotación de la Candelilla	21
3.2. Contrastación de la emergencia de tallos de Candelilla a partir de rizoma con o sin tallos en condiciones de invernadero	22
3.3. Aislamiento de bacterias endofíticas del género <i>Bacillus</i> sp	24
3.4. Selección de bacterias promotoras de crecimiento	25
3.5. Propagación <i>in vitro</i> de la Candelilla (1)	26
3.6. Propagación <i>in vitro</i> de la Candelilla (2)	27
3.7. Asociación bacteria-planta	27
3.8. Estudio de la microestructura de la planta de Candelilla y de las bacterias promotoras de crecimiento	28
3.9. Contrastación mediante microscopia Raman de las diferencias de composición de la cutícula en la planta de Candelilla <i>in vitro</i>	31

4. RESULTADOS	32
4.1. Determinar las condiciones socioeconómicas de la explotación de la Candelilla	32
4.2. Contrastación de la emergencia de tallos de Candelilla a partir de rizoma con o sin tallos en condiciones de invernadero	33
4.3. Contrastación de la emergencia de tallos de Candelilla a partir de rizoma con o sin tallos en condiciones de invernadero	34
4.4. Selección de Bacterias promotoras de Crecimiento	35
4.5. Propagación <i>in vitro</i> de la Candelilla (1)	37
4.6. Propagación <i>in vitro</i> de la Candelilla (2)	36
4.7. Asociación bacteria-planta	40
4.8. Estudio de la microestructura de la planta de Candelilla y de las bacterias promotoras de crecimiento	41
4.9. Contrastación mediante microscopia Raman de las diferencias de composición de la cutícula en la planta de Candelilla <i>in vitro</i>	44
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
6. CONCLUSIONES	53
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la Candelilla	12
Figura 2. Planta de Candelilla (<i>Euphorbia antisyphilitica</i>)	13
Figura 3. Candelilleros en el proceso de la extracción de la cera de Candelilla y jóvenes de La Constancia (Parras, Coahuila)	22
Figura 4. Rizomas	23
Figura 5. Crecimiento de la planta de Candelilla después de un año de desarrollo en el invernadero	33
Figura 6. Número de tallos emitidos en los diferentes tratamientos después de un año de desarrollo en el invernadero	34
Figura 7. Desarrollo y aislamiento de bacterias promotoras de Crecimiento en medio DF	35
Figura 8. Concentraciones de AIA producido por las cepas bacterianas aisladas de la planta de Candelilla. Los valores con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente a $P \leq 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey (n=3)	37
Figura 9. A.-Medio MS al 10% de su formulación. B.- Medio MS al 100% de su formulación	38
Figura 10. Obtención de yemas apicales y laterales, medio MS a base de sales y carbón activado	39
Figura 11. A.-Cultivo de yemas apicales y laterales sin carbón activado B.-Obtención de plántulas de Candelilla aseptizada y con raíces	39
Figura 12. Plántulas inoculadas con 100 μ L de bacterias C5+ y C7- con una concentración de 1×10^8 UFC/mL. B.-Plántulas inoculadas con 10 μ L de bacterias. C5+ y C7- con una concentración de 1×10^8 UFC/mL	40

Figura 13.	<i>Bacillus</i> sp esporulados en la raíz de la Candelilla <i>in vitro</i> , tinción mediante la técnica de Gram (1000X)	41
Figura 14.	Conducto laticífero en corte transversal de tallo de Candelilla <i>in vitro</i> . Tinción con verde rápido (400X)	42
Figura 15.	A.- (Testigo) (1000X) Escasa capa de cera en la superficie de la cutícula del tallo de Candelilla. B.- (C7-) (1000X) y C.- (C5+) (500X) Mayor presencia de cera en la superficie de la cutícula de los tallos de Candelilla, en las plantas inoculadas	43
Figura 16.	Estructura química de la cera de Candelilla por espectroscopia Raman	44
Figura 17.	Gráfica de la intensidad de cera y presencia del doblete en el testigo (sin inóculo bacteriano) de la plántula de Candelilla <i>in vitro</i>	45
Figura 18.	Gráfica de la intensidad de cera y presencia del somero doblete en la plántula de Candelilla <i>in vitro</i> inoculada con la cepa 5+	46
Figura 19.	Gráfica de la intensidad de cera y presencia del somero doblete en la plántula de Candelilla <i>in vitro</i> inoculada con la cepa 7-	46
Figura 20.	A.-Estoma de la plántula de Candelilla cultivada <i>in vitro</i> , testigo (sin inóculo bacteriano). B.-Estoma de la plántula de Candelilla cultivada <i>in vitro</i> , inoculada con la cepa 5+. C.-Estoma de la plántula de Candelilla cultivada <i>in vitro</i> , inoculada con la cepa 7-	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Composición de la cera de Candelilla	15
Cuadro 2.	Composición química y fisicoquímica de la composta	23
Cuadro 3.	Tratamientos	23
Cuadro 4.	Promedio de temperaturas en el invernadero	24
Cuadro 5.	Medición del diámetro de las colonias bacterianas desarrolladas	36

Resumen

Los pobladores del desierto de Chihuahua en el norte de México, explotan a la planta de Candelilla (*Euphorbia antisiphilitica* Zucc.), planta endémica de este desierto. El estado de Coahuila, es el mayor productor de la cera de Candelilla, la cual es apreciada y demandada por diversas industrias transnacionales. La colecta de la Candelilla implica la extracción de la planta con sus raíces, además la planta requiere un desarrollo de aproximadamente cinco años para alcanzar el tamaño de su cosecha. Actualmente la densidad poblacional de la Candelilla ha disminuido significativamente. Por estas razones, se requiere investigar diversos aspectos sobre la propagación de la planta de la Candelilla para lograr una explotación sustentable de este importante recurso en esta región.

Parte del objetivo de este trabajo fue el corroborar la relevancia que representa la explotación de la Candelilla para los habitantes del desierto de Chihuahua. A la par, se realizó un ensayo en invernadero durante un año de evaluación determinándose la capacidad de la planta de desarrollar tallos a partir de su rizoma. Otra etapa del estudio se centró en el efecto de las bacterias endofíticas en el crecimiento de la Candelilla, por lo que se aislaron bacterias del género *Bacillus* sp de los tejidos internos de la Candelilla. Estos *Bacillus* sp se evaluaron como bacterias promotoras del crecimiento vegetal mediante su capacidad de adaptación y desarrollo en el medio DF (Doworkin y Foster), valorando su capacidad de producción de ácido indol acético, empleando el procedimiento colorimétrico de Salkowski.

Además se estableció una metodología para propagar *in vitro* a la planta de Candelilla. Para ello, se evaluaron dos procedimientos para la desinfección de los explantes de Candelilla. Así mismo se determinó, la capacidad de establecimiento y el desarrollo de explantes de la Candelilla, en diferentes variantes del medio Murashige y Skoog 5519.

Una vez que se obtuvieron, las plantas de Candelilla propagadas *in vitro*, se inocularon con las cepas de *Bacillus* sp aisladas, y mediante microscopia óptica fueron identificadas las estructuras secretoras de la cera y la morfología aracterística

de las bacterias del género *Bacillus* sp. Posteriormente por espectroscopia Raman, se identificó una posible mayor acumulación de cera en el exterior de la cutícula de las plántulas inoculadas con *Bacillus* sp.

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes: la explotación de la planta de la Candelilla es una actividad económica, esencial para los habitantes del desierto de Chihuahua. La Candelilla no se propaga por medio de sus raíces. Los explantes para el cultivo de tejidos la Candelilla requieren de una desinfección profunda para inhibir microorganismos incluidos entre sus capas de cera. Para propagar a la planta de Candelilla requiere la adición de carbón activado al medio Murashige Skoog. Con los inóculos de *Bacillus* sp de 10 µL, en concentración de 1×10^8 UFC / mL se pudo apreciar la asociación bacteriana con las raíces de plantas cultivadas *in vitro*. Posiblemente, es a través de los conductos laticíferos que la cera de la Candelilla llega a las estomas para ser secretada. Los cambios fisiológicos inducidos por *Bacillus* sp habitando endofíticamente promueven la secreción de cera de Candelilla.

Palabras clave: *Euphorbia antisyphilitica*, *Bacillus* sp, propagación *in vitro*, bacterias endofíticas, producción de cera, propagación en invernadero, microscopía óptica, espectroscopia Raman.

Abstract

In northern Mexico, people exploit the Candelilla plant (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.) only found in the Chihuahua desert. Coahuila state is the biggest Candelilla wax producer. Candelilla wax is valued and demanded by various international industries. The collection of Candelilla includes the removal of the plant with its roots and the plant takes approximately five years to achieve the harvest size. Nowadays Candelilla population has decreased significantly. For these reasons it is necessary to reforest the Chihuahua desert with the Candelilla plant.

Part of this study was designed to corroborate how important it is to exploit the Candelilla for Chihuahua desert residents. Besides, during a year in a green house test the capacity of the Candelilla plant roots to growth was observed. Another stage of the study focused on the effect of endophytic bacteria in the Candelilla growth. For this purpose isolates of *Bacillus* sp were made from the inner tissues of Candelilla plants. These *Bacillus* sp were evaluated as plant growth promoting bacteria by growth on Dworkin and Foste medium. Furthermore these *Bacillus* were tested for their production capacity of indol acetic acid, employing the Salkowski colorimetric procedure.

In addition Candelilla plant tissue culture was made. For this, different ways to disinfecting Candelilla explants were evaluated. Also the capacity of explants of Candelilla plant, on different variants of Murashige and Skoog 5519 medium was tested.

Once obtained, *in vitro* Candelilla plants were inoculated with the strains of isolated *Bacillus* sp. Finally by light microscopy and Raman spectroscopy, greater accumulation of wax was appreciated over the cuticle of the seedlings inoculated with *Bacillus*.

The conclusions obtained were: That Candelilla wax extraction is an essential economic activity for the inhabitants of the Chihuahua Desert. Candelilla is not spread from its roots in a green house assay. Explants for Candelilla tissue culture requires a

deep disinfection to inhibit microorganisms included in their wax covers. Murashige Skoog medium requires the addition of activated charcoal to propagate Candelilla plant. The bacterial association with roots was observed on roots of *in vitro* cultured plants when inoculated with 10 μL of *Bacillus* sp at 1×10^8 CFU / mL. Physiological changes induced by endophytic *Bacillus* sp promote secretion Candelilla wax, apparently through stomas.

Key words: *Euphorbia antisyphilitica*, *Bacillus* sp, propagation *in vitro*, endophytic bacteria, wax production, greenhouse propagation, optical microscopy, Raman spectroscopy.

1. INTRODUCCIÓN

México es el único país que explota la planta de la Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica* Zucc.). Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango y Chihuahua, son los seis estados que producen en conjunto entre 1,000-1,800 toneladas anuales de Candelilla (Noriega, 2010), siendo Coahuila el mayor productor. Para algunos campesinos de estas regiones, su mayor ingreso depende de la venta de la cera de Candelilla, la que se complementa con la venta de otras especies nativas del desierto y en menor grado con actividades agrícolas, ganaderas o mineras (Mendoza, 2010).

La cera que produce la planta de la Candelilla es muy apreciada por la industria alimentaria, cosmética y hasta la electrónica debido a sus características de inocuidad al ingerirse, dureza y brillo la que la distinguen de otras ceras naturales (Canales *et al.*, 2006).

A pesar de las largas y pesadas jornadas de trabajo que implica esta ancestral explotación, hoy en día, una gran cantidad de familias dependen de los ingresos generados por ella. Debido a las condiciones fisiográficas de la región, difícilmente se pueden desarrollar otras actividades económicas como la agricultura o la ganadería.

En la industria de la cera de la Candelilla existen dos factores que han permanecido prácticamente inalterados: el proceso de fabricación de la cera y las condiciones precarias en las que viven quienes la extraen de las plantas, habitantes de la región candelillera (Instituto de la Candelilla, 2004).

Por otro lado, la sobreexplotación de la planta, está propiciando una importante disminución en su densidad poblacional, ya que el procedimiento tradicional de colecta implica la extracción de la planta de raíz y la planta requiere entre dos y cinco años para alcanzar la talla adecuada para cosecharse (Canales *et al.*, 2006).

Algunos productores de Candelilla creen que a partir de las raíces que permanecen en el suelo después de la extracción, se genera una nueva planta, sin

embargo, cada vez tienen que recorrer mayores distancias para localizar y coleccionar las plantas de la talla deseada, lo cual muestra el riesgo existente de llevar paulatinamente a la extinción a este importante recurso natural, así como a alterar la biodiversidad del ecosistema (Instituto de la Candelilla, 2004).

Es importante proponer el repoblamiento de aquellas zonas, que en el pasado histórico reciente contaban con la Candelilla como parte de su flora nativa. Dentro de las nuevas tecnologías para el establecimiento de materiales vegetales, se encuentra el incorporar al sistema productivo, organismos que promuevan el desarrollo, brinden protección contra patógenos o abatan cualquier tipo de estrés de la planta hospedante (Puente *et al.*, 2010). Entre estos organismos se encuentran las bacterias endofíticas, estas bacterias están en la mayoría de las especies vegetales, residiendo en los tejidos de la planta, tanto local como sistemáticamente (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006).

Diferentes trabajos (Kloepper y Beauchamp, 1992, Hurek *et al.*, 1994, Hallmann *et al.*, 1997, Mahaffee y Kloepper, 1997, Fernández-Larrea, 2001, Lodewyckx *et al.*, 2002, McSpadden, 2004, Kokalis-Burelle *et al.*, 2006, Rahman *et al.*, 2006), reportan que las bacterias endofíticas, se pueden aislar tanto de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, de herbáceas, arbustos y árboles. De entre los aproximadamente 100 géneros reportados de este grupo de bacterias, los más frecuentemente aislados son: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Enterobacter* (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Dentro de este grupo se pueden citar a los microorganismos promotores del desarrollo vegetal conocidos hoy como PGPM (Plant Growth-Promoting Microorganism), entre los que se encuentran aquellos del género *Bacillus* sp. Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, producen endosporas termorresistentes, quimioheterótrofas que normalmente son móviles por sus flagelos peritricos (Koneman, 2001).

Son microorganismos anaerobios o aerobios facultativos, son catalasa positivos y también resisten factores físicos perjudiciales (Koneman, 2001), además

son capaces de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, entre los que destacan: la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y control de enfermedades en las plantas (Kokalis-Burelle *et al.*, 2006).

El potencial que las bacterias endofíticas tienen para ofrecer a la agricultura, va más allá de su uso como agentes de biocontrol. La capacidad de colonizar a las plantas de manera sistémica, proporciona una herramienta que se incorpora a todos los tejidos vegetales durante su desarrollo fenológico (Weller, 1988).

Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo, demostrar la propagación vegetativamente de la planta la Candelilla a partir de su rizoma, la búsqueda de bacterias endofíticas que ayuden a promover el desarrollo de la planta, así como también determinar las condiciones socioeconómicas en las que se desarrolla la explotación de la Candelilla.

2. ANTECEDENTES

2.1. Condiciones socioeconómicas

El desierto de Chihuahua es el desierto más extenso de América del Norte, cuenta con un área de 450 000 km² con dimensiones aproximadas de 1,280 km de largo por 400 km de ancho.

Este desierto está separado por varias pequeñas cordilleras, de las cuales destaca la Sierra Madre Occidental por el Oeste y la Sierra Madre Oriental por el Este. La presencia de estas montañas evita que las corrientes húmedas del Golfo de México y del Océano Pacífico precipiten en forma de lluvia, siendo esta la causa principal de la existencia de condiciones desérticas en la zona.

La elevación mínima del territorio del desierto se ubica a 300 m, aunque la mayor parte de su extensión se encuentra entre los 1,000 y 1,500 m de altura. Las temperaturas pueden ser extremas, con valores promedio de 13°C en enero y de 36°C en junio, pudiendo alcanzar los 50°C en los días más calientes del año.

La precipitación pluvial anual es menor de 350 mm, con 8 a 12 meses secos y con lluvias ocasionales durante los meses de enero, febrero, julio, agosto y septiembre.

Sus condiciones particulares de humedad, composición del suelo y temperatura, permiten el crecimiento de casi una cuarta parte de las 1,500 cactáceas conocidas por la ciencia, así como de diversas especies florales que solo pueden desarrollarse en esta región del mundo.

El lugar de estudio se localizó en el ejido La Constancia que está situado en el Municipio de Parras (en el estado de Coahuila de Zaragoza). Tiene 322 habitantes. La Constancia está a 1,360 metros de altitud (INEGI, 2011).

Entre las actividades que realiza el poblador de estas zonas están el cultivo del maíz y frijol de temporal. Cabe mencionar que las pocas siembras que llegan a cosechar son estrictamente para autoconsumo. También se dedican a atender a uno

o dos caballos y a los burros que utilizan para el trabajo. Otra tarea que realizan es la extracción de la cera de la Candelilla, actividad que en los últimos dos años ha sido su principal fuente de ingresos.

En esta comunidad de La Constancia los hombres de entre 24 y 50 años de edad se dedican a la quema de la Candelilla, contando ya con experiencia en la actividad. Algunas personas mayores de 50 se dedican solamente a la recolección de la planta.

Todos participan en la recolección de la planta y la mayoría de las unidades productivas son familiares. Cuando contratan a alguien para que les auxilie en sus labores, lo hacen por un día o dos.

La extracción de la cera se realiza colocándola en ebullición en agua acidificada con ácido sulfúrico, se enfría en agua y así se forma el cerote, que es una placa que conjunta a toda la cera que se obtiene de la quema de un volumen de la planta. El cerote se vende en forma directa al intermediario asignado por la empresa que les compra la producción.

La familia está regida por el padre, quien por lo regular mantiene económicamente a la familia. El jefe de familia es quien toma las decisiones más relevantes.

El ejido está conformado por cuatro cargos, el Comisariado, el Secretario, el Tesorero y el Presidente del consejo de vigilancia. Estos son elegidos en asamblea por los ejidatarios de cada comunidad y duran tres años en el cargo.

Las viviendas están construidas con muros de adobe y concreto, pisos de tierra o concreto y los techos de terrado con vigería.

Para la preparación de sus alimentos, utilizan como combustible leña en fogones. Las viviendas cuentan con dos o tres cuartos y cocina.

En cuanto a atención escolar la comunidad cuenta con los niveles: preescolar, primaria y secundaria (rural federal). Sin embargo, la asistencia a las escuelas es

irregular debido a que los niños participan en labores del campo, como la recolección y el quemado de la Candelilla. Además frecuentemente la familia completa se traslada a otros lugares a visitar familiares, lo que provoca un estancamiento o retroceso en el aprendizaje y avance escolar.

Este poblado no cuenta con calles pavimentadas ni con alumbrado público. El acceso es a través de caminos rurales de terracería, que son extensos y se encuentran en pésimas condiciones.

La comunidad cuenta con agua potable, distribuida de red pública domiciliaria, dentro del terreno pero fuera de la vivienda. El servicio médico es proporcionado por la Secretaría de Salud: cada 15 días va una caravana de la salud y realiza una revisión general, aunque regularmente los pacientes se trasladan a la cabecera municipal más cercana, (Saltillo, Ramos Arizpe o Parras). Como servicio sanitario las casas cuentan con letrinas.

Todas las viviendas cuentan con servicio de energía eléctrica pero no existe alumbrado público, ya que sólo cuenta la comunidad con tres lámparas y de éstas sólo dos funcionan.

La mayoría de los habitantes de esta comunidad manifiestan ser católicos. Sin embargo, sus normas son flexibles. Es común la coexistencia de parejas de jóvenes viviendo en unión libre desde muy temprana edad, algunos a partir los 13 años de edad.

Existe un templo pequeño, al que asiste un sacerdote de manera mensual y oficia misa. Los sacerdotes apoyan a la comunidad con medicinas, despensas, mejoras de vivienda, entre otros.

Los jóvenes no aspiran a emigrar a Estados Unidos y su único ingreso proviene de las actividades que realizan en su comunidad o en las fábricas que se encuentran en las ciudades cercanas, a las que se trasladan por un tiempo y regresan a trabajar de nueva cuenta en las actividades que sus padres realizan.

2.2. Caracterización biológica de la Candelilla

En 1829 el Botánico J.G. Zuccarini describió por vez primera a la planta de Candelilla con el nombre científico *Euphorbia antisyphilitica* (Instituto de la Candelilla, 2004), el nombre de Candelilla parece provenir de “candles” (en el idioma inglés), que significa “vela”.

La planta de Candelilla pertenece a la familia de las *Euforbiáceas*, nombre común de una extensa familia de plantas con flores de aspecto similar a los cactus de quienes se diferencian claramente por el látex lechoso que contienen las *Euforbiáceas*.

La planta crece normalmente en zonas de clima semi-desértico, principalmente en laderas de suelo calcáreo, asociadas con formaciones de material rocoso. La raíz de la planta es relativamente pequeña, sin embargo una planta de tamaño moderado puede desarrollar más de 100 tallos de color verde grisáceo, con dimensiones típicas de 30-60 cm de largo y de 0.1-1.0 cm de diámetro, dando lugar a la formación de arbustos de un tamaño aproximado de 90 cm de diámetro (Instituto de la Candelilla, 2004).

La Candelilla es una planta que tiene alta capacidad de producción de cera, esto debido a que se encuentran vasos laticíferos en la región del periciclo, en la endodermis, en la corteza media y en los haces liberianos. La regeneración de los tallos se presenta 3 a 4 años después de cosechados (De la Garza y Berlanga, 1993).

La Candelilla se distribuye en los estados de: Chihuahua, Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Taller Nacional de Candelilla, 2008) (Figura 1). Ocupando un área potencial que oscila entre los 30, 129,896 y 32, 420,133 ha (CONAFOR, 2009 y CONABIO, 2009). En Estados Unidos de América, se distribuye en los Estados de Nuevo México y Texas. Las mayores concentraciones de Candelilla se encuentran

en una faja que se extiende entre los meridianos 102° y 103° N, desde el Río Bravo hasta el paralelo 24° (Rzedowski, 1978).

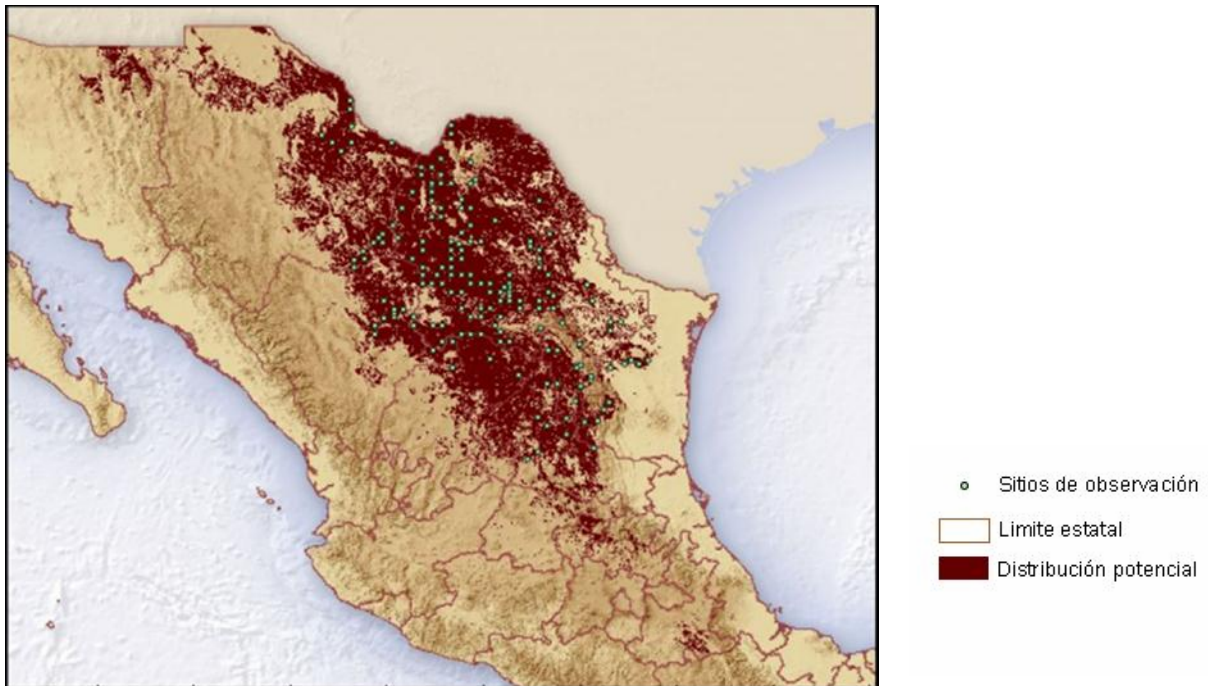


Figura 1. Distribución de la Candelilla.

(Fuente: Decimoctava reunión del comité de Flora Buenos Aires (Argentina), 17-21 de marzo 2009. Evaluación del estatus de *Euphorbia antisyphilitica* en México dentro de los apéndices de la CITES).

La Candelilla presenta tallos cilíndricos, rectos y normalmente sin ramificaciones que forman macollos. El color de los tallos es verde claro en los tallos jóvenes, hasta gris opaco en los maduros, que son los que contienen la mayor cantidad de cera. La cantidad de cera depende de las condiciones ambientales (mientras más seco mayor concentración de cera). Presenta hojas alternas, sésiles, lineal subuladas, de 2-3 mm de largo, rollizas, estriadas sobre las superficies superiores, café, diminutamente pubescentes, con pelos curvos, blancos, más o menos adpresos, tempranamente deciduos, y presentes sólo en nuevos crecimientos.

Las flores son pequeñas, de color rojo y aparecen en los ápices de los tallos en la época de lluvias (Figura 2). Las flores de ambos sexos se encuentran dentro de una estructura llamada ciato. La inflorescencia es una espiga de cabezuelas de aproximadamente 46 flores masculinas, con una flor femenina en el centro. El fruto es una cápsula trilobular que pende de un largo pedúnculo y cuando los óvulos han madurado, la cápsula estalla y arroja las semillas alrededor de la planta. Las semillas son de color café claro, rugosas y con cuatro ángulos (SEMARNAT, 2005).



Figura 2. Planta de la Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*) con flor (Fuente: Foto propiedad del autor).

La Candelilla es muy resistente al ataque de plagas y enfermedades y es consumida de forma muy limitada por algunas especies de la fauna silvestre de la región.

También es reconocida por sus propiedades medicinales del jugo de la planta como un remedio utilizado por los indígenas para tratar la enfermedad venérea de la sífilis, también su cera era utilizada para tensar arcos, curtir pieles, en preparaciones

medicinales contra el dolor de muelas y como laxante. En la actualidad, la Candelilla se considera útil para el tratamiento de padecimientos diversos (Instituto de la Candelilla, 2004).

Para principios del siglo XX se empezó a comercializar, y en 1905 Connek y Landresc investigaron su composición y propiedades. Durante la segunda guerra mundial se incrementó su demanda para impermeabilizar y proteger de los mosquitos las telas de las tiendas de campaña, para cubrir y prevenir el deterioro de algunas partes de los aviones y en la fabricación de explosivos y alcanzó un precio de hasta 1.2 USD kg⁻¹ y México exportó hasta 24, 000 ton año⁻¹ (Domínguez-Lara, 2004, López *et al.*, 2007, Instituto de la Candelilla, 2008).

La cera de Candelilla es una sustancia dura, quebradiza y fácil de pulverizar puede tener altos niveles de brillo, de tal manera que ésta es una de las propiedades más apreciadas de la cera de Candelilla en diversas aplicaciones, tales como: la elaboración de labiales, pulidores, abrillantadores de muebles, etc. Además es un buen disolvente de colorantes básicos, es insoluble en agua, pero altamente soluble en acetona, cloroformo, benceno y otros solventes orgánicos (Instituto de la Candelilla, 2008).

Su estructura química se compone de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos de cadena larga (Cuadro 1). Aunque, existen otras plantas capaces de generar “cera” (*Pedilanthus pavonis Boissier* y *Pedilanthus aphyllus Boissier*), ellas, presentan menos rendimiento; así como puntos de fusión y valor de saponificación más bajos, en comparación con la producida por individuos del género *Euphorbia* (Maldonado, 1979, Multiceras, 2007, Instituto de la Candelilla, 2008).

Cuadro 1. Composición de la cera de Candelilla (Rojas *et al.*, 2009).

Contenido	Cera cruda (%)	Cera refinada (%)
Hidrocarburos	46	57
Alcoholes libres	13	14
Ácidos libres	7	7
Ésteres simples	2	21
Ésteres hidroxilados	8	8
Ésteres ácidos	10	0
Diésteres	9	0

2.3. Microorganismos asociados a los tejidos vegetales

El concepto de que los endófitos son microorganismos establecidos en los tejidos internos de la epidermis (Kloepper y Beauchamp 1992) es actualmente como la asociación biológica en que los microorganismos colonizan tejidos internos vivos de las plantas, sin causar ningún efecto negativo inmediato o daño aparente a la planta (Bacon y White, 2000).

Las bacterias endófitas son reconocidas como las aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Hallmann *et al.*, 1997, Sakiyama *et al.*, 2001). Estas bacterias son encontradas principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares, sin causar síntomas de enfermedad (Hurek *et al.*, 1994, Bell *et al.*, 1995).

Cuando las bacterias se localizan en estructuras especializadas, como los nódulos en las leguminosas, se establece una simbiosis mutualista estricta. En contraste, cuando las rizobacterias aprovechan el microambiente favorable de la planta, sin formar estructuras *de novo* sobre la raíz, se habla entonces de una simbiosis asociativa (Echegaray-Alemán, 1995).

Muchas bacterias endofíticas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Boonjawat *et al.*, 1991, Elmerich *et al.*, 1992, Döbereiner *et al.*, 1995), producción de sustancias reguladoras del crecimiento como las auxinas, particularmente el ácido indol acético (AIA), quien promueve el crecimiento de las raíces y la proliferación de pelos radicales. En forma similar, la actividad de la enzima bacteriana 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, disminuye los niveles elevados de etileno en plantas en desarrollo o estresadas al hidrolizar el ACC, precursor inmediato del etileno, y así consecuentemente promueve la elongación de la raíz (Arshad y Frankenberger, 1998), solubilización de minerales y nutrientes (Crowley *et al.*, 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.*, 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede *et al.*, 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996).

Las BPCV pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995). Como describieron Kloepper *et al.*, (1999) y más recientemente Gray y Smith, (2005), las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden también penetrar al interior de las raíces y establecerse como poblaciones endofíticas. Muchas de ellas tienen la capacidad de trascender las barreras de la endodermis, atravesar la corteza de la raíz hasta el sistema vascular y, como consecuencia, vivir como endófitos en tallos, hojas, tubérculos y otros órganos (Compant *et al.*, 2005) sin causar perjuicio a la planta. Más específicamente, sus rutas de acceso son radículas, raíces secundarias, estomas o alguna herida en la

planta, ya que pueden vivir en los espacios intercelulares o en el sistema vascular (Zinniel *et al.*, 2002). La población total de endófitos puede variar debido a factores tales como la edad del vegetal, las condiciones ambientales y el tipo de tejidos (Elbeltagy *et al.*, 2001, Zinniel *et al.*, 2002).

Los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; algunos de los cuales sobreviven a circunstancias de estrés. En condiciones de estrés, como la sequía o ausencia de nutrimentos, algunas bacterias de vida libre forman estructuras de resistencia. Por ejemplo: *Bacillus* forma esporas, *Azotobacter*, *Derxia* y *Azomonas* tienen la capacidad de enquistarse, y en *Azospirillum* se ha encontrado la formación de una estructura similar a un quiste (Elmerich *et al.*, 1992).

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg y Hallmann 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus* incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsmann y Stabb 1996), antibiosis (Loeffler *et al.*, 1986) e inducción de resistencia (Kloepper y Ryu 2006).

Además, tienen comprobado efecto en la promoción de crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.*, 2004). La capacidad de *Bacillus* de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers, 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. *Bacillus subtilis* es uno de los más eficientes agentes de biocontrol, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos y bacterias patogénicos.

Este antagonismo se ha atribuido a la producción de antibióticos y a la capacidad de colonización de la planta (Loeffler *et al.*, 1986, McKeen *et al.*, 1986, Bochow *et al.*, 1995).

Más aún, los estudios hechos por Puente *et al.*, (1993), muestran que la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento del género *Azospirillum*, aumenta significativamente el crecimiento del cactus cardón gigante en el suelo de desierto. Otro estudio realizado por Pereira *et al.*, (1993) publicaron resultados de la inoculación del pasto *Panicum maximum* y *Chloris gayana*, con cinco cepas de *Azospirillum*, incrementando el rendimiento en más de 94% con tres de las cepas evaluadas en *Panicum maximum*, mientras que *Chloris gayana* no presentó diferencias estadísticas en rendimiento, pero sí incrementó su calidad. Se ha demostrado que algunas fitohormonas, como el ácido indol acético, producido por los microorganismos rizosféricos inducen un aumento de la superficie de la raíz, permitiendo a la planta una mayor absorción de nutrientes (Okon y Labandera, 1994).

La inoculación con microorganismos del suelo benéficos es una práctica común en la agricultura y silvicultura en países desarrollados (Bashan *et al.*, 2004).

Con respecto al efecto de la inoculación de BPCV en la Candelilla existen escasos estudios, es por eso que en este trabajo se buscaron bacterias promotoras de crecimiento del género *Bacillus* para observar que efecto tiene en la planta de Candelilla y para su identificación y estructura se utilizaron los métodos de aislamiento de microorganismos, el crecimiento de los microorganismos no se puede estudiar individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que es necesario recurrir a medios nutritivos artificiales, donde se desarrollan rápidamente y así obtener grandes poblaciones. La elección del medio se basa en el propósito del estudio. Los medios de cultivo pueden ser sintéticos, es decir de composición química conocida, o pueden ser complejos, en los cuales por lo menos hay un componente de composición desconocida. En general, los medios son ricos en proteínas no específicas, con el fin de estimular el crecimiento de los microorganismos. En estas condiciones se pueden manipular y efectuar las investigaciones deseadas. (Prescott *et al.*, 1999) Para la identificación de bacterias con base a criterios morfológicos, es decir la forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian

según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral). La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras.

Las coloraciones que se usan para teñir los preparados de bacterias, se pueden dividir en: simples, diferenciales y especiales. Las primeras, por ejemplo el azul de metileno, nos permiten observar la existencia de bacterias, su morfología, su agrupación, la presencia de esporas y la existencia de otros caracteres celulares. Las diferenciales (por ejemplo la coloración de Gram y la de Ziehl Nielseen) además de lo anterior, permiten la diferenciación de las bacterias porque permiten clasificar a estos microorganismos por la reacción que promueven al estar en contacto con los colorantes. Las tinciones especiales se usan para objetivar distintas estructuras como la cápsula, el núcleo, los flagelos, las esporas, entre otros (Schaechter *et al.*, 1993). En este caso para examinar la composición química de la cutícula se empleò microscopia Raman, técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico o inorgánico permitiendo así su identificación, ya que no requiere de ningún tipo de preparación y que no conlleva a ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis (Akkus *et al.*, 2004).

2.4. Objetivo

Determinar las condiciones sociales en que se efectúa la explotación de la Candelilla y evaluar la propagación vegetativa de la Candelilla a partir de su rizoma, así como el efecto de las bacterias endofíticas del género *Bacillus* sp en el desarrollo de la planta.

2.4.1. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones socioeconómicas en que se realiza la explotación de la Candelilla.
- Evaluar en condiciones de invernadero el desarrollo de la Candelilla a partir su rizoma.
- Aislar bacterias del género *Bacillus* sp del interior de plantas de Candelilla.
- Establecer una línea de planta de Candelilla cultivada *in vitro*.
- Demostrar la asociación bacteria-planta entre el género *Bacillus* sp y la Candelilla cultivada *in vitro*.
- Determinar el efecto del género *Bacillus* sp en el desarrollo de la Candelilla *in vitro* a través del microscopia óptica y espectroscopia Raman.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte social del proyecto se realizó en el municipio de Parras de la Fuente, Coahuila. La parte experimental se hizo en el invernadero y laboratorio de fitopatología del CIIDIR-IPN-Unidad Michoacán, así como en el laboratorio de Biotecnología del CUCI de la Universidad de Guadalajara y en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del IPN.

La colecta de la planta de Candelilla se llevó a cabo en Parras de la Fuente, Coahuila, las plantas tenía una edad de 4 años.

3.1. Determinación de las condiciones socioeconómicas de la explotación de la Candelilla

El trabajo de campo se desarrolló en el ejido La Constancia, municipio de Parras de la Fuente, Coahuila, comunidad, en la que los sacerdotes de la compañía de Jesús, tienen años tratando de establecer contacto, la investigación se realizó a través de entrevistas informales dirigidas hacia los candelilleros y sus familiares.

- Los entrevistados fueron: 10 productores, 5 amas de casa y 9 jóvenes (Figura 3), seleccionados por estar todos integrados a la explotación de la Candelilla. El propósito de las preguntas fue: la relevancia que tiene para ellos esta actividad, su cosmovisión y cosmogonía, los riesgos que representa el trabajo de producir cera de Candelilla y la prospectiva que vislumbran para esta explotación.



Figura 3. Candelilleros en el proceso de la extracción de la cera de la Candelilla y jóvenes de La Constancia (Parras, Coahuila).

3.2. Contratación de la emergencia de tallos de Candelilla a partir de rizoma con o sin tallos en condiciones de invernadero

Se llenaron 16 macetas de 3L de volumen de sustrato 3:1 (3 de jal y 1 de composta a base de cascarilla de arroz y harina de pescado).

Las características del sustrato que se utilizó son: el jal (material calcáreo) sirve para estabilizar suelos, con un pH de 6.96 y una conductividad eléctrica (CE) de

2504 μScm^{-1} . La composición química y fisicoquímica de la composta tuvo un alto contenido de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes excepto Cu cuyo contenido es bajo, el pH, la CE y el contenido de sales es alto (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química y fisicoquímica de la composta (Venegas *et al.*, 2010).

pH	CE (μScm^{-1})	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
		(%)			(ppm)					
8.2	6000	1.644	0.540	1.300	4150	7500	9000	30	100	365

La mezcla del sustrato tuvo un pH de 7.9 y una CE de 4670 μScm^{-1} . Se realizaron cuatro tratamientos (Cuadro 3 y Figura 4) con 16 repeticiones cada uno:

Cuadro 3. Tratamientos.

Tratamiento	Descripción
1	Rizoma sin tallo
2	Rizoma con un tallo
3	Rizoma con dos tallos
4	Rizoma con tres tallos

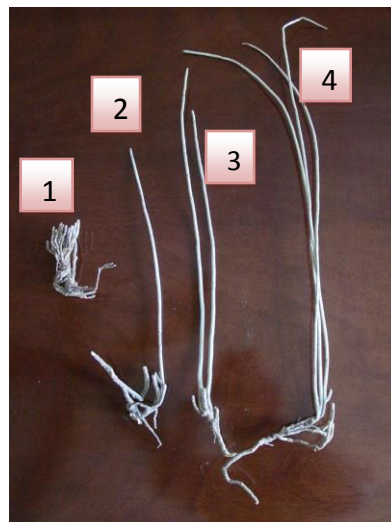


Figura 4. Rizomas

El riego se hizo dos veces por semana con agua corriente, el tiempo del ensayo fue de un año para contabilizar la emisión de tallos, la temperatura ambiental

dentro del invernadero se registró todos los días a las 8:00 y a las 17 horas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Promedio de temperaturas en el invernadero.

Mes	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
A	5°C	6°C	12°C	15°C	16°C	18°C
B	26°C	28°C	34°C	36°C	38°C	38°C
Mes	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
A	17°C	16°C	18°C	16°C	11°C	8°C
B	35°C	37°C	38°C	34°C	32°C	30°C

A. Temperatura ambiente dentro del invernadero 8:00 a.m. **B.** Temperatura ambiente dentro del invernadero 17:00 p.m.

El análisis estadístico no paramétrico se efectuó empleando la prueba de Friedman con una probabilidad de (0.05) del programa Menú de la Facultad de Agronomía de Nuevo León. Como variable se consideró al número tallos emitidos.

3.3. Aislamiento de bacterias endofíticas del género *Bacillus* sp

Para aislar las bacterias endofíticas de la Candelilla se obtuvieron segmentos de tallo de la planta dentro de la zona cercana de la raíz (aproximadamente 3 cm por encima de esta), posteriormente con el propósito de asepticar los tallos se lavaron vigorosamente en agua de la llave y detergente Roma. A continuación fue sumergido este material vegetal en solución de hipoclorito de sodio al 3%, por 5 minutos, en condiciones de asepsia. Después, los segmentos fueron enjuagados 3 veces con agua estéril y posteriormente fueron secados sobre una toalla de papel estéril.

Para obtener las cepas bacterianas del primer aislamiento, los segmentos de tallo, fueron nuevamente fragmentados transversalmente en segmentos de menos de 0.5 cm de largo. Dichos segmentos fueron inmediatamente colocados perpendicularmente, sobre el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), a 25°C durante 48 horas, se seleccionaron las colonias por su morfología colonial. Sus características tintoriales bajo la técnica de Gram, la capacidad de hidrolizar el almidón *in vitro* y de desarrollarse a las temperaturas de 45 y 55°C.

3.4. Selección de Bacterias promotoras de crecimiento

Para determinar si las bacterias aisladas de los tejidos internos de la Candelilla que presentaban la morfología típica del género *Bacillus*, poseían actividad como promotoras de crecimiento vegetal, se empleó el medio Dworkin y Foster (DF), (Jacobson, *et al.*, 1994). Para esto en cajas de Petri con medio de cultivo DF, fueron sembradas por estría cruzada por triplicado, asadas tomadas con el borde del asa bacteriológica de las cepas que se desarrollaron como *Bacillus* en el medio PDA. Estas placas fueron incubadas a temperatura ambiente $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de 48 horas se midió el desarrollo de las colonias bacterianas con el uso de un vernier y seleccionar por su desarrollo.

Para contrastar las diferencias en la producción de índoles totales, fue utilizada la técnica colorimétrica de Salkowski. Esta determinación se hizo a partir de suspensiones bacterianas crecidas en 200 mL de infusión de papa dextrosa estéril, a partir de la inoculación de una asada de las cepas bacterias (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11). Los frascos fueron sellados y se mantuvieron a 25°C en agitación continua a 200 vaivenes por minuto durante 24 horas. Estos cultivos fueron diluidos en agua estéril, hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0.5 nm, 1 mL de cada cultivo fue diluido en 14 mL de infusión papa dextrosa en tubos de ensayo de 30 mL. Como control, se sustituyó el cultivo bacteriano con DO de 5 nm por agua destilada estéril. Los tubos fueron tapados e incubados en obscuridad a 25°C durante 72 horas, en agitación de 200 vaivenes por minuto; posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 6000

rpm. A una alícuota de 3 mL de esta suspensión bacteriana, sedimentada después de centrifugación se le agregaron 2 mL del hizo reactivo de Salkowski. El reactivo de Salkowski se preparó mezclando 2 mL de FeCl_3 0.5 M, con 98 mL de ácido perclórico al 35% (Gordon y Weber, 1951).

La mezcla anterior produjo una coloración rosada después de 30 minutos de incubación; la reacción fue cuantificada mediante un espectrofotómetro a 530 nm. Para esto se estableció una curva de calibración con ácido indol acético, desde 0 a 90 ppm, con incrementos de 10 ppm (Kim y Kremer, 2005) y el análisis estadístico se efectuó empleando la prueba de Tukey con una probabilidad de (0.05) del programa Menú de la Facultad de Agronomía de Nuevo León. Como variable se consideró las concentraciones del AIA.

Las cepas bacterias se colocaron en tubos con aceite mineral y se refrigeraron para su conservación.

3.5. Propagación *in vitro* de la Candelilla (1)

Para el cultivo *in vitro* se tomaron segmentos de tallos de Candelilla, obtenidos de brotes tiernos desarrollados de plantas que se trasladaron de la zona de estudio, al invernadero del CIIDIR IPN Unidad Michoacán. Los segmentos se lavaron con agua y detergente, estos fueron colocados en un vaso de precipitado estéril con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, en un lapso de 3 minutos, posteriormente se enjuagaron 3 veces en agua destilada estéril (George, 1993), y colocados sobre toallas de papel estériles, para ser seccionados con el bisturí entre nudo y nudo, y sembrados en frascos para cultivo de tejidos con 20 mL de medio Murashige y Skoog (MS) 5519. Para este primer ensayo se empleó el medio a 10 y 100% de su formulación. Este procedimiento se realizó en campana de flujo laminar con las condiciones de asepsia. Finalmente fueron mantenidos a temperatura de 22-23°C con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad en espera de su establecimiento y desarrollo.

3.6. Propagación *in vitro* de la Candelilla (2)

Para este caso, los tallos de Candelilla fueron aseptizados con un lavado exhaustivo dio inicio con un lavado exhaustivo a base de agua con detergente durante 5 minutos, a continuación fueron enjuagados con agua y sumergidos en alcohol al 70% durante 10 segundos, inmediatamente se colocaron en agua destilada estéril con 0.5 mL de Captan 50 PH (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) en concentración de 1g/L, manteniéndose en agitación por 15 minutos, posteriormente enjuagados con agua estéril y depositados en una solución de cloro al 0.75 % por 45 minutos, al que se adicionó Tween 80 al 0.1 % para agitar los tallos inmersos durante 15 minutos más, finalmente se enjuagaron con agua estéril y secados con toallas estériles, para así sembrarlas de manera perpendicular a la superficie del medio MS. Este medio fue elaborado a partir de una solución madre Murashige y Skoog (Trigiano y Gray, 2000) en donde se adiciono carbón activado 10 g/L e incubado a 22-23°C con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. A continuación de haberse adaptado y desarrollado (aproximadamente 45 días) se trasladaron de nueva cuenta al medio MS a base de sales pero adicionando Bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L y sin el carbón activado, así fueron sometidos de nueva cuenta a una temperatura 22-23°C y un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad en espera del desarrollo de raíz.

3.7. Asociación bacteria-planta

Plantas de Candelilla cultivadas *in vitro* con raíces de 2 cm de longitud, (aproximadamente 2 meses después del trasplante), fueron inoculadas independientemente y por triplicado con alícuotas de 10 y 100µL de las suspensiones bacterianas en concentraciones de 1×10^8 UFC/mL de cada una de las cepas endofíticas evaluadas como promotoras del desarrollo vegetal. Este sistema monoxénico planta-bacteria fue incubado bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 25°C de temperatura, el sistema estuvo en observación para apreciar la asociación de bacteria-planta en la zona rizosférica.

3.8. Estudio de la microestructura de la planta de Candelilla y de las bacterias promotoras de crecimiento

Para observar los diferentes tejidos que conforman a la planta de la Candelilla y demostrar la presencia de las bacterias del género *Bacillus* sp, las muestras fueron observadas mediante microscopía óptica. Las muestras que se analizaron fueron tomadas a partir del tallo y raíz de plantas de Candelilla cultivadas *in vitro*, que habían sido inoculadas con alícuotas de 10 µL en concentración de 1×10^8 UFC/mL de las cepas aisladas de *Bacillus* sp. Para llevar a cabo dicho estudio, las muestras se etiquetaron de la siguiente manera:

- a) Testigo
- b) Planta de Candelilla inoculada con la cepa 5+ (mayor presencia de ACC)
- c) Planta de Candelilla inoculada con la cepa 7- (menor presencia de ACC)

Como parte del proceso se prepararon las muestras para ser observadas por microscopía óptica, se realizaron los siguientes pasos:

1) Fijación

Para conservar la morfología y composición química de los tejidos se empleó la técnica descrita por Molist. En este caso se tomaron fracciones de la raíz de la planta de Candelilla (tamaño de muestra 2-3 cm), la cual se fijó con una solución de formaldehído al 38% durante 24 horas. Posteriormente se lavó exhaustivamente con una solución PBS 7.4 y agua destilada (Molist, *et al.*, 2009). Finalmente, las muestras fijadas se cortaron en segmentos 5 mm de largo.

2) Inclusión

La inclusión es el método más común de endurecer el tejido y consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas, que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican (Molist, *et al.*, 2009). Una vez fijada la raíz, se realizó una congelación rápida, mediante el medio de congelación denominado Tissue Freezing

Medium (Alemania), el cual se utilizó para cubrir antes de congelar y posteriormente realizar los cortes, esto evitó la formación de cristales de agua que dañan los tejidos.

3) Seccionamiento

Considerando que los tejidos vegetales, por sus características estructurales permiten su observación en secciones de cientos de micras (Molist, *et al.*, 2009), se realizaron cortes transversales de 20 μm empleando para ello un criostato (CM1850 Leica, Alemania). Los cortes fueron montados sobre cubreobjetos que contenían una cubierta de gelatina grado histológico al 20% para su posterior procesamiento.

a) Tinción de bacterias

Se realizó la técnica de Gram (Campbell, *et al.*, 2000) para teñir la presencia de las bacterias promotoras de crecimiento del género *Bacillus* sp, esta técnica consiste en:

1. Fijar la muestra en el portaobjetos.
2. Cubrir con el colorante cristal violeta al 1%, durante 1 minuto.
3. Una vez transcurrido el tiempo lavar con agua destilada la preparación hasta quitar el exceso del colorante.
4. Agregar a la muestra Lugol durante 1 minuto.
5. Lavar con agua destilada para quitar el exceso de colorante.
6. Añadir alcohol-acetona al 50% lavando durante 4 segundos.
7. Lavar con agua destilada.
8. Agregar safranina al 1% durante 2 minutos.
9. Lavar con agua destilada.
10. Dejar secar y observar al microscopio a seco fuerte y a inmersión.

b) Tinción de tejidos

Para observar las diferentes estructuras que presenta la raíz y el tallo de la planta de candelilla, se realizaron tinciones con verde rápido, sudan IV, con el objetivo de resaltar las estructuras en base a su composición.

Verde rápido al 2%

Para el caso de la tinción con verde rápido al 2% (Jensen, 1962), se utilizó para teñir citoplasma y pared celular.

La técnica consistió en:

1. Colocar los cortes en el portaobjetos
2. Teñir con verde rápido al 2%, durante 3 minutos.
3. Lavar con agua destilada hasta quitar el exceso del colorante.
4. Secar a temperatura ambiente.
5. Observar al microscopio

d) Tinción de lípidos

Sudán IV

Llamado también Escarlata R (D'Ambrogio, 1986), este tiene la función de diferenciar lípidos, resinas, ceras, resaltando las cutículas.

Esta técnica consistió en:

1. Colocar los cortes en el portaobjetos.
2. Teñir con Sudán IV 1% (50 mL de acetona y 50 mL de alcohol etílico al 70%) durante 2 minutos.
3. Lavar exhaustivamente con agua destilada.
4. Secar a temperatura ambiente.
5. Observar al microscopio.

Finalmente, las muestras teñidas para las tres condiciones estudiadas fueron observadas por el microscopio óptico (Nikon, Eclipse 50i, Japón) a diferentes aumentos de observación. Se tomaron las imágenes a través de una cámara digital (Nikon DS-2Mv, TV Lens x0.55, Japón) acoplada al microscopio y a una computadora personal, mediante una interface (Nikon, DS-U2, Japón). Las imágenes fueron capturadas con el programa NIS-Elements F 2.30, con tamaño de 1240 X 960 pixeles.

3.9. Contrastación mediante microscopia Raman de las diferencias de composición de la cutícula de la planta de Candelilla *in vitro*

Para el caso de evaluar la composición de la cutícula de la planta de Candelilla *in vitro* se analizó mediante el espectrómetro Micro-Raman Confocal (LabRam HR800, Horiba Jobin-Yvon). Los espectros Raman fueron obtenidos por duplicado en puntos equidistantes, y con un láser de 785 nm y una apertura de 400 μm , con cortes de 5 milímetros, analizando la parte exterior de los tallos para contrastar con la composición química de la parte exterior de la cutícula de las plantas de Candelilla propagadas *in vitro*, tanto las inoculadas con bacterias promotoras del desarrollo vegetal como en las plantas testigo (sin inóculo). La incidencia de la emisión láser en las muestras tuvo un tiempo de exposición de 6 segundos. Así mismo, mediante el microscopio óptico que está acoplado al espectrómetro micro-Raman Confocal se tomaron imágenes de las estomas para establecer posibles diferencias entre los tratamientos.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de las condiciones socioeconómicas de la explotación de la Candelilla

Encontramos que por la actividad propia de los productores del campo específicamente en el ejido La Constancia municipio de Parras, Coahuila, entre las diversas actividades que realiza el poblador rural está la siembra de maíz y frijol de temporal, pero debido a la falta de lluvias esta comunidad tiene dos años explotando la Candelilla, llegando a ocasionarles uno de los principales problemas para la extracción del cerote esto debido:

- a) A la afectación por los vapores del ácido sulfúrico al momento de verterlo a la paila, por los gases que emergen y ellos respiran, lo cual afecta en su salud.
- b) El calor provocado por las pailas.

También mencionan los candelilleros que el proceso más tardado y costoso es la recolección de la Candelilla porque le dedican más días a esta actividad y salen al campo. En cambio, la quema se realiza en una orilla del pueblo, van un rato y regresan a comer a sus casas, sin mover burros, ni vehículos.

Parte de la problemática a la que se enfrentan los productores al salir a la recolección de planta de candelilla es:

1. La distancia y el tiempo que invierten en esta actividad.
2. Los que usan sus vehículos, el combustible, ya que las gasolineras están muy retiradas, además del costo que ha ido en aumento.
3. El medio de transporte no es el adecuado
4. El realizar el corte.
5. Además de que es un trabajo muy duro, con mucho desgaste físico.

También, reconocieron que algunas de las consecuencias de realizar el quemado de la planta, son: la insolación, quemaduras leves, callosidades.

Otro punto importante es que los candelilleros manifestaron es el bajo pago del cerote y que además no es constante, llegándoles a pagar \$36 pesos el kilo de cerote, así como la mejora en las condiciones de trabajo para la extracción de la cera de Candelilla.

Ellos utilizan la raíz con 5-6 tallos para su reforestación, durante el camino se vio como hay zonas que están siendo reforestadas, aquí lo principal es que llueva un poco para poder reforestar.

4.2. Contrastación de la emergencia de tallos de Candelilla a partir de rizoma con o sin tallos en condiciones de invernadero

Los resultados obtenidos después de un año de desarrollo en el invernadero de la Candelilla se puede observar en la Figura 5.



Figura 5. Crecimiento de la planta de Candelilla después de un año de desarrollo en el invernadero.

Por los resultados obtenidos se demostró que el rizoma con tres tallos fue el de mayor eficiencia para la emisión de nuevos brotes, en el tratamiento con solo el rizoma, no emitió tallo alguno. El análisis estadístico nos dio diferencia entre los tratamientos con una $H = 16.7250$ y Chi cuadrada $(0.05) = 7.81$ (Figura 6).

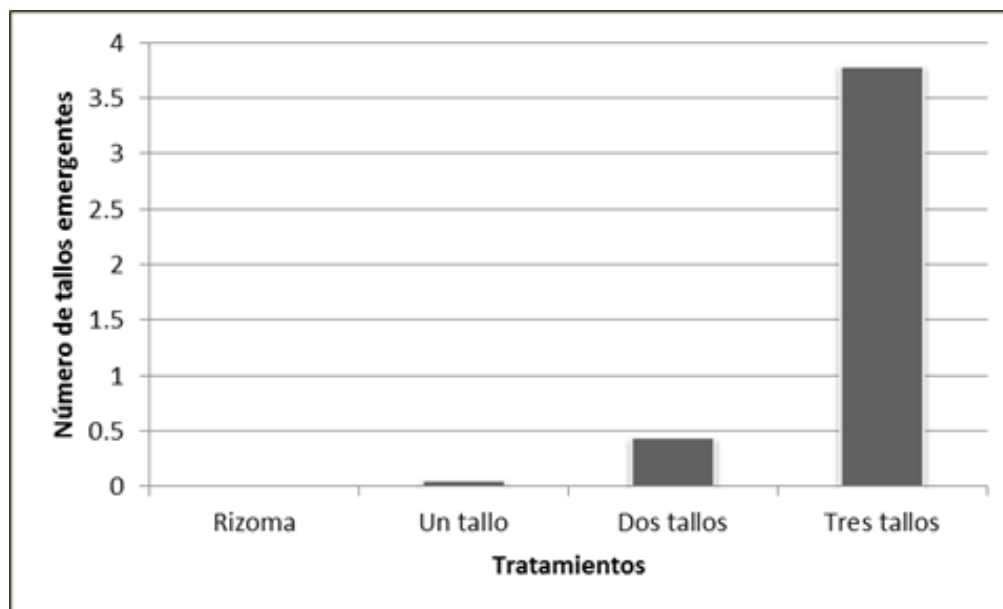


Figura 6. Número de tallos emitidos en los diferentes tratamientos después de un año de desarrollo en el invernadero.

4.3. Aislamiento de bacterias de las bacterias endofíticas del género *Bacillus* sp

De acuerdo a la morfología microscópica tintoriales, colonial y pruebas fisiológicas y metabólicas empleadas en el proceso de obtención, aislamiento y tipificación de las bacterias endofíticas, se obtuvieron 11 aislamientos bacterianos semejantes al género *Bacillus*.

Las características que se seleccionaron como propias del género *Bacillus*, fueron: Bacilos Gram positivos que esporulan en condiciones adversas, colonias de color crema de borde irregular, y superficie rugosa, de apariencia seca, de

consistencia cremosa, mate a la luz reflejada, opaca a la luz transmitida. En cultivos de 18 horas la hidrólisis del almidón fue positiva, con desarrollo a temperaturas 45°C y 55°C.

4.4. Selección de Bacterias promotoras de crecimiento

Las cepas endofíticas de *E. antisiphilitica*, identificadas morfológicamente como *Bacillus* al sembrarse en el medio DF, se desarrollaron, sugiriendo así que son bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Sin embargo su desarrollo fue variado respecto a la magnitud de sus colonias conforme al tiempo (Figura 7).

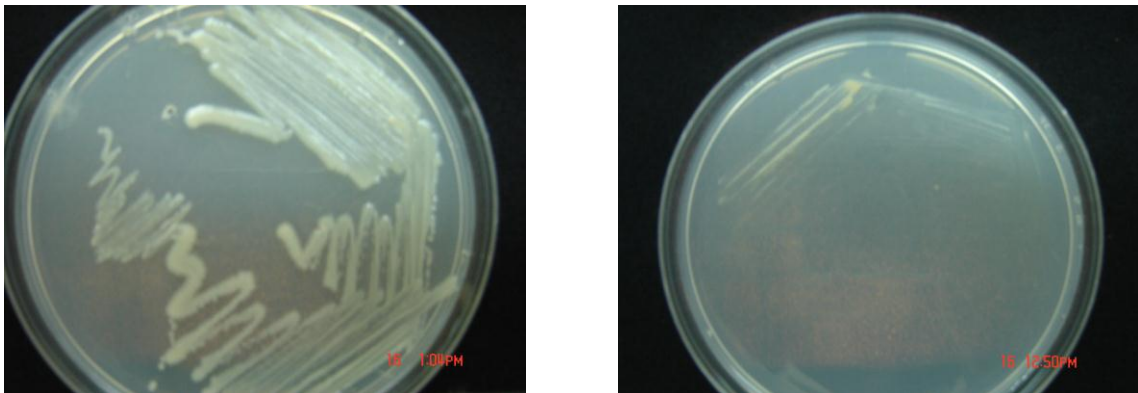


Figura 7. Desarrollo y aislamiento de bacterias promotoras de crecimiento en medio DF.

De acuerdo al diámetro de las colonias bacterianas desarrolladas en el medio DF (Cuadro 5), se escogieron dos cepas: contrastantes una de mayor y otra de menor desarrollo, esto para tratar de observar y establecer una posible correlación entre la degradación del ACC y desarrollo bacteriano y la actividad promotora del desarrollo vegetal en la planta de Candelilla.

Cuadro 5. Medición del diámetro de las colonias bacterianas desarrolladas.

Cepas	Medición (mm)
1	1
2	2
3	4
4	3
5	6
6	6
7	1
8	3
9	1
10	4
11	3

En la curva de calibración las concentraciones de AIA, se observó que los mayores niveles de concentración de esta auxina se obtuvieron en las cepas C4 y C8, en las cepas C1, C5 y C7 tuvo un nivel de concentración media de AIA, en la cepa C3 con menor concentración de AIA y las cepas C2, C6 y C10 su producción fue indetectable (Figura 8).

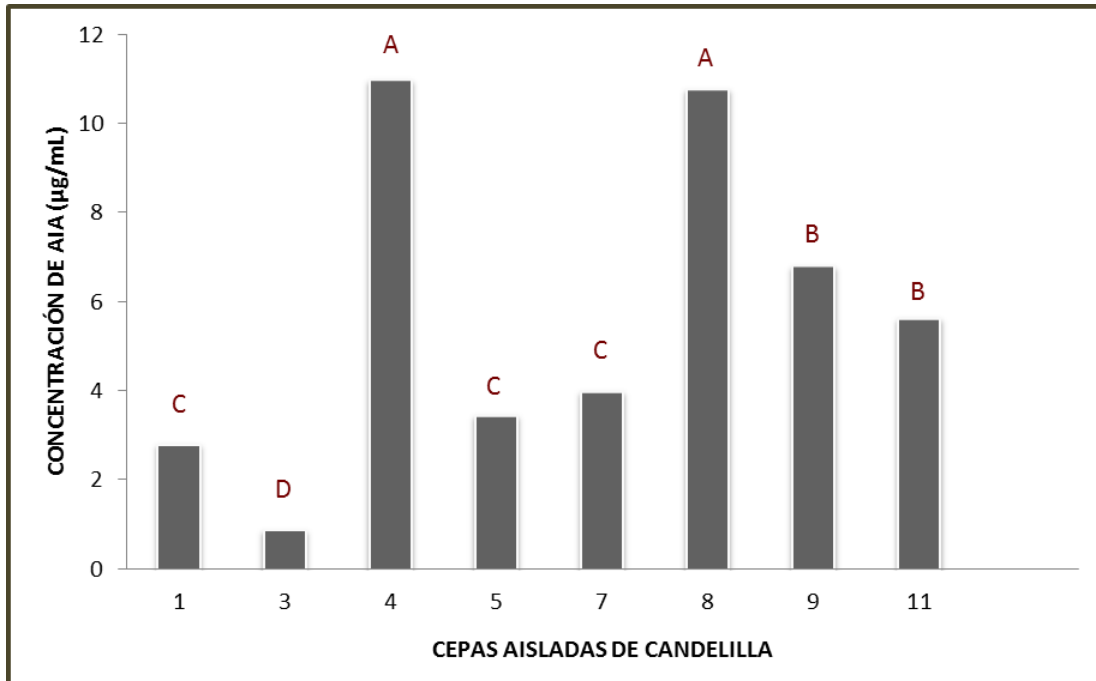


Figura 8. Concentraciones de AIA producido por las cepas bacterianas aisladas de la planta de Candellilla. Los valores con letras distintas sobre las barras difieren estadísticamente a $P \leq 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey ($n=3$).

En tanto en la prueba de Tukey (0.05%) se obtuvo una diferencia mínima significativa de 0.0232 demostrando que hay diferencia estadística significativa.

4.5. Propagación *in vitro* de la Candellilla (1)

Como resultado en la propagación *in vitro* donde se utilizó el medio MS 5519 al 10 % de su formulación, no se logró obtener la planta aséptica, debido a la aparición frecuente de contaminantes fúngicos y bacterianos durante el periodo inicial de incubación además de que los explantes después de un mes se tornaron cloróticos y presento necrosis en la raíz (Figura 9A).

En cuanto al medio MS al 100 % de su formulación, se obtuvieron resultados similares, aparecieron microorganismos contaminantes y en el medio no se observó

crecimiento de raíz de la plántula de Candelilla, ya que mostró un color amarillento en sus tallos (Figura 9B).

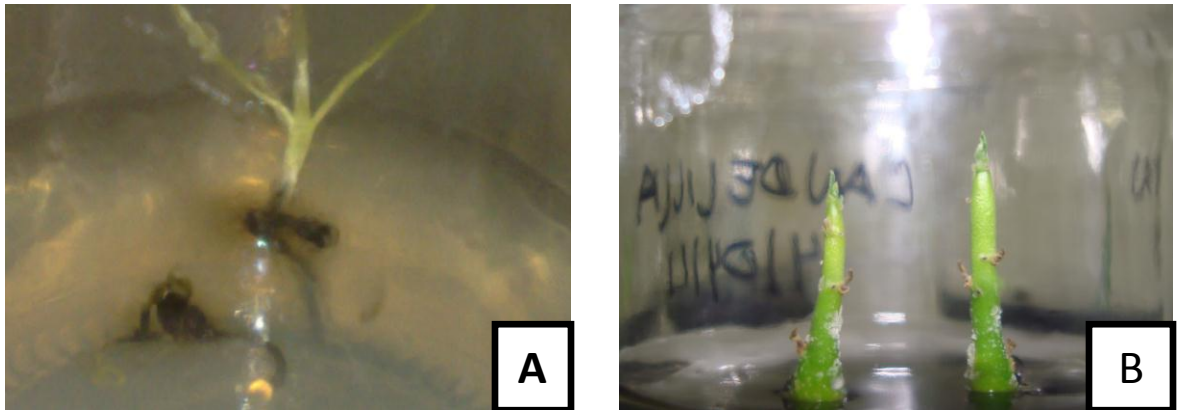


Figura 9. A-Medio MS al 10% de su formulación. B-Medio MS al 100% de su formulación.

4.6. Propagación *in vitro* de la Candelilla (2)

En cuanto al tratamiento en el que se empleó una asepsización con Captan y Tween 80, sembrando en el medio MS a base de sales más carbón activado (Figura 10), se obtuvieron las yemas apicales y yemas laterales útiles para dar inicio a la propagación *in vitro* de la planta.

Así se obtuvo un 99% de plántula aséptica; una vez logradas las yemas apicales y laterales, se seccionaron y se llevaron al mismo medio Murashige y Skoog a base de sales pero adicionado con Bencil-aminopurina (BAP), 1 mg/L sin el carbón activado (Figura 11A). En este medio el crecimiento después de incubar en las condiciones descritas, se obtuvieron raíces de al menos 2 centímetros de longitud las cuales eran indispensables para continuar el trabajo (Figura 11B).

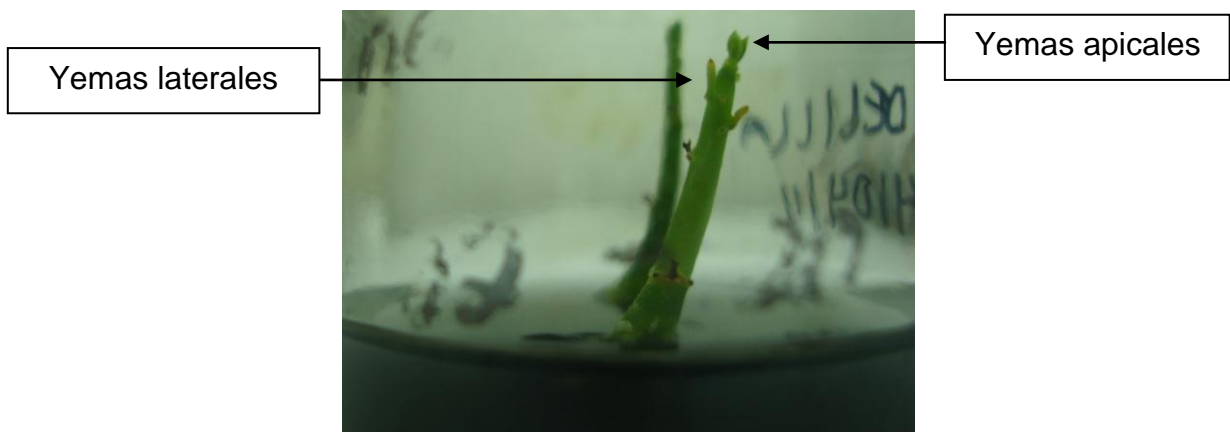


Figura 10. Obtención de yemas apicales y laterales, medio MS a base de sales y carbón activado.

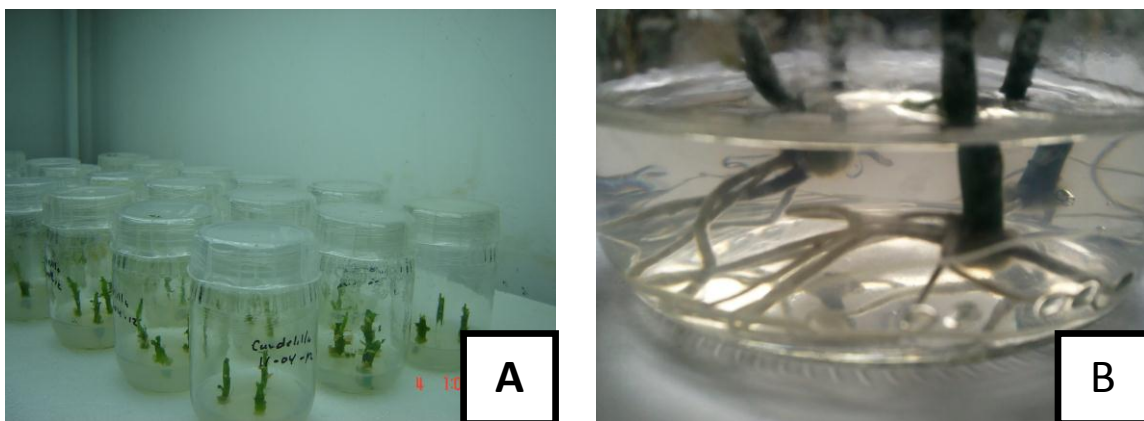


Figura 11. **A-** Cultivo de yemas apicales y laterales sin carbón activado. **B-** Obtención de plántulas de Candelilla aseptizadas y con raíces.

4.7. Asociación bacteria-planta

En las plántulas de Candelilla inoculadas con alícuotas de 100 μL de las suspensiones bacterianas de las cepas C5+ y C7-, no se observó la asociación bacteria-planta, debido a que la inoculación ocasionó la clorosis provocando la muerte del vegetal (Figura 12A). A diferencia de los tratamientos en donde se empleó la inoculación con 10 μL de la misma concentración bacteriana, en ellos se apreció a las bacterias asociadas a la periferia de las radículas de la planta principalmente en la zona de diferenciación a los 15 días (Figura 12B).

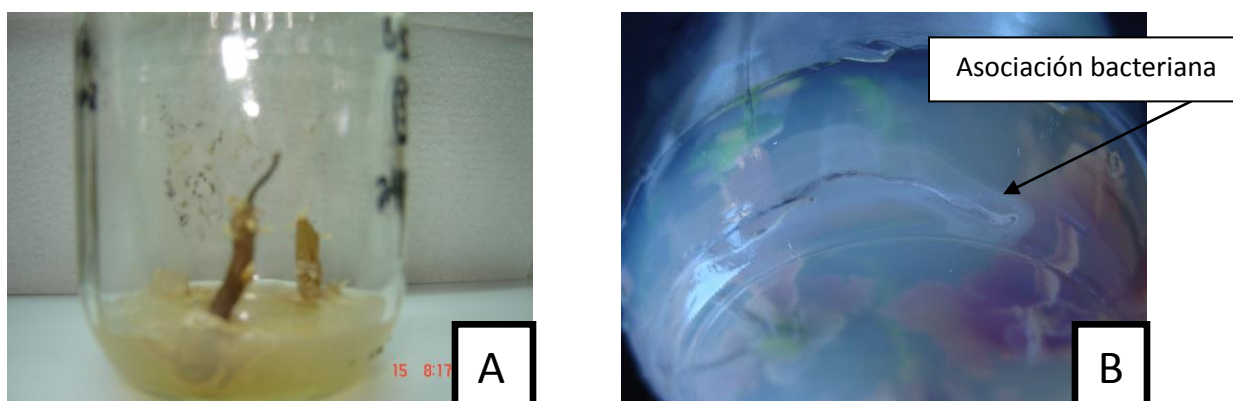


Figura 12. **A**-Plántulas inoculadas con 100 μL de bacterias C5+ y C7- con una concentración de 1×10^8 UFC/mL. **B**- Plántulas inoculadas con 10 μL de bacterias C5+ y C7- con una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

4.8. Estudio de la microestructura de la planta de Candelilla y de las bacterias promotoras de crecimiento

Como parte del estudio de la microestructura de la planta de la Candelilla y las bacterias, al realizar la tinción Gram en el tejido se encontró microorganismos dentro y fuera de la corteza de la radícula de la Candelilla cultivada *in vitro*, inoculada con la cepa 5+. En los cortes transversales de radícula teñidos con la técnica de Gram, se localizaron a las bacterias inoculadas del género *Bacillus* sp, presentando a la espora en posición central y el citoplasma bacteriano teñido de azul. Las bacterias estaban ubicadas extracelularmente en el tejido cortical de la raíz de la Candelilla (Figura 13).

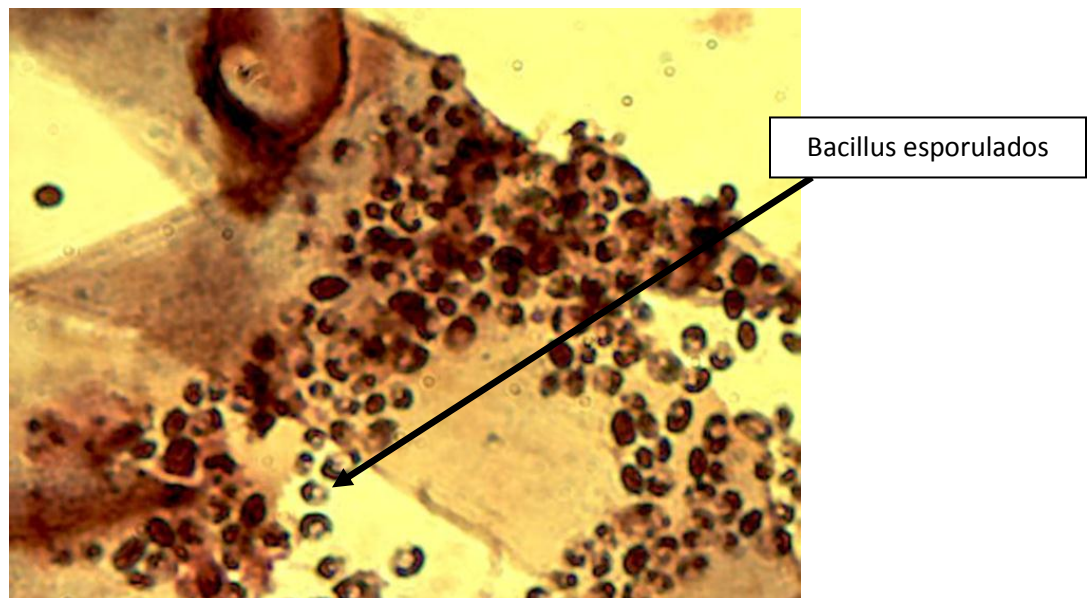


Figura 13. *Bacillus* sp esporulados en la raíz de la Candelilla *in vitro*, tinción mediante la técnica de Gram (1000X).

Posteriormente, los cortes transversales del tejido inoculados con la cepa 5+ teñidos con verde rápido al 2%, permitió observar los conductos laticíferos desembocando frecuentemente en la cercanía de un estoma, siendo los estomas las únicas estructuras excretoras presentes en los tallos de las plántulas de Candelilla, en la etapa de desarrollo (Figura 14).

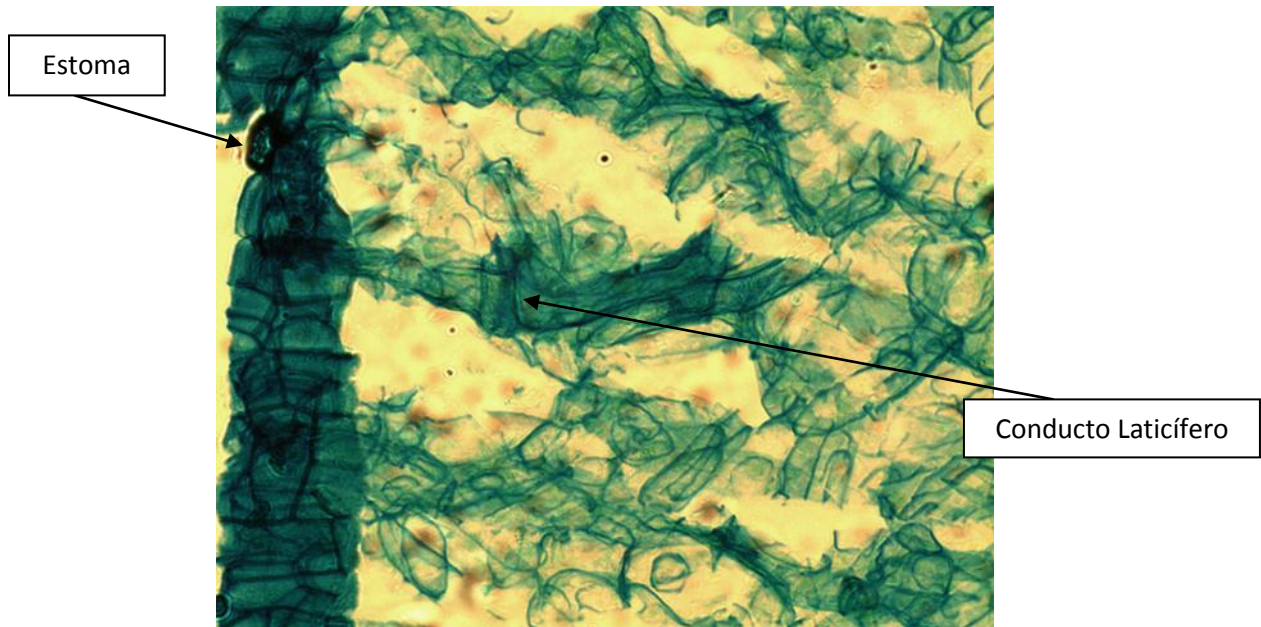


Figura 14. Conducto laticífero en corte transversal de tallo de Candelilla *in vitro*. Tinción con verde rápido (400X).

Para identificar los lípidos, los tejidos fueron teñidos por Sudan IV observándose en particular una gruesa cubierta exterior en los tallos de las plantas inoculadas con las bacterias del género *Bacillus* sp aisladas como promotoras del desarrollo vegetal, así también se observó la presencia de cera sobre las cutículas de las plantas testigos, sin embargo su espesor fue cualitativamente menor (Figura 15).

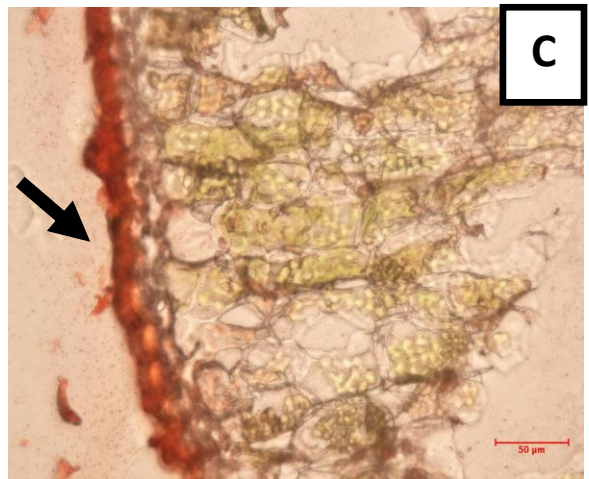
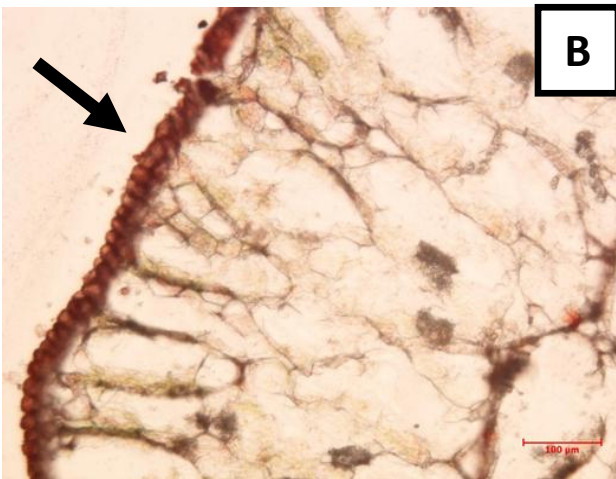
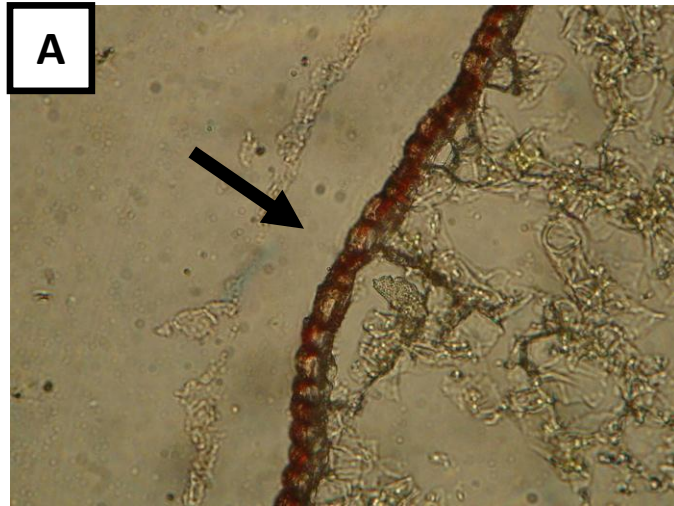


Figura 15. **A**-(Testigo) (1000X) Escasa capa de cera en la superficie de la cutícula del tallo de Candelilla. **B** (C7-) (1000X) y **C** (C5+) (500X)-Mayor presencia de cera en la superficie de la cutícula de los tallos de Candelilla, en las plantas inoculadas.

4.9. Contrastación mediante microscopia Raman de las diferencias de composición de la cutícula de la planta de Candelilla *in vitro*

En la Figura 16 con espectroscopia Raman se observó la estructura química de la cera de plántulas de Candelilla propagadas *in vitro* y los principales componentes químicos de la cera de candelilla son ésteres de ácidos grasos de cadena larga. De izquierda a derecha se presentan bandas de elongación de enlaces carbono-carbono (C-C) en los rangos de 600-1300 cm^{-1} , también se identificó en la posición de 1130 cm^{-1} y en el rango 1090-1055 cm^{-1} relacionada con vibraciones de balanceo de grupos metilo (CH_3), además la interacción oxígeno-carbono-hidrógeno (O-C-H) en el rango 1462-1377 cm^{-1} . En la posición 1737 cm^{-1} se ubica la banda correspondiente a la respuesta del enlace carbonilo (C=O) cuya intensidad es baja, la presencia de carbono- hidrógeno (CH), característicos de los carbonos saturados, los que aparecen en los rangos entre 2800-3000 cm^{-1} , junto con las vibraciones de elongación C-H en la región 2975-2840 cm^{-1} .

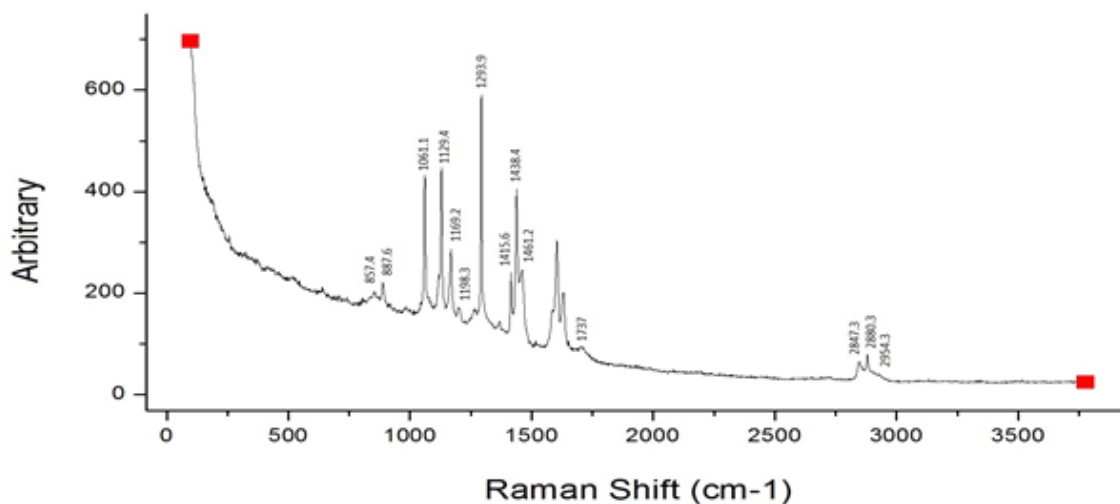


Figura 16. Estructura química de la cera de Candelilla por espectroscopia Raman.

Al contrastar las gráficas obtenidas mediante espectroscopia Raman de las superficies de las plántulas de Candelilla, inoculadas monoxénicamente con *Bacillus* sp promotores de crecimiento, se determinó que en todos los tratamientos, aún en los testigos (Figura 17), las plantas presentaban una capa de cera sobre la cutícula de los tallos aunque con menor intensidad y que está cubierta se incrementa, también en todos los casos, en forma basipétala. Sin embargo, se observó en las 3 réplicas de cada tratamiento una mayor intensidad de cera en las plántulas en donde las cepas de *Bacillus* sp C5+ (con mayor desarrollo en el medio DF) y C7- (con menor desarrollo en el medio DF) fueron inoculadas, esto se aprecia en la Figura 18 y Figura 19; otra diferencia que presentaron los espectros emitidos por las superficies de las plantas, se manifestó en los tratamientos testigos con un doblete presente en el rango cercano a los 1600 cm^{-1} (Figura 17), en cambio este doblete es muy somero en las plantas inoculadas con bacterias del género *Bacillus* (Figura 18 y Figura 19).

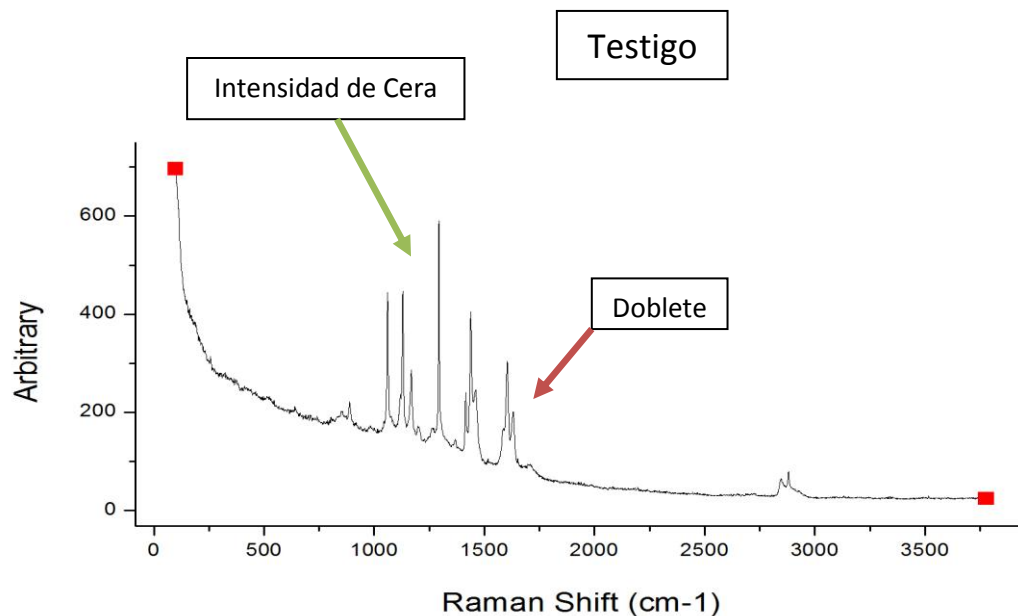


Figura 17. Gráfica de la intensidad de cera y presencia del doblete en el testigo (sin inóculo bacteriano) de la plántula de Candelilla *in vitro*.

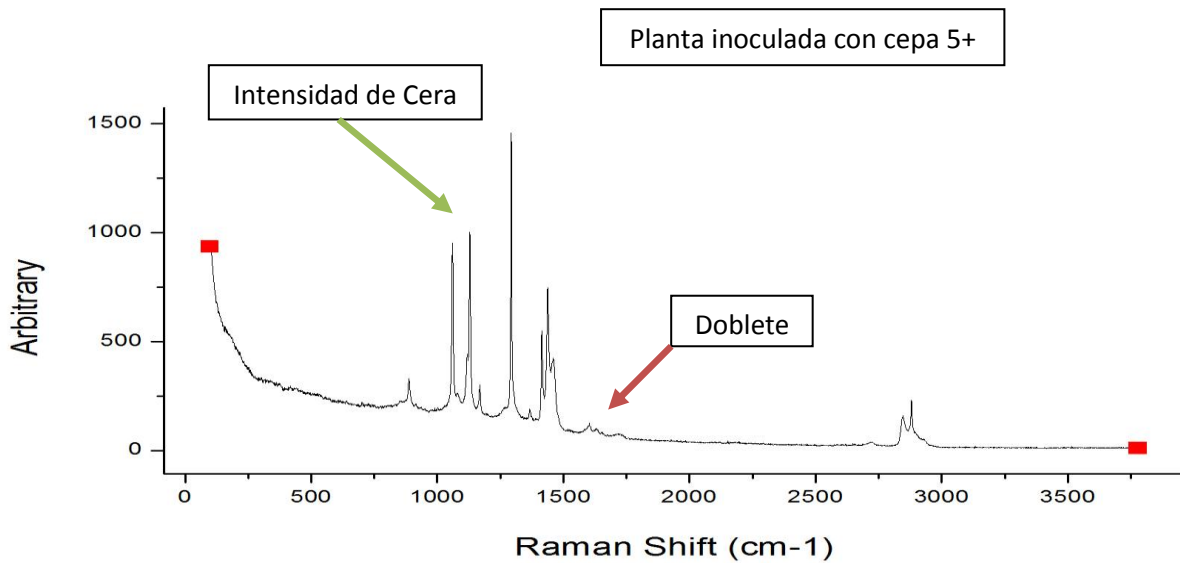


Figura 18. Gráfica de la intensidad de cera y presencia del somero doblete en la plántula de Candelilla *in vitro* inoculada con la cepa 5+.

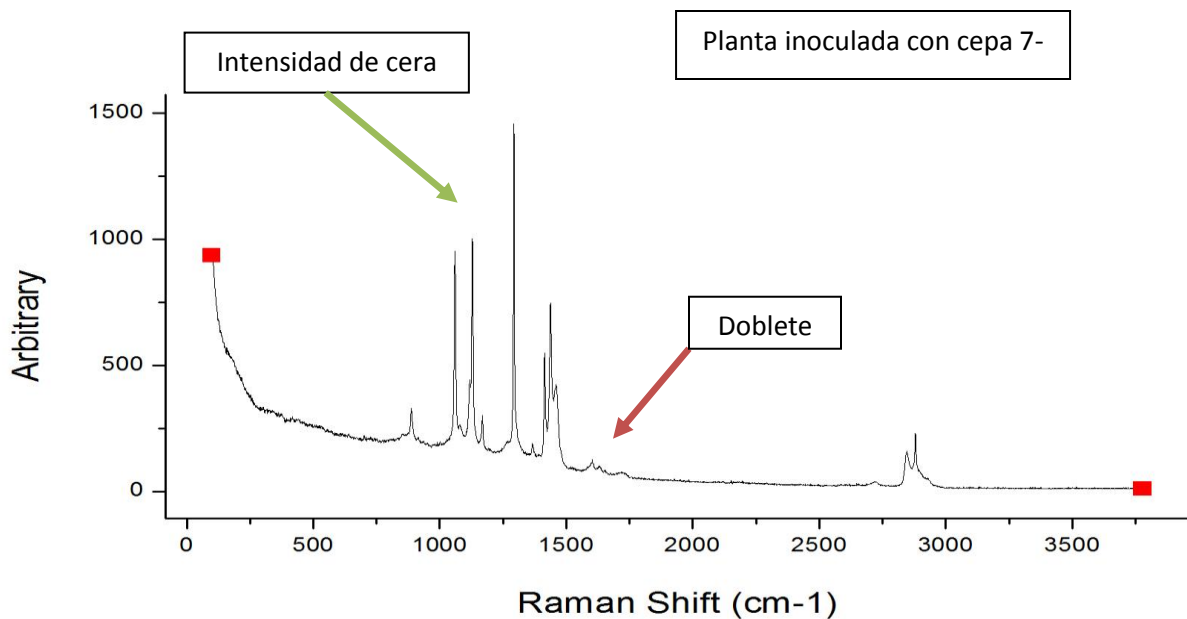


Figura 19. Gráfica de la intensidad de la cera y presencia del somero doblete en la plántula de Candelilla *in vitro* inoculada con la cepa 7-.

En las imágenes ópticas con el microscopio adaptado al espectrómetro Raman, se pudo apreciar a las estomas, como únicas aperturas excretoras sobre la superficie de los tallos de las plantas cultivadas *in vitro*. Como diferencias entre los estomas de las plantas testigo (sin inóculo bacteriano) y las inoculadas con las cepas de *Bacillus* sp 5+ y *Bacillus* sp 7- se presentaron las siguientes: En la imagen **A** planta testigo, se aprecia un estoma más limpio y abierto, en relación a los estomas de los tratamientos inoculados con las cepas de *Bacillus* sp imágenes **B** y **C**, esto es debido a la mayor cantidad de cera que fue excretada a través de estas aperturas, cuando las plantas fueron inoculadas con *Bacillus* sp (Figura 20).

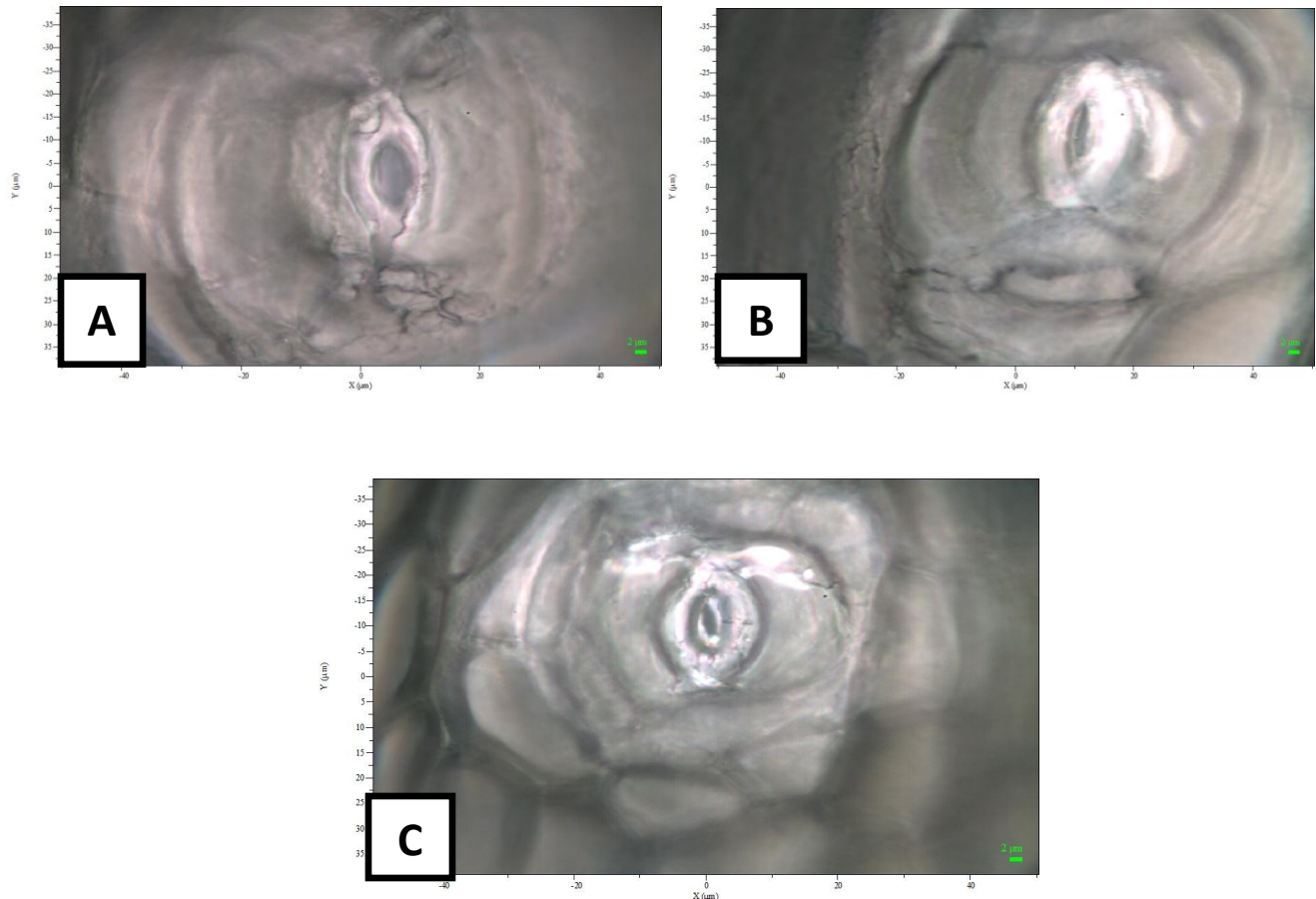


Figura 20. **A**-Estoma de la planta de Candelilla cultivada *in vitro*, testigo (sin inóculo bacteriano). **B**-Estoma de la planta de Candelilla cultivada *in vitro* inoculada con 5+. **C**-Estoma de la planta de Candelilla *in vitro* inoculada con 7- (2µm).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las precarias condiciones de vida de los productores de Candelilla, así como la ausencia de otras actividades económicas que contribuyan a mejorar los niveles de vida de la población, han ocasionado una explotación exhaustiva de la planta de Candelilla, amenazando con llevar paulatinamente a la extinción de este recurso natural.

La situación de miseria se agudiza por la manera totalmente injusta en que se comercializa la cera, producto de un trabajo pesado, riesgoso e insalubre. Los candelilleros dependen de los compradores externos, quienes suministran los insumos requeridos para desarrollar el proceso y establecen épocas de trabajo y precio del cerote. Por lo tanto los candelilleros les venden directamente a las compañías compradoras, las que no ofrecen beneficios sociales o capacitación alguna.

A pesar de ser esta una actividad atávica, la mayoría de los candelilleros desconocen los usos y aplicaciones de la cera, el valor agregado que recibe y los países en donde se comercializa.

Aunque existe un sinnúmero de problemas y enigmas que resolver respecto a la cera de candelilla y su explotación, el principal de ellos es el arcaico proceso de extracción, que data de más de 100 años de establecido. El método es demasiado dañino tanto para el medio ambiente como para los candelilleros, debido a los gases de ácido sulfúrico generados en el proceso y las quemaduras en el cuerpo que provoca el manejo del ácido y de la solución caliente. De León-Zapata (2008) propuso una tecnología alterna, en la que sustituye al ácido sulfúrico por ácido cítrico, como extractor, ya que no emite gases tóxicos. El autor redujo la concentración de ambos ácidos y obtuvo rendimientos similares, característica que hace eficiente el proceso alterno. Por tanto, el nuevo proceso extractivo es una opción viable, ya que mejoraría la calidad y las condiciones con las que se lleva a cabo la actividad, sin embargo este proceso no se ha implementado aún entre los productores.

En referencia a la propagación de la planta, se demostró que la idea que tienen los candelilleros de que la planta puede desarrollarse a partir de un rizoma (Alonso y Álvarez, 2011) es equivocada. En este trabajo también se estableció que empleando rizomas con más de tres tallos de candelilla es más factible, se establezca y desarrolle la planta y así iniciar programas de reforestación.

Sobre el aislamiento de bacterias endofíticas Wakita *et al.*, (2001) reportan que las colonias de *Bacillus* presentan la característica de formar un anillo concéntrico y borde irregular en el centro. Esto fue lo que se observó en las cepas aisladas. Las bacterias pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son fácilmente aisladas desde suelo y restos de materia orgánica, especialmente en la rizosfera donde se encuentra un gran número de vitaminas, aminoácidos y carbohidratos (Starr, 1981). McSpadden (2004) menciona que entre las especies más comúnmente halladas en suelo están *B. subtilis* y *B. cereus* sin embargo, no se ha ratificado que una u otra especie de *Bacillus* esté relacionada más a un tipo de suelo que a otro. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55°C), sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl), producir una amplia variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura *et al.*, 1999). Entre algunos mecanismos promotores de crecimiento identificados en el género *Bacillus*, se encuentran la solubilización de fosfato (Chatli *et al.*, 2008), la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético (Vessey, 2003) y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera (Larrea, 2001). Por esta razón se utilizó el medio ACC para la selección de los aislados obtenidos, comprobando que estas bacterias consumen el ACC, esto incidirá de manera directa en el desarrollo de las plantas hospederas que la ACC-desaminasa, puede alterar la expresión en plantas para disminuir los niveles de etileno y así promover la elongación de la raíz (Jacobson *et al.*, 1994). Se observó que algunas bacterias tuvieron crecimiento en ACC más lento que otras, esto podría ser debido a las diferentes fases de adaptación para iniciar la degradación de un nuevo sustrato y diferencias propias de las rutas metabólicas de cada especie.

Otra de las actividades de los aislados bacterianos que pudieran coadyuvar a que la planta tenga un mayor desarrollo es la producción de compuestos indólicos totales con actividad auxínica del tipo AIA. Lo anterior se basa en reportes en que se menciona que la AIA es una auxina natural que regula diversos procesos del desarrollo vegetal. En este sentido, (Munir *et al.*, 2003, Barea *et al.*, 2005 y Nelson 2004), indicaron que la síntesis de AIA en cepas de *Bacillus* es uno de los mecanismos de acción responsable de los efectos benéficos obtenidos al inocular plantas con esta bacteria. Los aislados que se seleccionaron tuvieron concentraciones medias de AIA pueden ser suficientes para tener influencia directa en el crecimiento vegetal, si se tiene en cuenta que los reguladores de crecimiento vegetal actúan en pequeñas concentraciones sobre el crecimiento de las plantas (Hernández *et al.*, 2004).

La contrastación de medias por la prueba de Tukey realizada, mostro que las cepas 4 y 8, se agruparon en el mismo nivel de confiabilidad estadística y hubo diferencia significativa, con respecto al resto de las cepas; las cepas 9 y 11 hubo diferencia significativa al resto; cepas 7, 5 y 1 hubo diferencia significativa al resto; cepas 3 y 6 hubo diferencia significativa al resto y las cepas 2 y 10 hubo diferencia significativa al resto de las cepas, esto se debe a las diferentes rutas metabólicas que aun estando dentro de la planta pudieran estar influenciadas por la localización en el huésped y la disponibilidad del triptófano que es el aminoácido precursor del AIA.

Las auxinas se utilizan ampliamente en micropropagación y se incorporan al medio de cultivo para promover el desarrollo de callos, de suspensiones celulares, de órganos (como meristemas, yemas) y para regular la morfogénesis (Cisne, 1988). En el rubro a la propagación *in vitro* de la Candelilla con el primer método de desinfección, el hecho de presentarse microorganismos contaminantes en el medio MS después del tratamiento con NaOCl, puede entenderse por qué el proceso de producción de cera es discontinuo y da origen a que se formen capas de este material, dentro el cual pueden quedar esporas fúngicas y bacterianas inaccesibles a la inactivación que se logra al contacto con el desinfectante, quien promueve la

oxidación tanto en el medio de cultivo como en el tejido vegetal (Muna *et al.*, 1999). Por otro lado, Roca y Mroginski (1993) dicen que se puede presentar una pérdida considerable de material vegetal por necrosis como consecuencia de la oxidación de algunos compuestos fenólicos; esto puede ser la razón por la cual al repetir la experiencia con el medio MS al de 100% de su formulación el resultado fue el mismo: contaminación por microorganismos e incipiente desarrollo de la plántula un color amarillento en sus tallos y nunca se originó algún primordio de raíz.

En el segundo método para la propagación de la Candelilla *in vitro* se observó que durante el proceso de desinfección, el Captan inhibió a los hongos presentes en la superficie del tallo de la planta, así también el Tween 80 removió a los hidrocarburos presentes sobre la cutícula y de esta manera el cloro abatió a los contaminantes bacterianos inmersos entre las capas de cera, la adición del carbón activado permitió inhibir los compuestos fenólicos liberados por la planta al medio, los cuales son causantes del bloqueo de aquellas actividades enzimáticas relacionadas con la síntesis de proteínas y de la respuesta de la planta al efecto de diferentes hormonas y reguladores de crecimiento (Roca y Mroginski, 1993).

En la inoculación de la bacteria en la planta *in vitro* con 10 μ L se pudo observar la asociación bacteria-raíz la cual se corroboró mediante su reaislamiento de los tejidos de las raíces inoculadas esto comprueba que las bacterias pueden asociarse a las plantas, y como dice Preston *et al.*, (1998), las bacterias asociadas a las plantas intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para adaptación y colonización. Las bacterias capaces de interactuar con las raíces de las plantas son atraídas por sustancias excretadas por la raíz, y de esta forma dan inicio a una relación de beneficio mutuo. Al contrario de la inoculación que se hizo con 100 μ L que probablemente debido a la concentración tan alta ocasiono una invasión masiva que por la cantidad de metabolitos liberados en el interior de la planta, ocasionaron necrosis tisular de la raíz y la plántula , causando procesos de oxidación tanto en la zona de penetración como a nivel sistémico.

El estudio de la microestructura de la planta de Candelilla permitió observar la presencia de las bacterias inoculadas del género *Bacillus* sp establecidas dentro y fuera de la zona cortical de raíces de las plantas inoculadas con la cepa 5+ y cepa 7-.

En las tinciones de los cortes transversales de los tallos de la Candelilla se pudieron distinguir a los conductos laticíferos, principalmente en aquellos tratados con la tinción de verde rápido, aquí se apreciaron que esos conductos que desembocaban en la proximidad de los estomas interpuestos en la cutícula, lo que sugiere que es por esta vía que se excreta la cera de la Candelilla. Además de que son los estomas las únicas aperturas excretoras presentes en la corteza de las plántulas a esa edad, otro hecho que refuerza esta idea, es la cantidad de cera que en un periodo tan corto de vida de la planta, logra recubrirla. Los laticíferos son células individuales o en grupo que acumulan un líquido llamado látex, es una sustancia lechosa que se genera de algunas plantas como las Euforbiaceas. En la actualidad existen discrepancias con respecto a la función desempeñada por esta estructura, ya que no se sabe si constituye un mecanismo de defensa de la planta o un sistema de secreción interna (García, 2009).

Por otro lado los cortes de la base de las plantas de la Candelilla teñidos de Sudan IV, permitió observar una capa gruesa de cera acumulada sobre la cutícula de las plantas inoculadas con las cepas de *Bacillus* sp 5+ y 7-. A diferencia de los cortes de las plantas testigo en donde el espesor de la capa de cera fue delgado.

En espectroscopia Raman se identificaron principales componentes químicos de su estructura, aunque sobre esto no hay suficiente información.

Las diferencias en los espectros Raman se observó en el testigo un doblete, esto se puede deber probablemente a diferencias fisiológicas de la planta que esté realizando en su crecimiento, al contrario de las plantas inoculadas donde presentó un somero doblete que quizá este influyendo la concentración de inóculo de las bacterias promotoras de crecimiento y no esté realizando el mismo mecanismo en la planta de Candelilla.

6. CONCLUSIONES

- La extracción de la cera de la Candelilla es una actividad primordial para los habitantes del desierto de Chihuahua.
- En las condiciones establecidas en el invernadero, la Candelilla no se propaga a partir de un rizoma.
- La propagación de la Candelilla es más factible a partir de rizomas con tres tallos.
- Es posible aislar bacterias endofíticas del género *Bacillus* sp de la planta de Candelilla.
- Existen *Bacillus* endofíticos en la Candelilla que se adaptan y metabolizan el ácido carboxílico 1-amino-ciclo-propano (ACC) y la producción de AIA de estas cepas, no tiene relación con el desarrollo en el medio con ACC.
- Para un cultivo *in vitro* de la Candelilla, se requiere de una aseptización profunda, que inhiba a los microorganismos incluidos en la cera que recubre a los explantes, así como un medio Murashige Skoog adicionado con carbón activado, el cual es elaborado a partir de Soluciones Madre.
- En la propagación *in vitro* de la Candelilla el medio de Murashige y Skoog a base de sales se requiere adicionar más Bencil-aminopurina BAP (1 mg/L) para promover la emisión de raíces.
- Con el inóculo de 10 μ L en concentración de 1×10^8 UFC/mL se logró demostrar la asociación bacteria-raíz.
- Se observó que la vía por la cual es posible que se secrete la cera de la Candelilla son los conductos laticíferos los cuales llegan a los estomas.
- El género *Bacillus* sp endofíticamente, induce cambios fisiológicos en la planta de la Candelilla que promueven la secreción de la cera hacia la superficie de la planta.

- La cera de Candelilla está compuesta de hidrocarburos, ésteres y una larga cadena de ácidos grasos.
- El género *Bacillus* sp endofítico induce cambios fisiológicos en la planta de Candelilla que promueve la secreción de cera hacia la superficie cuticular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkus O., Adar F., and M. B. Schanffler. 2004. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. 34:443-453 pp.
- Alonso Navarro J. L., y G. Álvarez Rodríguez. 2011. Diagnóstico de la cadena productiva de cera de Candelilla en el estado de Coahuila. Programa de apoyo de la Financiera Rural para acceder al crédito y fomentar la integración económica y financiera para el desarrollo rural. Saltillo Coahuila. 1-69 pp.
- Arshad, M., y Jr. W. T. Frankenberger. 1998. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*. 62:45-151 pp.
- Bashan, Y., Holguín, G y R. Ferrera-Cerrato.1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra*. 14:195-210 pp.
- Bashan, Y., Holguin, G., and L. E. De-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50:521-577 pp.
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Arzón, R., y C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56(417):1761-1778 pp.
- Bell, C. R., Dickie, G. A., Harvey, W. L. and J. M. Chain. 1995. Edophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:46-53 pp.
- Berg, G., and J. Hallmann. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In: Schulz, B., Boyle, C., and T. Sieber. (eds). *Microbial root endophytes*. Berlin-Heidelberg, D. E., Springer-Verlag. *Soil Biology*. 9:53-69 pp.
- Bochow, H., Gatcheva, K., and Vanchter, A. 1995. Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. Fourth International Symposium on Soil and substrate infestation and disinfestation, Leuven, Belgium. *Acta-Hort. (ISHS)*. 382:164-172 pp.

- Boonjawat, J., Chaisiri, P., Limpananont, J., Soontaros, S., Pongsawasdi, P., Chaopongpang, S., Pornpattkul, S., Wongwaitayakul, B., and L. Sangduan. 1991. Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria. *Plant Soil* 137:119-125 pp.
- Bowen, G. D. y A. D. Rovira. 1999. The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66:1-102 pp.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., and L. C. Mitchell. 2000. *Biology*. 6ta. Edición. Editorial Benjamin Cummings. 324 p.
- Cisne, J. D. 1998. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agr. Nicaragua, Universidad Nacional Agraria. 89 p.
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., and E. A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 17(9):4951-4959.
- Crowley, D. E., Wang, Y. C., Reid, C. P., and P. J. Szaniszlo. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil*. 130:179-198 pp.
- D'Ambrogio, A. de Argüeso. 1986. Manual de técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur, B. A. 24 p.
- De la Garza, F. E. y R. C. A. Berlanga. 1993. Metodología para la evaluación y manejo de Candelilla en condiciones naturales. Folleto Técnico No. 5. SARH; INIFAP; CIRNE; C.E. "La Saucedá". Coahuila. 45 p.
- De León-Zapata, M. A. 2008. Mejoras tecnológicas al proceso de extracción de cera de Candelilla. Tesis profesional. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México. 58 p.
- Dominguez-Lara, H. 2004. La Candelilla su cera y su cultura. "De la Paila al lustre del bolero y el glamour de la pasarelas". *Crónicas del Camino Real*. 3 (28):19-22 pp.
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey R. M., and N. Ahmad. 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertilizer Researc*. 42:339-346 pp.

- Echegaray-Aleman, A. 1995. Ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. 7-35 pp. In: Ferrera-Cerrato, R y J. Pérez-Moreno. (eds). Agro-Microbiología element útil en agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 4:45-50 pp.
- Elmerich, C., Zimmer, W., and C. Vieille. 1992. Associative nitrogen fixing bacteria. 212-258 pp. In: Stacey, G., Burris, R. H., y H. J. Evans (eds). Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall. New York. 3:34-39 pp.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., Isawa, T., Mitsui, H., and K., Minamisawa. 2001. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. Applied Environmental Microbiology. 67:5285-5293 pp.
- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 62:96-100 pp.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology. Exegetics, Limited. England. 5:120-123 pp.
- Gordon, S. A., and R. P. Weber. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiology. 26:192-195 pp.
- Gray, E. J. and Smith, D. L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. Soil Biology and Biochemistry. 37:395-412 pp.
- Hallmann, A., Quadt-Hallmann, W. F., Mahaffee and W. J. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43:895-914 pp.
- Handelsmann, J., and E. V. Stabb. 1996. Biocontrol of soilborne pathogens. Plant Cell. 8:1855-1869 pp.
- Hernández A., Rives N., Caballero A., Hernández A. N., y Mayra Heydrich. 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo de maíz en la producción de metabolitos AIA, sideróforos y ácido salicílico. Revista Colombiana de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 6(001):6-13 pp.

- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M. and E. Kellenberger. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal in Biotechnology*. 176:1913-1923 pp.
- Jacobson C. B., Pasternak J. J., and B. R. Glick. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate desaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal Microbiology*. 40:1019–1025 pp.
- Jensen, W. A. 1962. *Botanical histochemistry. Principles and practice*. W. H. Freeman & Company, San Francisco, California, USA. 408 p.
- Kim, S. J., and R. J. Kremer. 2005. Scanning and transmission electron microscopy of root colonization of mormingglory (*Ipomoea* spp.) seedlings by rhizobacteria. *Symbiosis*. 39:117-124 pp.
- Kloepper, J.W. and C. J. Beauchamp. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 38:1219-1232 pp.
- Kloepper, J. W., Lifshitz, R., and R. M. Zablutowicz. 1999. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology*. 7:39-44 pp.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266 pp.
- Kloepper, J. W. and C. M. Ryu. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: Schulz, B., Boyle, C., and T. Sieber. (eds). *Microbial root endophytes*. BerlinHeidelberg, D.E., Springer-Verlag. *Soil Biology*. 9:33-52 pp.
- Koneman, E.W. 2001. *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas de color*. Sexta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 14: 690-701pp.
- Kokalis-Burelle, N., Kloepper, J.W. and M.S. Reddy. 2006. Plant growthpromotingrhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. *Applied Soil Ecology*. 31:91-100 pp.
- Larrea O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 62: 96-100 pp.

- Lodewyckx, C., Mergeay, M., Vangronsveld, J., Clijsters, H. and D. Van der Lelie. 2002. Isolation, characterization and identification of bacteria associated to the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *International Journal of Phytoremediation*. 4:101-115 pp.
- Loeffler, W., Tschen, S. M., Vamittanakoon, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. F., and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of *Bacilysin* and *Fengymycin* from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*. 115:204-213 pp.
- López M., F. Carrillo., M. C. Gutiérrez and M. Crespi. 2007. Alternative methods for the wool wax extraction from wool scouring wastes. *Grasas y Aceites*. 58(4):402-407 pp.
- McKeen, C. D., Reilly, C. C., and P. L. Pusey. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 76:136-139 pp.
- McSpadden B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In *Agricultural Systems*. *Phytopathology*. 94:1252-1258 pp
- Mahaffee, W. F. and J.W. Kloepper. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb. Ecol.* 34:210-223 pp.
- McSpadden Gardener, B. B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. In *agricultural systems*. *Phytopathology*. 94:1252-1258 pp.
- Molist G. P., Pombal D. M. A. y Manuel Megias Pacheco. 2009. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. España. 4:1-6 pp.
- Maldonado, A. L. 1979. Caracterización y uso de los recursos naturales de las zonas áridas. *Ciencia Forestal*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIF). México. 4(20):56–64 pp.
- Muna, A., Ahmad, A. y K. Abdul-Arhman. 1999. *In vitro* Propagation of a Semi-Dwarfing Cherry Rootstock. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 59(3):203-208 pp.

- Munir A., Munir I., Afrasyab S., and S. hasnain. 2003. Growth stimulatory effects of *Azospirillum* strains on *Triticumaestivum* and *Vigna radiate*. *Biotechnology*. 2:198-205 pp.
- Nakamura L. K., Roberts K. M., and F. M. Cohan. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* subsp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49:1211-1215 pp.
- Nelson, L. M. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. *Crop Management* doi: 10.1094/CM-2004-0301-05-RV.
- Okon, Y., and C. A. Labandera-González. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*. 26:1591-1601 pp.
- Pereira, M., Rolo, R., Rodríguez, O., y V. Ávila. 1993. Selección de cepas de *Azospirillum* en gramíneas promisoras bajo condiciones de casa de cristal. *Pastos y Forrajes*.16:251 p.
- Prescott L. M., Harley P. J., and A. D. Klein. 1999. *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana de España. 5ta. Ed. 7:504-578 pp.
- Preston, G. Haubold, B. and P. Rainey.1998. Bacterial genomics and adaptation to life plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbioses. *Current Opinion in Microbiology*.1:589-597 pp.
- Puente, M. E., and Y. Bashan. 1993. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* strains on the germination and seedlings growth of the giant columnar Cardon cactus (*Pachycereus pringlei*). *Symbiosis*. 15:49-60 pp.
- Rahman, M. S., Ano T. and M. Shoda. 2006. Second Stage Production of Iturin A by Induced Germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*. 18:226-229 pp.
- Roca, W. M., and L. A. Mroginski. 1993. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT. 32 p.

- Rodgers, P. B. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. *Pesticide Science*. 27:155-164 pp.
- Rodríguez M. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. In: Ferrera-Cerrato R. y J. Pérez M. (eds). *Agro-microbiología: Elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 105-126 pp.
- Rojas, M. R., Saucedo P. S., De León, Z. M. A., Jasso, C. D. y Cristóbal N. Aguilar. 2009. Ensayo Pasado, Presente y Futuro de la Candelilla. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. México, D.F. 2(6):7-18 pp.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C., and Silva D.O. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries, *Letter in Applied Microbiology*. 33(2):117-121 pp.
- Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. I., and H. Guerra. *Microbiología*. 1993. *Mecanismos de las enfermedades infecciosas*. Ed. Panamericana. 2da. Edición. Buenos Aires. 2:23-42 pp.
- SEMARNAT. 2005. Informe técnico sobre la Candelilla, CITES. México. 3 p.
- Starr, M. (1981). *The Prokaryotes*, volumen 2. Edited by Springer-Verlang, Berlín Heidelberg. 1106-2284 pp.
- Trigiano, N., and J. Gray. 2000. *Plant tissue, culture concepts and Laboratory exercises*. 2da. Edition. United States of America: CRC Press LLC. Boca Ratón, FL. 10:256-260 pp.
- Utkhede, R. S., Koch, C. A., and J. G. Menzies. 1999. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythiumaph anidermatum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 21:265-271 pp.
- Venegas, G. J., Salazar, R. H., Angoa, P. M. V., Mena, V. H. G. y E. J. Medellín, N. 2010. Generation of a Substrate Sustainable Nutritionally Based on Coir Fiber dust for Greenhouse Broccoli (*Brassica oleracea*) Production. In: *TOPIC: Emerging Technologies*. 4th. International Congress. Boca del Río, Veracruz, México. 29-32 pp.

- Vessey J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255:571-586 pp.
- Van Peer, R., Niemann, G. J., and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*. 81:728-734 pp.
- Wakita J., Shimada H., Itoh H., Matsuyama T., and M. Marsushita. 2001. Periodic Colony Formation by Bacterial Species *Bacillus subtilis*. *Journal of the Physical Society of Japan*. 70:911-919 pp.
- Weller, D. M. 1998. Biological control of soilborne plant pathogens with bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:379-407 pp.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. and A. K. Vidaver. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5):2198-2208 pp.

8. REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- Canales, E., Canales Martínez y E. M. Zamarrón. 2006. Candelilla, del desierto mexicano hacia el mundo. CONABIO. Biodiversitas. 69:1-5 pp. Fecha de consulta: 18 de Abril de 2012. Disponible en:
<http://www.conabio.gob.mx/otros/biodiversitas/doctos/pdf/biodiv69.pdf>
- CONABIO. 2009. Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. Disponible en:
<http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/edoConservacion.html>
- CONAFOR. 2009. Gerencia de Plantaciones Forestales Comerciales. Catálogo de recursos forestales maderables y no maderables. 9 p. Disponible en:
http://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Catalogo_de_recursos_forestales_M_y_N.pdf
- Decimoctava reunión del Comité de Flora, Buenos Aires (Argentina), 17-21 de marzo de 2009. Evaluación del estatus de *Euphorbia antisyphilitica* en México dentro de los apéndices de la CITES. 10-13 pp.
<http://www.cites.org/common/com/PC/18/X-PC18-Inf10.pdf>
- INEGI. 2011. Principales resultados por localidad Coahuila de Zaragoza. XII Censo General de Población y Vivienda 2000. Fecha de consulta: 05 de noviembre de 2012.
http://buscador.inegi.org.mx/search?tx=La+Constancia%2C+Coahuila+de+Zaragoza&CboBuscador=default_collection&q=La+Constancia%2C+Coahuila+de+Zaragoza&site=default_collection&client=frontend_1&output=xml_no_dtd&proxystylesheet=frontend_1&getfields=&entsp=a_inegi_politica&Proxyreload=1&numgm=5
- Instituto de la Candelilla. 2004. Fecha de consulta: 18 de Abril de 2012. Disponible en:
<http://candelilla.org/es/planta.htm>

- Instituto de la Candelilla. 2008. La planta de candelilla. Fecha de consulta: 23 de abril de 2011.
<http://www.candelilla.org/es/>.
- García Breijo, Francisco José. 2009. Tema 5b: Tejidos Secretores. Universidad Politécnica de Valencia. Consultado el 10 de Septiembre de 2011. Disponible en:
<http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas%20PDF/Tema%205b%20Secretores.pdf>
- Multiceras, 2007. Pro-candelilla. Fecha de consulta: 3 de septiembre de 2011.
<http://www.multiceras.com.mx/pro-candelilla.htm>.
- Noriega, Sofía. 2010. Inforural. Diario de Coahuila. Fecha de consulta: 20 de Abril de 2012. Disponible en:
http://www.inforural.com.mx/noticias.php?&id_rubrique=203&id_article=61190
- Taller Nacional de Candelilla. 2008. Conservación, uso y comercio de la Candelilla. Taller Nacional. 11:1-3 pp. Fecha de consulta: 12 de agosto de 2012.
<http://www.conabio.gob.mx/institucion/boletines/pdf/BP011Taller%20candelilla-DEF18dic08.pdf>.
- Mendoza, Mario. 2010. Los productos con cera de Candelilla podrán exportarse sin CITES. Planeta Azul, periodismo ambiental. Fecha de consulta: 20 de Febrero de 2011. Disponible en:
<http://www.planetaazul.com.mx/www/2010/03/24/los-productos-con-cera-de-candelilla-podran-exportarse-sin-permiso-cites/>
- Puente, M. L., García, J. E. y A. Peticari. 2010. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal empleados en trigo. INTA-Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno. Publicación Miscelánea 116: 39-44 pp. Fecha de consulta 24 de Febrero de 2011. Disponible en:
http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/miscelaneas/116/misc116_39.pdf