CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO, DESARROLLO, PRODUCCIÓN, MORFOMETRÍA ESTOMÁTICA Y PERFIL ANTIOXIDANTE DE PLÁNTULAS DE *Moringa oleifera* Lam., INOCULADAS CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

José Leonardo Ledea Rodríguez

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2022.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 17 horas del día 23 del Mes de Febrero del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO, DESARROLLO, PRODUCCIÓN, MORFOMETRÍA ESTOMÁTICA Y PERFIL ANTIOXIDANTE DE PLÁNTULAS DE *Moringa oleifera* Lam., INOCULADAS CON RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL"

Presentada por el alumno:

José Leonardo Ledea Rodríguez

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

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

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Alejandro López Cortés
Revisor de tesis

Dr. José Jesús Bustillos Guzmán
Revisor de tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Revisora de tesis

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Revisor de tesis

Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Revisora de tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos

CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

La Paz, Baja California Sur, a 22 de febrero de 2022.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante –José Leonardo Ledea Rodríguez- del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales (Orientación en Agricultura Sustentable), revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
  iThenticate®
- Filtros utilizados:
  -Citas y referencias bibliográficas excluidas
  -Coincidencias inferiores a 15 palabras
- Porcentajes de similitud:
  Se muestra captura de pantalla

Informe de Originalidad

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.revista.ccba.uady.mx Internet	4082 palabras — 12%
2	www.scielo.org.mx Internet	65 palabras — < 1%
3	sedici.unlp.edu.ar Internet	42 palabras — < 1%
4	es.scribd.com Internet	39 palabras — < 1%
5	sired.udenar.edu.co Internet	39 palabras — < 1%
6	mat.izt.uam.mx Internet	37 palabras — < 1%
7	www.scribd.com Internet	32 palabras — < 1%
8	Z.F. Ma, J. Ahmad, H. Zhang, I. Khan, S. Muhammad. "Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (Moringa oleifera) as a potential functional food", South African Journal of Botany, 2019 Crossref	25 palabras — < 1%

Firmas del comité

Dr. Alejandro López Cortés
Revisor

Dr. José J. Bustillos Guzmán
Revisor

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Revisora

Dra. Bertha O. Arredondo Vega
Revisora

Dr. Víctor M. Chávez Ávila
Revisor

Conformación de Comité

Comité Tutorial
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Juan José Reyes Pérez
Universidad Técnica Estatal de Quevedo.
Co-Director de Tesis

Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. María Goretty Caamal Chan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Thelma Castellanos Cervantes
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis
Dr. Alejandro López Cortés
Dr. José Jesús Bustillos Guzmán
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega
Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Jurado de Examen
Dr. Alejandro López Cortés
Dr. José Jesús Bustillos Guzmán
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila
Dra. Bertha Olivia Arredondo Vega

Suplentes
Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel
Dr. Héctor Cirilo Fraga Palomino

Resumen

La especie *Moringa oleifera* Lam. es un árbol caducifolio que se utiliza en la alimentación y tratamiento de enfermedades de humanos y animales. El objetivo del presente estudio fue caracterizar el crecimiento, producción, desarrollo, morfología estomática y composición bioquímica de *M. oleifera* Lam. inoculada con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (*Bacillus niacini* (Y11), *Moraxella osloensis* (Y13), *Bacillus cereus* (A11) y *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843) en condiciones de invernadero. Los resultados de la morfología estomática muestran que, las hojas de plantas inoculadas con *B. cereus* presentaron estomas más pequeños, respecto al resto de los inóculos y control (CT). En el caso de *M. osloensis,* esta indujo cambios ($P \leq 0.001$) en el largo y ancho de los estomas; las hojas al resultaron hipostomática de paredes anticlinales onduladas y aparatos estomáticos anomocíticos. En la evaluación del crecimiento y desarrollo de plantas inoculadas con PGPR, *A. brasilense* promovió una mayor altura en la planta (67.17 cm) ($P \leq 0.01$) respecto al control (43.54 cm); *M. osloensis* y *B. cereus* en conjunto, incrementaron ($P \leq 0.001$) el número de hojas (11.45 y 11.85, Vs 8.68 del CT, respectivamente). En cuanto a los rendimiento de biomasa seca (BS) de hojas y planta íntegra (PI) las plantas inoculadas con *B. cereus* propiciaron mayores ($P \leq 0.01$) rendimientos de biomasa seca (BS) de hojas (0.80 *Vs* 0.26 t BS ha^{-1} del control) y planta íntegra (12.92 *Vs* 5.52 t BS ha^{-1} del control). En cuanto a la morfofisiología de la planta, *B. cereus* promovió ($P \leq 0.01$) el desarrollo de área foliar (AF) (20.28 cm^2); índice de área foliar (IAF) (21.13) y duración del área foliar (DAF) (4.78 $cm^2 día^{-1}$) respecto al CT (13.9 cm^2; 14.71; -1.57 $cm^2 día^{-1}$, para AF, IAF y DAF, respectivamente), mientras que las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR) fueron mayores con los inóculos *A. brasilense* y *M. osloensis* en TCA (1.037 y 0.93 cm^2 $día^{-1}$ *Vs* 0.12 del CT) y TCR (0.014 cm $día^{-1}*10^{-3}$ con ambos inóculos *Vs* 0.002 cm $día^{-1}*10^{-3}$ del CT). Los inóculos bacterianos no promovieron diferencias ($P \geq 0.05$) en la concentración de pigmentos fotosintéticos ni de polifenoles totales, pero sí ($P \leq 0.001$) en el contenido de flavonoides totales respecto al CT (6.22 mg equivalente de Quercetina g $extracto^{-1}$). Respecto a la composición mineral de la planta, la concentración de elementos minerales en hojas solo manifestó diferencias significativas ($P \leq 0.001$) en el contenido de Mg^{2+} y K^+ promovidas por B. *niacini*. Mediante análisis de componentes principales (ACP) del contenido mineral de raíces se logró explicar el 79.1% de la varianza en dos componentes, las PGPR facilitaron el incremento del contenido de K^+, Br^+ y P^{+3}, y para el análisis de hojas, se observó en el ACP con tres componentes y 80.24% de la explicación de la varianza, la presencia de Mn^{2+}, Zn^{2+}, Si^{4+} y Al^{3+}. En conclusión, los inóculos de PGPR inoculados a plantas de *Moringa* en condiciones de invernadero modificaron la morfología de hojas y estomas destacándose *B. cereus*, todos los inóculos estimularon el crecimiento en función de la altura respecto a CT, prevaleciendo los efectos de *A. brasilense*; en la diversificación del perfil antioxidante *B niacini* promovió concentraciones de flavonoides totales y diferenció el contenido de Mg^{2+} y K^+ en el orden de los minerales, en la concentración de pigmentos fotosintéticos y polifenoles totales las PGPR no fueron efectivas.

Palabras claves: *Moringaceae*, *Brassicales*, PGPR, Baja California Sur, metabolitos secundarios.

ORCID, 0000 0001 5195 1496

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Juan José Reyes Pérez

Summary

The species *Moringa oleifera* Lam. It is a deciduous tree that is used in food and treatment of human and animal diseases. The objective of the present study was to characterize the growth, production, development, stomatal morphology and biochemical composition of *M. oleifera* Lam. inoculated with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) (*Bacillus niacini* (Y11), *Moraxella osloensis* (Y13), *Bacillus cereus* (A11) and *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843)) under greenhouse conditions. The stomatal morphology results, the leaves of plants inoculated with *B. cereus* presented smaller stomata, compared to the rest of the inoculums and control (CT). In the case of *M. osloensis*, this induced changes ($P \leq 0.001$) in the length and width of the stomata; the leaves were hypostomatic with wavy anticline walls and anomocytic stomatal apparatuses. In the evaluation of the growth and development of plants inoculated with PGPR, *A. brasilense* promoted a greater height in the plant (67.17 cm) ($P \leq 0.01$) compared to the control. (43.54 cm); *M. osloensis* and *B. cereus* as a whole, increased ($P \leq 0.001$) the number of leaves (11.45 and 11.85, Vs 8.68 of the TC, respectively). Regarding the dry biomass yield (DBY) of leaves and whole plant (WP). The plants inoculated with *B. cereus* led to higher ($P \leq 0.01$) yields of dry biomass of leaves (0.80 Vs 0.26 t DBY ha^{-1} of the control) and WP (12.92 Vs 5.52 t DBY ha^{-1} of the control). Regarding the morphophysiology of the plant, *B. cereus* promoted ($P \leq 0.01$) the development of leaf area (LA) (20.28 cm^2); leaf area index (LAI) (21.13) and duration of leaf area (DLA) (4.78 cm^2day^{-1}) with respect to TC (13.9 cm^2; 14.71; -1.57 cm^2day^{-1}, for LA, LAI and DLA, respectively), absolute growth rate (AGR) and relative (RGR) growth rate were higher with the *A. brasilense* and *M. osloensis* inocula in AGR (1.037 and 0.93 cm^2 day^{-1} Vs 0.12 cm^2 day^{-1} of the CT) and RGR (0.014 cm day^{-1} * 10^{-3} with both inoculums Vs 0.002 cm day^{-1} * 10^{-3} of the CT). Bacterial inocula did not promote differences ($P \geq 0.05$) in the concentration of photosynthetic pigments or total polyphenols, but did ($P \leq 0.001$) in the content of total flavonoids with respect to TC (6.22 mg equivalent of Quercetin g $extract^{-1}$). Regarding the mineral composition of the plant, the concentration of mineral elements in leaves only showed significant differences ($P \leq 0.001$) in the content of Mg^{2+} and K^+ promoted by *B. niacini*. Through principal component analysis (PCA) of the mineral content of roots, it was possible to explain 79.1% of the variance in two components, the PGPR facilitated the increase of the content of K^+, Br^+ and P^{3+}, and for the analysis of leaves, it was observed in the PCA with three components and 80.24% of the variance explanation, the presence of Mn^{2+}, Zn^{2+}, Si^{4+} and Al^{3+}. In conclusion, the inocula of PGPR inoculated to Moringa plants under greenhouse conditions modified the morphology of leaves and stomata, highlighting *B. cereus*, all the inoculars stimulated growth as a function of height with respect to CT, prevailing the effects of *A. brasilense*; in the diversification of the antioxidant profile *B niacini* promoted concentrations of total flavonoids and differentiated the content of Mg^{2+} and K^+ in the order of minerals, in the concentration of photosynthetic pigments and total polyphenols the PGPR were not effective.

Key words: *Moringaceae*, *Brassicals*, PGPR, Baja California Sur, secondary metabolites.

DRCID, 0000 0001 5195 1496

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Juan José Reyes Pérez

Dedicatoria

A mi pupila Jazmín Itzel Ledea Morales, que este sea el principio de muchos logros en aras de brindarte la educación, amor y dedicación que vas a demandar y necesitar.

A mi madre, piedra angular de mi vida y testigo silente de todos los esfuerzos para el desarrollo personal y profesional, a ella dedico esta humilde obra científica.

A mi familia que no solo se resume a mi madre, hija y esposa, sino que va mucho más allá de tías y primos, ya que fueron en su totalidad, fuente inagotable de estímulo.

A mi esposa Yenni Morales Cristóbal, que, desde su concepción, acompañó y apoyó el desarrollo de esta modesta obra.

Agradecimientos

Agradezco al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico mediante el otorgamiento de beca Nº 939024 para estudios de postgrado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) como entidad receptora por haberme aceptado y acogido como estudiante.

A mis Codirectores de Tesis, Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez y Dr. Juan José Reyes Pérez, por su tutelaje y participación en cada una de las etapas de mi realización de esta tesis Doctoral.

A los miembros de mi Comité Tutorial, Dra. Thelma Rosa Castellano Cervantes, Dra. Elizabeth Monreal Escalante, Dra. María Goretty Caamal Chan, por sus orientaciones oportunas en el periodo de realización del doctorado y las correcciones de todos mis trabajos.

En el período de estudios, acontecieron situaciones académicas y momentos circunstanciales para mí permanencia en el centro, en los cuales intervinieron algunas personas que ameritan el reconocimiento, en las que el orden de aparición no tiene nada que ver con la significación del agradecimiento.

Primeramente, debo plasmar aquellas personas que en el ámbito académico me permitieron llegar al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Dr. Diocles Benítez Jiménez. Profesor Titular de la Universidad de Granma. Investigador Titular del Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov” de Cuba. Por su ayuda profesional e incondicional en mi formación como investigador y crecimiento personal por más de 10 años, y aún desde la distancia perseveró en el acompañamiento intelectual y científico-técnico.

Dra. Yanelis Camejo. Investigadora Auxiliar. Directora de Ciencia del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba (INCA). Por su apoyo moral y a la cual le debo haber llegado a México.

Dr. Luis Guillermo Hernández Montiel. Investigador del CIBNOR. Nivel II del Sistema Nacional de Investigadores (SNI). Por su aceptación en una primera ocasión de trabajo mancomunado, por contribuir a mi formación profesional y corregir mi formación en el ámbito académico con acertados consejos.

Y de forma continua, aquellos que con su profesionalidad y delicadeza humana contribuyeron a mi formación y que mi estancia en el CIBNOR, como extranjero, fuera amena.

Los técnicos Álvaro González Michel y Juan Vega Mayagoitia del Laboratorio de Hidrología e Irrigación del CIBNOR, por su contribución en las primeras experiencias de investigación que desarrollé en la Península de Baja California Sur.

El técnico Arturo Cruz Falcón del Laboratorio de Hidrología e Irrigación del CIBNOR por su apoyo en insumos para los controles de temperatura y humedad durante la experimentación del presente estudio.

Maestro en Ciencias (M. C.) Margarito Rodríguez Álvarez, técnico del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR, por su orientación y supervisión en el proceso de aprendizaje en técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*.

En postgrado a la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra (directora de postgrado hasta 2019), Lic. Osvelia Ibarra Morales y Lic. Leticia González Rubio Rivera, por su profesionalidad y apoyo moral cuando se encausaron improcedencias acerca de condición de estudiante y estancia como extranjero en el CIBNOR, esta institución necesita más personas como Uds.

Dr. Orestes La O León de la Universidad Nacional de Lojas, Ecuador por el apoyo moral en aquellos momentos de oscuridad que siempre acompañan el desarrollo de una obra intelectual, y que en ocasiones se nos dificulta enfrentar por inexperiencia.

Dra. Daiki Valenciaga del Instituto de Ciencia Animal, Cuba por compartir sus contactos profesionales en aras de mi desarrollo profesional y la concepción de una obra académica con rigor científico.

M. C. Ángel Edgardo Carrillo García, responsable del Laboratorio Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR, por compartir su experiencia en el área de microbiología, y darme la oportunidad de aprender haciendo de forma práctica las diferentes técnicas que hicieron posible, el desarrollo de las actividades con las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

M. C Ariel Arturo Cruz Villacorta, responsable del Laboratorio de Microscopia Electrónica por compartir su vasta experiencia en procedimientos para la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), y otras disciplinas anexas que indudablemente desvelaron mi pasión por ellas y su inclusión en las próximas líneas de investigación.

A la memoria del Dr. Rogelio Ramírez Serrano por permitirme usar parte de sus equipos de trabajo (Campana de Flujo Laminar), para poder cumplir con los compromisos investigativos en tiempo.

A mi compañero de postgrado, MC Jorge Alberto Alejandre Rosas doctorante de la Universidad Veracruzana, por sus consideraciones en función de presentación de los resultados y tips para el entendimiento con profesionales mexicanos.

A mi Comité tutorial, gracias por el asesoramiento, conducción y aportes a mi formación científico-técnica.

Un agradecimiento especial a la Dra. Lilia Alcaraz Meléndez por haberme recibido como su estudiante y darme la oportunidad de conocer las aristas de la Biotecnología Vegetal para convertirla en el futuro profesional en un área de trabajo.

A todos, incluso a los que no alcance a nombrar, MUCHAS GRACIAS.

Contenido

Resumen i
Summary ii
Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Contenido vi
Lista de figuras ix
Lista de tablas x
Abreviaturas xi
1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 4
2.1 Género Moringa 4
2.2 Compuestos fitoquímicos 6
2.3 Compuestos con capacidad antioxidante aislados de M. oleifera 7
2.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS) 11
2.5 Actividad antioxidante de los fitoquímicos vegetales frente al estrés oxidativo 11
2.5.1. Mecanismos de los antioxidantes frente a las ROS 13
2.6 Alternativas de cultivos para la diversificación del perfil químico de las plantas 17
2.7 Cultivo de tejido in vitro de Moringa oleifera. Experiencias en la diversificación del perfil químico. 20
2.7.1 Interacción entre rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y plantas. 21
2.8 Las PGPR y su intervención en la modificación de la anatomía foliar y morfología de estomas. 26
2.9 Absorción de minerales, intervención de las PGPR como diversificadoras del perfil mineral de las plantas 29
3. JUSTIFICACIÓN 31
4. HIPÓTESIS 32
5. OBJETIVOS 33
5.1 Objetivo general 33
5.2 Objetivos particulares 33
6. MATERIAL Y MÉTODO 34
6.1 Determinar la efectividad de medios para el cultivo de tejidos in vitro en la germinación, crecimiento y desarrollo de vitroplantas de Moringa oleifera, y su multiplicación 34
6.1.1 Material vegetal 34
6.1.2 Desinfección de semillas 34
6.1.3 Medios de cultivos 35
6.1.4 Condiciones de cultivo 35
6.1.5 Diseño experimental y tratamientos 35
6.1.6 Germinación 36
6.1.7 Crecimiento y desarrollo de plántulas emergidas 36
6.1.8 Multiplicación de plantas 37
6.1.9 Análisis estadístico 38
6.2 Evaluación del cultivo de M. oleifera inoculado con PGPR en condiciones de invernadero 39

6.2.1 Localización, control de temperatura, humedad relativa y preparación de sustrato para la evaluación de plantas inoculadas con PGPR. 39
6.2.2 Condiciones de crecimiento de plantas inoculadas con PGPR 40
6.2.3 Material vegetal 40
6.2.4 Diseño experimental y tratamientos 41
6.2.5 Reactivación de cepas bacterianas 41
6.2.6 Preparación de inóculos 42
6.2.7 Aplicación de inóculos bacterianos 43
6.3 Evaluación de la morfología estomática de plantas de M. oleifera inoculadas con ribacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en condiciones de invernadero...43
6.3.1 Mediciones en las plantas inoculadas con PGPR. Anatomía de hojas y estructura estomática. 43
6.3.2 Procedimiento estadístico 44
6.4. Caracterización del proceso de crecimiento, desarrollo y producción de biomasa de plántulas de M. oleifera inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero....44
6.4.1 Análisis morfológico de plantas inoculadas con PGPR 44
6.4.2 Determinación del rendimiento de biomasa seca en hojas y planta íntegra 46
6.4.3 Mediciones morfo fisiológicas 46
6.4.4 Análisis estadístico 48
6.5 Analizar el contenido de antioxidantes en hojas de plantas de M. oleifera inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero....48
6.5.1 Muestras para determinación de minerales mediante EDX 48
6.5.2 Preparación de extractos para análisis fitoquímicos 48
6.5.3 Pigmentos fotosintéticos 49
6.5.4 Flavonoides y polifenoles totales 50
6.5.5 Análisis estadístico 50
7. RESULTADOS 51
7.1 Germinación.... 51
7.2 Desarrollo de plántulas emergidas....51
7.3 Crecimiento de plántulas.... 52
7.4 Regresión entre germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas....55
7.5 Morfología de estomas y epidermis 57
7.6 Morfofisiología de la planta 62
7.7 Contenido de macro, micro minerales, y elementos benéficos en hojas y raíces de plantas inoculadas con PGPR....68
7.7.1 Pigmentos fotosintéticos y foto protectores 71
7.7.2 Metabolitos secundarios en hojas de plantas de *M. oleifera* inoculadas con PGPR 73
8. DISCUSIÓN 74
9. CONCLUSIONES 97
10. LITERATURA CITADA 98
11. ANEXOS 115
Anexo A. Croquis del experimento de 45 días con bacterias promotoras del crecimiento. (Diseño completamente aleatorizado)....115

Anexo B. Artículo Publicado.-Evaluación de la germinación, desarrollo y multiplicación in vitro de Moringa oleífera Lam en diferentes medios de cultivos.....116
Anexo C.-Crecimiento, desarrollo y calidad de plántulas de Moringa Oleifera (Lamark) inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....141

Lista de figuras

Figura 1. Dendrograma de *Moringa* según fragmentos de ADN. Adaptado de Olson (2002), mediante BioRender.com. 4
Figura 2.Uso de fracciones botánicas de *Moringa*. Adaptado de Mora y Guacharná (2015), mediante BioRender.com. 5
Figura 3. Especies ROS con alto potencial reductor. 11
Figura 4. Mecanismos de resistencia y/o apoptosis a nivel celular ante estímulos externos que generan el incremento de ROS en las plantas. (Elaboración propia mediante BioRender.com). .12
Figura 5. Neutralización de radicales libres por antioxidantes. Tomado de Verma et al., (2019).14
Figura 6. Reacción de Fenton a partir de la respiración celular. Tomado de Mittler (2017). 15
Figura 7. Ecología de las PGPR en beneficio al crecimiento y desarrollo de las plantas. (Elaboración propia mediante BioRender.com).....22
Figura 8. Mecanismo directo de las PGPR. Producción de fitohormonas, sinergismos-antagonismo entre ellas, síntesis de otras moléculas. (Elaboración propia mediante BioRender.com).....23
Figura 9. Esquema del mecanismo de inmunidad activada por patrón. (Elaboración propia mediante BioRender.com). 25
Figura 10. Curvas de crecimiento de plántulas de *M. oleifera* germinadas sobre medio MS (A_1-C_1 línea roja), MSG (A_2-C_2 línea negra), Agua-Agar 0.8% (A_3-C_3 línea rojo oscuro) y húmedo (A_4-C_4, línea azul). 54
Figura 11. BIPLOT resultante del análisis de componentes principales del proceso de germinación, brotación y desarrollo de vitro plantas de *M. oleifera*. 56
Figura 12. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Bacillus niacini* (BN): cara Adaxial (BN) (x500), estructura del estoma (BN1) (1.5 k) y cara Abaxial (BN2) (x500).....60
Figura 13. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Moraxella osloensis* (MO): cara Adaxial (MO) (x500), estructura del estoma (MO1) (1.5 k) y cara Abaxial (MO2) (x500).....60
Figura 14. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Bacillus cereus* (BC): cara Adaxial (BC) (x500), estructura del estoma (BC1) (1.5 k) y cara Abaxial (BC2) (x500). 61
Figura 15. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd (AB): cara Adaxial (AB) (x500), estructura del estoma (AB1) (1.5 k) y cara Abaxial (AB2) (x500).....61
Figura 16. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* denominadas control (CT): cara Adaxial (CT) (x500), estructura del estoma (CT1) (1.5 k) y cara Abaxial (CT2) (x500). 62
Figura 17. Contenido mineral (% atómico) en hojas de plántulas de *M. oleifera* de 45 días de edad, mediado por PGPR. 70
Figura 18. Análisis de componentes principales (ACP) en la intervención de PGPR en el contenido mineral de raíces (A) y hojas (B). 71
Figura 19. Promoción de la concentración de flavonoides totales (A) y polifenoles totales (B) por inóculos bacterianos en plantas de *M. oleifera* Lam. 73

Lista de tablas

Tabla 1. Principales compuestos fitoquímicos que se han aislado de hojas de *M. oleifera* Lam....9
Tabla 2. Expresiones de regresión múltiple para el cálculo de Área Foliar en la evaluación con PGPR. 47
Tabla 3. Germinación de semillas de *M. oleifera* en diferentes medios de crecimiento para el cultivo de tejido *in vitro*. 51
Tabla 4. Influencia de medios de crecimiento para el cultivo de tejidos *in vitro* en el desarrollo morfológico de plántulas de *M. oleifera* germinadas *in vitro*.....53
Tabla 5. Morfología estomática de hojas de plantas de *M. oleifera* inoculadas con PGPR durante su crecimiento. 58
Tabla 6. Análisis de covarianza para altura de la planta de *M. oleifera* a los 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento. 63
Tabla 7. Morfología de hojas y tallos de plantas de *M. oleifera* de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.....64
Tabla 8. Comportamiento de indicadores fisiológicos foliares y de crecimiento en plantas de *M. oleifera* de 45días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.....65
Tabla 9. Morfología de la raíz e índices asociados en plantas de *M. oleifera* de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento. 66
Tabla 10. Composición mineral de raíces de plantas de *M. oleifera* de 45 días de edad, inoculadas durante su crecimiento con PGPR. 68
Tabla 11. Concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de plantas de *M. oleifera* de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento. 72

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AEF	Área efectiva foliar
A.c	Antes de Cristo
ACP	Análisis de componentes principales
ACC	Ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico
AF	Área foliar
AG	Ácido giberélico
AGA	Ácido gálico
AIA	Ácido indol-3-acético
AJ	Ácido jasmónico
Al	Aluminio
$AlCl_3$	Cloruro de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
ANACOVA	Análisis de covarianza
AS	Ácido salicílico
atm	Atmósfera
AUX	Auxinas
6-BA	6-benciladenina
6-BAP	6-bencilaminopurina
BS	Biomasa seca
Br	Bromo
CT	Control
CAT	Catalasa
CFT	Contenido fenólico total
Cit	Citoquininas
Cu	Cobre
CO_2	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro cuadrado
CPD	Secador de punto crítico
DA	Duración del área foliar
DDPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPG	Días para germinar
DSMZ	Colección Alemana de Microorganismos
EDX	Energía dispersiva de rayos X
Et	Etileno
Fe	Hierro
Fe^{2+}	Hierro lábil o ferroso
FRAP	Poder antioxidante férrico-reductor
GPx	Glutatión peroxidasa
N2	Nitrógeno atmosférico
NH_4	Ión amonio
nm	nanómetro
NaOCl	Hipoclorito de sodio

NaOH	Hidróxido de sodio
$OH^{\cdot}$	Radial hidroxilo
$^{1}O_2$, O^{-}_2	Oxígeno singulete
GAs	Giberelinas
h	hora
ha	hectárea
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H^{+}	Ión de nitrógeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAF	Índice de área foliar
IBA	Ácido indol-3-butírico
ID	Índice de Dickson
IG	Índice de germinación
IL	Índice de lignificación
IR	Índice de robustez
ISR	Respuesta sistémica inducida
IVG	Índice de velocidad de germinación
K	Potasio
KT	Cinetina
L	litro
LRA	La razón de área foliar
LAT	Latitud
LON	Longitud
lb	libra
M	molar
m^2	Metro cuadrado
mm	milímetro
Mg	Magnesio
mg	miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
µL	Microlitro
µ	micrómetro
MEB	Microscopía electrónica de barrido
Mn	Manganeso
MS	Medio de crecimiento Murashige y Skoog
MSG	Murashige y Skoog más sales de Gamborg
msnm	Metros sobre el nivel del mar
N	Norte
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
NADP	Nicotiamida adenina dinucleotido fosfato (oxidada)
NAA	Ácido 1-naftalenacético
NADPH+H	Nicotiamida adenina dinucleotido fosfato (reducida)
TCA	Tasa de crecimiento absoluto
TCR	Tasa de crecimiento relativo

TMG	Tasa media de germinación
UFC	Unidades formadoras de colonia
µmol m^{-2} s^{-1}	Micromoles por metro cuadrado por segundo
$OH^{\cdot}$	Radial hidroxilo
$^{1}O_2$, O^{-}_2	Oxígeno singulete
O_2^{2-}, $ONOO^{\cdot}$	Radical superóxido
$O^{\cdot}_{-2}$	Anión superóxido
O^{2-}_2	Ión peróxido
O_2	Dioxígeno
op. cit	*Ophra citato* (Obra citada)
P	Fósforo
PPB	Proporción de biomasa
PPH	Proporción de hojas
PAL	Fenilalanina-amonio liasa
PPO	Polifenol oxidasa
PPR	Receptores de reconocimiento de superficie
PPr	Proporción de raíz
PPT	Proporción de tallos
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
PS	Peso seco
PTI	Inmunidad activada por patrón
P/MAP	Patrones moleculares asociados a microbios
pH	Potencial de hidrógeno
p/v	Relación peso-volumen
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RO	Alcoxilo
ROO	Peroxilo
RIS	Respuesta sistémica inducida
rpm	Revoluciones por minuto
R^2	Coeficiente de determinación
Si	Sílice
SOD	Superóxido dismutasa
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares
t	Toneladas
Tt	Tratamientos
TAN	Tasa de asimilación neta
VRA	Vías respiratorias altas
v/v	Relación volumen-volumen
W	Oeste
Zn	Zinc
%	Porcentaje
ºC	Grados Celsius

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas con potencial antioxidante incluyen hierbas, especias y algas marinas (Van Hai, 2015), de las cuales se extraen moléculas químicas que incluyen compuestos fenólicos, polifenólicos, alcaloides, quinonas, terpenoides, lectinas y polipéptidos, que tienen un efecto beneficioso en la salud del hombre y/o animales (Ma *et al.*, 2019).

A estas moléculas se les atribuyen efectos en la promoción del crecimiento, reforzamiento del sistema inmune, estimulantes hormonales y captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, siglas en inglés) que las identifican como antioxidantes por excelencia, efectos que se han probado en ratones, aves de corral y líneas celulares de humanos (Habtemariam y Varghese, 2015; Kou et al., 2018).

El género *Moringa*, es una de las plantas que mayormente ha sido utilizada por la presencia de compuestos secundarios, minerales, vitaminas y aceites esenciales, contribuyendo todos estos compuestos a su actividad antioxidante, alimento funcional y nutraceútico (Leone *et al.*, 2015). Es una planta que pertenece a la familia *Moringaceae*, es originaria del subcontinente indio, pero debido a la extraordinaria plasticidad ecológica que posee se cultiva ampliamente en otras regiones del mundo, incluyendo África, Europa, Asia y Oriente medio (Dou y Kister, 2016), identificada además por su productividad, calidad de biomasa, y su multifuncionalidad debido a que todas sus partes pueden ser utilizadas para diversos fines, por estas particularidades existen referencias de uso desde el año 150 a.C (Mahmood et al., 2010).

Hasta la fecha se han identificado trece especies del género *Moringa* (*M. arborea*, *M. rivae*, *M. oleifera*, *M. longituba*, *M. stenopetala*, *M. concanensis*, *M. pygmaea*, *M. borziana*, *M. ruspoliana*, *M. drouhardii*, *M. hildebrandtii*, *M. ovalifolia* y *M. peregrine*). La especie *M. oleifera* es la más estudiada y utilizada debido a sus propiedades fitoquímicas y farmacológicas relacionadas con la salud humana; señalándose que, 547 organizaciones a nivel mundial se dedican a su estudio, destacándose la India y Pakistan en la producción científica como señala Gupta (2020), asimismo este autor señaló los principales intereses en 3187 publicaciones de *Moringa* generadas en un período que abarcó desde 1935 a 2019, las relacionadas con las

ciencias agrícolas y biológicas representaron el 36.99%, farmacología, toxicología y farmacia 22.18%, y en menor representatividad, bioquímica, genética y biología molecular (19.96%), medicina (17.01%), ciencias ambientales (16.79%), química (12.21%), ingeniería química (8.32%) e inmunología y microbiología (4.71%).

Para el cultivo de las plantas e incremento de la producción de biomasa verde y seca, así como mejoras en su estructura, se utilizan varias alternativas, entre ellas el uso de fertilizantes químicos y orgánicos, o su combinación; sin embargo, éstos a corto y mediano plazo modifican el pH del suelo, y con ello la comunidad de microorganismos que en ellos se desarrolla (FAO, 2019), provocando un desequilibrio que conlleva paulatinamente a la erosión y pérdida de la capacidad productiva.

Por lo que el uso de bioestimulantes de origen microbiano, en este caso rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, siglas en inglés), ganaron aceptación en muchas formas de producción agrícola (Compant et al., 2010), ya que, bajo el principio de interacciones ecológicas con las plantas, son capaces de promover el crecimiento y desarrollo, así como la diversificación del perfil antioxidante en diferentes tejidos vegetales.

Los géneros microbianos mayormente utilizados son *Bacillus, Pseudomonas, Enterobacter, Burkholderia, Klebsiella, Variovorax, Azospirillum, Azotobacter y Serratia* (Goswami y Deka, 2020). Estos, inducen efectos benéficos mediante mecanismos directos e indirectos. Dentro de los mecanismos directos, se hace mención, a la capacidad que poseen algunas bacterias para fijar nitrógeno atmosférico (N2), solubilizar fósforo (P), segregar hierro (Fe) por sideróforos, y sintetizar fitohormonas (ácido indol-3-acético, AIA; citoquininas y giberelinas) que en conjunto les permiten a las plantas incrementar la eficiencia en la incorporación de nutrientes y acelerar el crecimiento. Mientras que dentro de los mecanismos indirectos se considera la inmunidad activada por patrón y respuesta sistémica inducida (RIS, siglas en inglés), que tributan a la producción de metabolitos con alto poder antioxidante como parte de un sistema de respuestas de defensa de las plantas.

Mediante la caracterización de las PGPB se han identificado algunas de sus potencialidades, como es el caso del *Azospirillum brasilense*, reconocido como productor de AIA (Bashan y Dubrovsky, 1996), *Bacillus spp*. como productores de hormonas del tipo citoquinas y giberelinas, pero también potenciales solubilizadoras de fosfato (Cabello *et al.*, 2019). Otras menos estudiadas incluyen a *Moraxella osloensis*, considerada agente patógeno de las vías respiratorias altas (VRA), sin embargo, posee dentro de sus características la capacidad de fijar nitrógeno, esta bacteria se considera que posee los mismos mecanismo que *Klebsiella pneumoneae*, patógeno de VRA, pero también con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y como floculizadora de aguas contaminadas (Zhang *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Moringa*

Moringa es el único género de la familia *Moringaceae* que comprende 13 especies (Fig. 1), nativa de India y Pakistán, que crece naturalmente a altitud moderada. Es una planta de singular plasticidad a diferentes ecosistemas, encontrándose desde la franja sur del Himalaya, hasta el África subsahariana, con particularidades de tolerancia a ambientes fríos, secos y salinos (Nouman *et al.*, 2016).

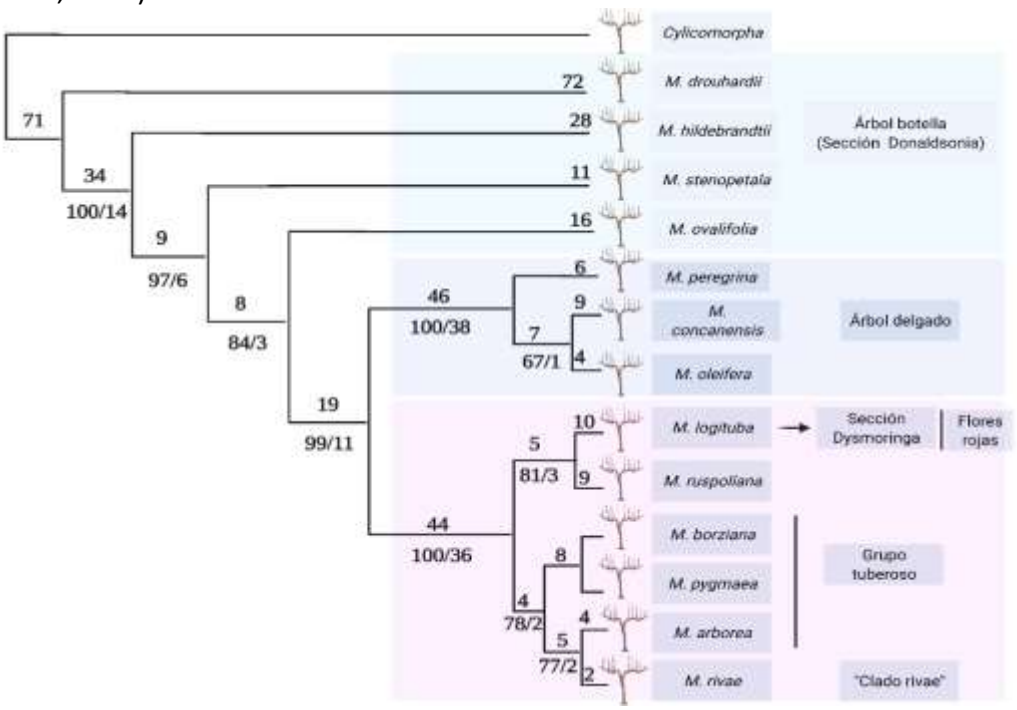


Figura 1. Dendrograma de Moringa según fragmentos de ADN. Adaptado de Olson (2002), mediante BioRender.com.

Por la alta productividad (580 t hojas ha año^{-1}) y rápida recuperación en sistemas de corte (45 y 60 días) (Foidl y Mayorga, 2003), los sistemas de producción están enfocados a la siembra intensiva de la misma, sin embargo, las respuestas productivas se rigen por la época del año, tipo de suelo, clima y variantes de fertilizantes (Ledea-Rodríguez et al., 2017; Ledea-Rodríguez et al., 2018a), además del ecotipo o variedad que se cultive, manejo agronómico de la planta,

altura de poda, y factores genéticos son otras de las consideraciones para aprovechar las bondades de *M. oleifera* (Lobaina-Borges *et al.*, 2016).

Es una planta que se cultiva con interés para la suplementación alimentaria, característico de países del tercer mundo o en vías de desarrollo, ya que fracciones como, corteza, frutos, hojas, semillas, tubérculos, raíces y flores se utilizan para el consumo humano y para animales de granja (Ledea Rodríguez *et al.*, 2018b). Esta es una de las consideraciones por las cuales *Moringa* se ha extendido en todo el mundo, se ilustran algunas de las bondades de esta planta (Fig. 2).

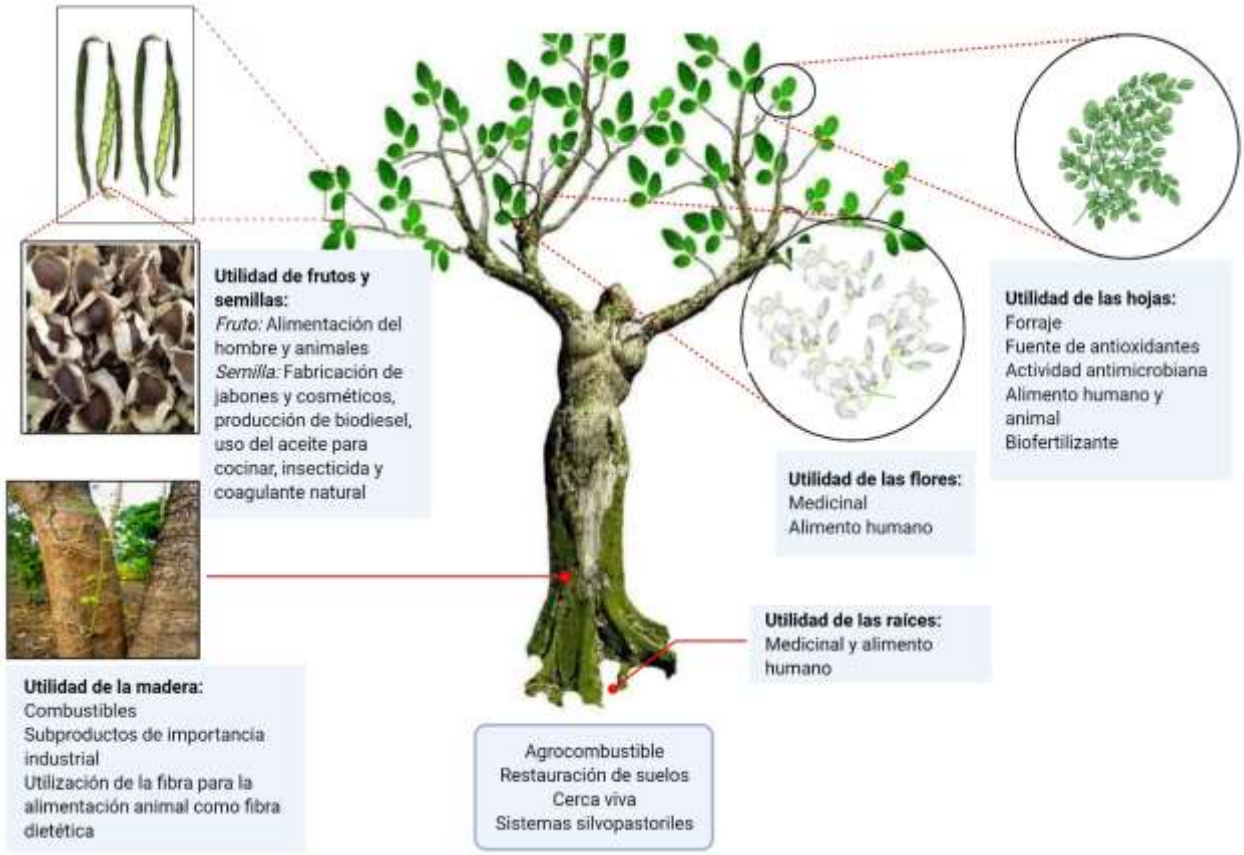


Figura 2. Uso de fracciones botánicas de Moringa. Adaptado de Mora y Guacharná (2015), mediante BioRender.com.

Debido a los atributos como alimento y diversas propiedades, *Moringa* se ha extendido a diversas regiones, donde se destaca su presencia en el cinturón tropical. Es una planta de

polinización cruzada con alta heterogeneidad en morfología y crecimiento, en este sentido se informa que pueden encontrarse plantas de floración perenne a anual, de crecimiento semi extendido a vertical y de hoja caduca a perenne, considerándose rasgos de la alta variabilidad morfológica que tiene la especie, sin embargo, los estudios encaminados a la conservación de accesiones puras en germoplasmas son limitados (Leone et al., 2015).

El perfil bioquímico del género *Moringa* ha sido estudiado en varias regiones del mundo, identificándose compuestos anticancerígenos (Fahey *et al.*, 2018) y antioxidantes, de estos últimos, Singh et al., (2019) señalan más de 40 compuestos, entre ellos identificaron una estructura fenólica, denominada kaempferol además de los ácidos gálico y elágico, con actividad de captación de radicales libres y capacidad de formación de quelatos de iones metálicos. Sin embargo, estudios relacionados con sistemas de cultivos encaminados a la diversificación del perfil químico de la planta con el interés de incrementar la concentración de estos y potenciar su poder antioxidante, son escasos en la literatura científica (Förster et al., 2013).

2.2 Compuestos fitoquímicos

Los compuestos fitoquímicos, son metabolitos sintetizados por la planta mediante el metabolismo secundario y relaciona la síntesis química de estructuras para funciones no específicas, produciéndose cuando se establecen relaciones ecológicas entre planta y el medio que las rodea (Martínez *et al.*, 2020). Al estructurarse mediante el metabolismo secundario y en ocasiones algunas rutas del metabolismo primario, las moléculas son consideradas como no esenciales para la vida (Martínez et al., 2020) pues no tienen intervención en los procesos que involucran el crecimiento y desarrollo de la planta (Ma et al., 2019), sin embargo, están presentes en todas las especies vegetales, manifestándose más en unas, respecto a otras.

Existe una amplia gama de compuestos en los diferentes recursos vegetales, señalándose las hortalizas, frutas y herbáceas como las fuentes más ricas de antioxidantes naturales, además de otros productos alimenticios como cereales, guisantes, nueces y legumbres (Hussain *et al.*, 2016), predominando, los grupos de flavonoides, flavanonas y antocianinas (Vicent-Gil y Fernandez-Espinar, 2016), no obstante, no se conoce aún con exactitud las dosis en que se

deben suministrar, considerándose de manera consensuada un rango entre 150-1500 mg día^{-1}, lo que denota que se debe profundizar en esta área de estudio.

Autores como Ma et al., (2019) sugirieron cinco grupos para la comprensión de las funciones de los metabolitos: polifenoles, carotenoides, alcaloides, terpenoides y compuestos que contienen azufre; sin embargo, otra clasificación de acuerdo con el origen biosintético de los compuestos los ubicó en tres grupos: compuestos fenólicos, terpenoides y compuestos nitrogenados (Martínez et al., 2020), lo cual está básicamente a nivel subjetivo del investigador y sus intereses afines.

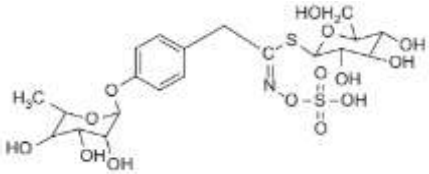
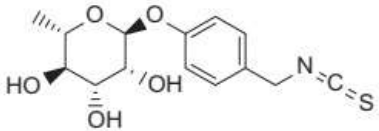
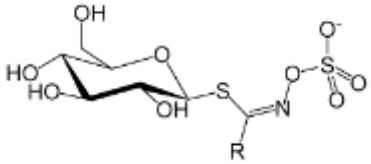
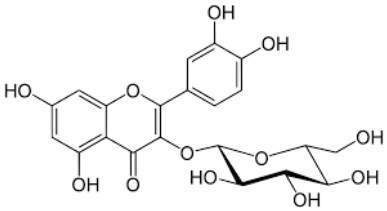
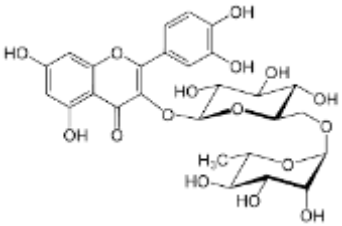
2.3 Compuestos con capacidad antioxidante aislados de *M. oleifera*

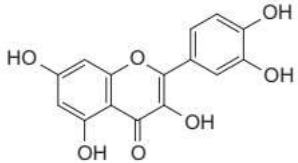
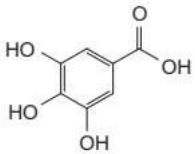
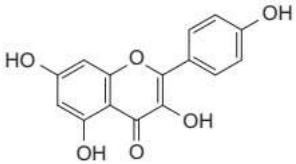
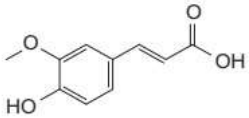
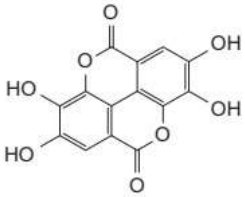
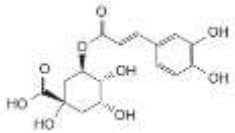
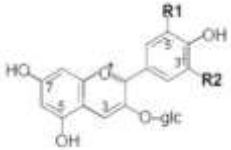
La plasticidad ecológica de *Moringa* y popularidad se deben a una amplia gama de compuestos secundarios presentes en todos los órganos de la misma, pero que prevalecen en las hojas, de esta forma se han cuantificado en hojas secas fenoles totales en rangos de 12.200-2090 mg (Equivalentes a Ácido Gálico) 100 g^{-1} de peso seco (Leone et al., 2015); quercetina y kaempferol en rangos de 0.46-16.64 y 0.16-3.92 mg g^{-1} de peso seco, respectivamente (Amaglo *et al.*, 2010); taninos en cantidades de 20.7 mg g^{-1} de peso seco (Teixeira *et al.*, 2014); *4-0-bencilglucocinolato*, mejor conocido por glucomoringa en cantidades de 78 mg 100 g^{-1} de tejido (Maldini *et al.*, 2014); concentraciones de β-caroteno entre 23.31 y 39.6 mg 100 g^{-1} de peso seco (Glover-Amengor *et al.*, 2017); sin embargo, se cuenta con muy pocas referencias acerca de la cuantificación de β-sitosterol y zeatina (Padayachee y Baijnath, 2019).

Otros de los compuestos pocos comunes, pero que también se han aislado de follaje de *Moringa* son los alcaloides, compuestos nitrogenados derivados del metabolismo de los aminoácidos, de éstos, el *N, α-L-rhamnopyranosyl vincosamida* es el más comúnmente aislado de hojas de *Moringa* (Cheraghi *et al.*, 2017), mientras que otros menos comunes son los derivados del pirrol, denominado *pirrolmarumina 4”-O-α-L-ramnopiranósido* (marumósido A) y *4’- hidroxifeniletanamida* (marumósido B) fueron aislados del follaje de plantas que crecen en la India (Sahakitpichan *et al.*, 2011). De raíces, tallo, hojas y frutos se han aislado glucosinolatos, constituyendo el más común el *4-(α-L-ramnopiranosiloxi)-bencil glucosinolato*, también

conocido como glucomoringin (Adouko *et al.*, 2019), estas moléculas son un grupo heterogéneo de azufre y nitrógeno que contienen compuestos glucosídicos que se presentan en abundancia en muchas familias de plantas (Leone et al., 2015). Según Farooq (2012) también se han aislado compuestos de nitrilo, glucósidos de aceite de mostaza, glucósidos de bencilo, glucósidos fenólicos, glucósidos flavonoides y glucósidos de tiocarbamato. En la Tabla 1 se presentan estructuras químicas de compuestos que también han sido aislados en diferentes tejidos de *Moringa* por diferentes autores.

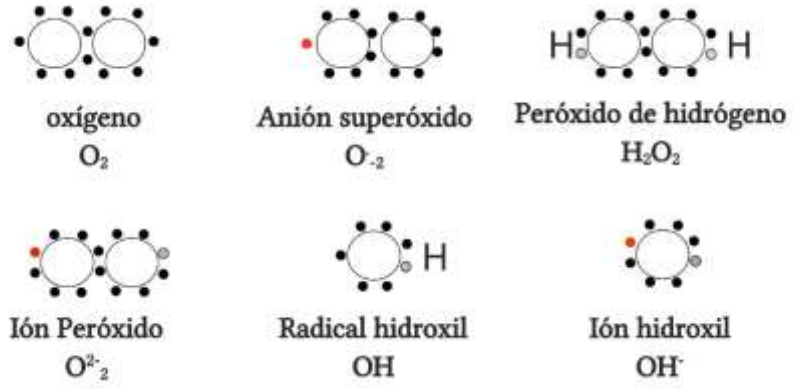
Tabla 1. Principales compuestos fitoquímicos que se han aislado de hojas de M. oleifera Lam.

Autor(es)	Parte de la planta	Grupo del compuesto	Metabolito	Estructura química
(Bennett *et al.*, 2003)	Hojas, tallo y raíces	*4-α-L-rhanmopiranosiloxibencilglucosinolato*	Glucosinolato	
(Amaglo *et al.*, 2010)	Hojas, tallo y raíces	*4-(α-L-ramnosiloxi-bencil) isotiocianato*	Glucosinolato	
(Faizi et al., 1994; Förster, Mewis y Ulrichs, 2013; Kou et al., 2018)	Hojas	Nitrilo	Glucosinolato	
(Vongsak *et al.*, 2013)	Hojas	Isoquercetina	Glucósido flavonoide	
(Habtemariam y Varghese, 2015)	Hojas	Rutina (Rutósido)	Flavonoide	

(Leone et al., 2015)	Semillas, hojas, tallo y raíces	Quercetina;	Flavonoide	
(Osman y Abohassan, 2012)	Hojas, flores y semillas	Ácido gálico	Ácido fenólico	
(Singh *et al.*, 2019)	Semillas, hojas, tallo y raíces	Kaempferol	Flavonoide	
(Nouman *et al.*, 2016)	Hojas, flores y semillas	Ácido feruloilquímico	Ácido fenólico	
(Singh *et al.*, 2009)	Hojas	Ácido elágico	Ácido fenólico	
		Ácido clorogénico		
(Vicent-Gil y Fernandez-Espinar, 2016)	Hoja	Antocianinas	Flavonoide	

2.4 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los ROS se forman como producto de la respiración celular en un organismo en equilibrio fisiológico, los orgánulos diana son los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, aunque Buettner (1993) señaló que se pueden generar a partir de cualquier molécula con un potencial redox suficientemente alto para excitar o donar un electrón al oxígeno atmosférico, lo cual incluye también oxidación de proteínas. Los ROS son neutralizados mediante reacciones básicas del metabolismo, sin embargo, perturbaciones internas y externas pueden afectar este equilibrio y alterar el metabolismo celular, con incremento considerable de los procesos de óxido reducción, anabolismo y catabolismo, y con ello incremento de la respiración y generación de radicales libres con mayor poder de reducción (Ríos *et al.*, 2017). Dentro de la gama de radicales libres se esquematizan en la Fig. 3 las especies con alto potencial reductor:



Radical libre (electrón no pariado): ● ; Electrones: ● ; Electrones de enlace: ●

Figura 3. Especies ROS con alto potencial reductor. Tomado de Aziz-Sawal et al., (2017).

2.5 Actividad antioxidante de los fitoquímicos vegetales frente al estrés oxidativo.

Actualmente existe la tendencia de utilizar los recursos vegetales para prevenir o tratar estrés oxidativo, debido a las propiedades antioxidantes de los fitoquímicos que poseen alta eficiencia en la captación de radicales libres (Hussain *et al.*, 2016), en este sentido Vicent-Gil y Fernandez-Espinar, (2016) señalaron el uso de antioxidantes solamente como carácter preventivo o

profiláctico, ya que, si se genera un estrés oxidativo severo o grave puede dar lugar a condiciones crónicas y/o a la muerte. Padayachee y Baijnath (2020) denominaron a los antioxidantes como moléculas capaces de suministrar átomos libres dentro del organismo, inhibiendo los radicales libres que dañan las células y causan estrés oxidativo, argumentando que las hojas de *Moringa* poseen una variada y alta concentración de compuestos activos con propiedades antioxidantes.

El efecto antioxidante se manifiesta cuando ocurre un exceso en la producción de ROS, provocado por el estrés ambiental, estímulos físicos, químicos, presencia de agentes patógenos o defoliación por insectos, también el desarrollo de procesos inflamatorios a nivel celular (Sies y Reichert, 2019) (Fig. 4), mientras que Vicent-Gil y Fernandez-Espinar (2016), consideraron al estrés oxidativo como una consecuencia del desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes.

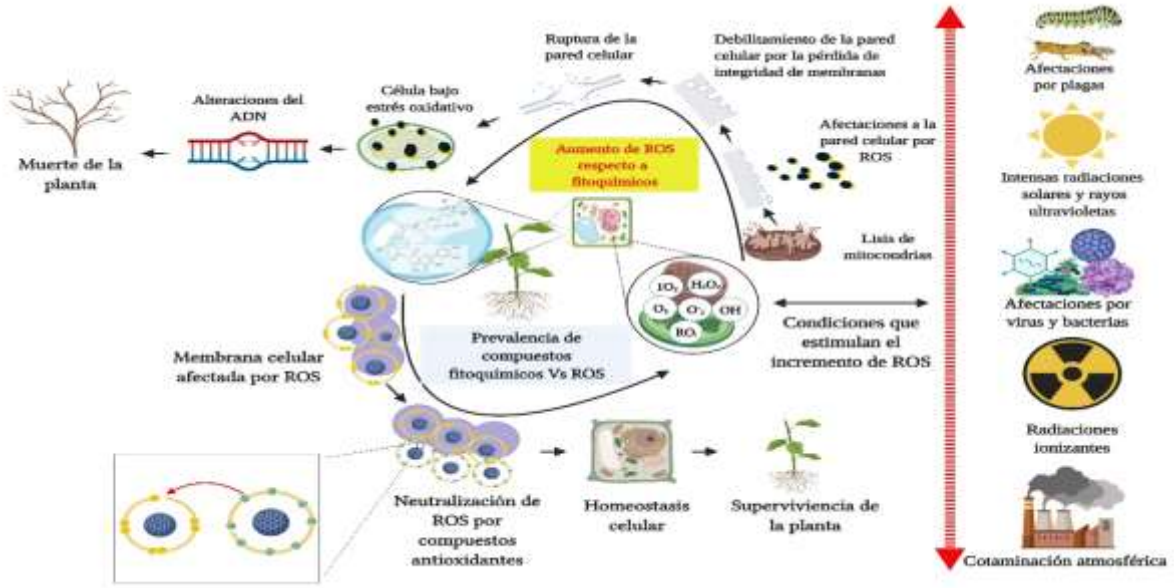


Figura 4. Mecanismos de resistencia y/o apoptosis a nivel celular ante estímulos externos que generan el incremento de ROS en las plantas. (Elaboración propia mediante BioRender.com).

Mediante el uso de extractos acuosos de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) se ha demostrado las propiedades antioxidantes de plantas medicinales, y el efecto antiinflamatorio a nivel intestinal en pargo colorado del pacífico (*Lutjanus peru*) (Maldonado-Garcia *et al.*, 2019;

Reyes-Becerril *et al.*, 2019a). El uso de extractos de planta completa de tecojote *(Crataegus mexicana)* en combinación con nano encapsulamiento mostró efectos en la captación de radicales libres según la técnica DPPH (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*), poder antioxidante férrico-reductor (FRAP), y efecto antioxidante según la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CTA) (Reyes-Becerril *et al.*, 2019b). Gijon et al., (2020) señalaron la utilidad de especies aromáticas, con énfasis en la actividad antioxidante, en la alimentación de rumiantes y monogástricos para el desempeño productivo, de crecimiento y salud. Entre los estudios desarrollados con *M. oleifera* para demostrar sus efectos antioxidantes se señalan los apuntes de Sreelatha y Padma (2009)**,** quienes observaron este efecto promovido por extractos acuosos de hojas jóvenes y maduras, en la eliminación de DPPH, radicales libres (superóxido, radical óxido nítrico) e inhibición de la oxidación lipídica, igualándose el efecto al del antioxidante de referencia (Trolox ®).

2.5.1. Mecanismos de los antioxidantes frente a las ROS

En condiciones fisiológicas normales el organismo puede neutralizar ROS mediante reacciones catalíticas de NADP o NADPH+H sin la intervención de compuestos antioxidantes, por lo que estequiométricamente los antioxidantes no serían modificados por los radicales, interviniendo entonces como catalizador el ácido ascórbico para la oxidación de los radicales (Popov y Lewin, 2013).

Existen diversas teorías sobre los mecanismos de acción de los antioxidantes fitoquímicos para interrumpir o inhibir la formación de radicales libres, y reducir de esta manera el estrés oxidativo. Se hace referencia que los antioxidantes primarios (ácido ascórbico, tocoferoles, y glutatión, entre otros) reaccionan con los ROS mediante la donación de electrones (Fig. 5), también pueden actuar reaccionando con iones metálicos dativos lo cual genera agotamiento del oxígeno molecular disminuyendo su concentración local, igualmente se señala el secuestro de iniciadores de cadena como hidroxilo (·OH), alcoxilo (RO·) o peroxilo (ROO·), rompiendo de esta manera las cadenas de una secuencia de radicales, apagando el oxígeno singulete ($^1O_2$) o activando la trampa de ROS como el anión superóxido ($O_{-2}\cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Martínez et al., 2020).

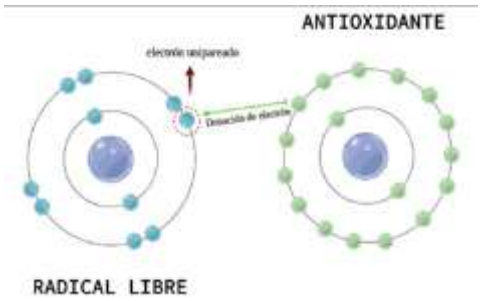


Figura 5. Neutralización de radicales libres por antioxidantes. Tomado de Verma et al., (2019).

De acuerdo con (Xiao, 2016), los antioxidantes evitan la valencia, describiendo, además, que el proceso de inactivación de iones metálicos requiere mucha energía y electrones, fenómeno que potencia la eliminación de las ROS. En este sentido, Bhattacharyya y Jha (2015) señalan que los compuestos antioxidantes como los flavonoides, tiene la capacidad de unirse con iones metálicos (Fe y Cu) mediante los grupos carboxilo e hidroxilo, evitando con ello que se manifieste la reacción Fenton, también comentan que los flavonoides poseen cierta selectividad por algunos ROS, pero que su función principal es la de donar electrones o átomos de hidrógeno (Li *et al.*, 2012).

La reacción de Fenton (Fig. 6) comienza con la excitación del oxígeno atmosférico para formar oxígeno singlete ($\cdot O^{-}_{2}$) o radical superóxido (O_2^{2-}), respectivamente, el radical superóxido mediante el proceso de dismutación libera electrones (marcas en rojo) y termina formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 6). Se ha demostrado que el H_2O_2 interactúa con Fe^{2+} y forma radicales libres hidroxilos (OH·) (Mittler, 2017).

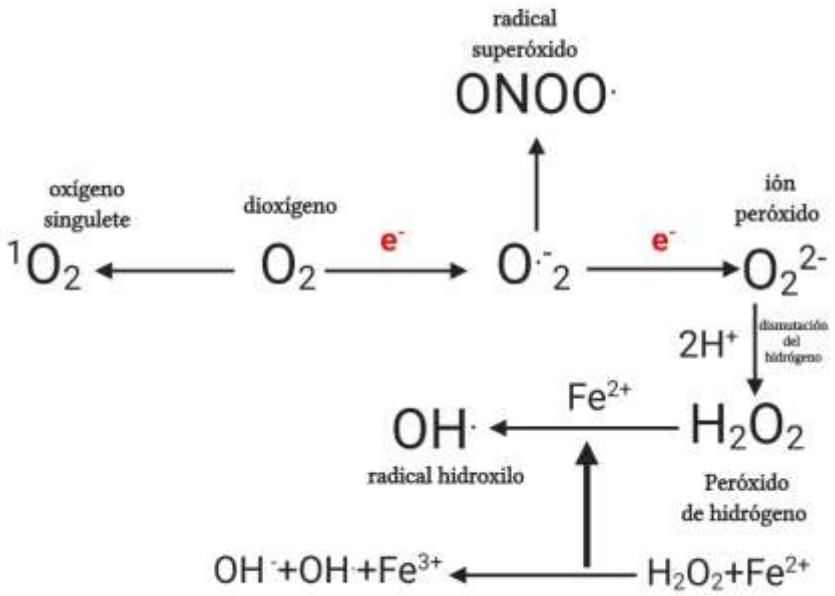


Figura 6. Reacción de Fenton a partir de la respiración celular. Tomado de Mittler (2017).

Los antioxidantes (flavonoides, fenoles y proantocianidinas) también intervienen en la prevención de la peroxidación lipídica (Moyo *et al.*, 2012), basándose esta propiedad en la presencia del grupo hidroxilo en la estructura química del antioxidante que le permite la neutralización del radical mediante la donación de electrones. Los antioxidantes también interactúan con los fosfolípidos de la membrana celular a través de enlaces de hidrógeno, modulando la actividad en la superficie de la membrana tanto interna como externa, contribuyendo a su integridad. Hamid et al., (2010) señalaron dos vías mediante los cuales los antioxidantes neutralizan los ROS:

1. Donación de electrons
2. Eliminación de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS, siglas en inglés), mediante el apagado del catalizador inicial de la cadena.

En la segunda vía propuesta por los autores se refieren a la inhibición de la producción de ROS o RNS mediante el apagado de los iniciadores de cadena, para el caso de los ROS, algunos de estos son el radical hidroxilo, superóxido y el compuesto peróxido de hidrógeno, las RNS son más comunes en mamíferos, en el reino vegetal solo la alga verde marina (*Ostreococcus tauri*) ha

sido identificada como productora de este tipo de especie reactiva (Kapoor *et al.*, 2019). Estos autores propusieron una serie de reacciones en cadena para la inhibición de radicales libres, y discuten los procesos intermedios para que un antioxidante neutralice al ROS mediante la donación de un electrón.

Existe una secuencia para la capacidad antioxidante de enzimas y moléculas (metabolitos secundarios) para la neutralización de ROS, de esta forma se refiere, que moléculas pequeñas como ascorbato, tocoferoles, coenzima Q y glutatión, son capaces de reparar los radicales oxidantes directamente, por lo tanto, son antioxidantes enzimáticos que rompen cadenas (Buettner, 1993).

Buettner *op. cit.* señalaron que, para moléculas orgánicas, como el ácido gálico y flavonoides la presencia de más de dos grupos hidroxilos que les permite actuar sobre los productos intermedios y finales de la oxidación, considerados por esta particularidad agentes reductores de más de dos electrones. Asimismo, la velocidad de reacción de los antioxidantes no solo depende de su concentración, también influye la velocidad de reacción con las ROS, y a su vez, esta tasa y la capacidad antioxidante dependerá de la estructura química de las moléculas con propiedades antioxidantes (Geletii *et al.*, 2002).

La efectividad de los antioxidantes frente a los ROS radica en la capacidad de captar radicales libres, pero además de neutralizar los productos intermedios de la reacción de neutralización, un ejemplo de ello es el ácido ascórbico, el cual posee una capacidad limitada para inactivar ROS debido a su oxidación irreversible, es decir, que después de donar un electrón es oxidado hasta desparecer la molécula, similar a otros polifenoles como pirogalol y *ácido 3,4-dihidroxifenilacético* (Geletii et al., 2002); sin embargo, manifiesta una alta efectividad en la neutralización de productos intermedios, permitiendo el efecto antioxidante de otras moléculas. Su intervención en la captación de radicales primarios es determinante para evitar la formación de ROS estables y más tóxicos (Liaudet et al., 2000).

Atendiendo a lo mencionado, Geletii et al., (2002) propusieron una clasificación para los antioxidantes con base a su capacidad para regenerarse mutuamente dentro de la mezcla de antioxidantes en conjunto a su reactividad hacia la radicación de las ROS, sin embargo,

previamente Buettner (1993) había propuesto una jerarquía dentro de los grupos de antioxidantes en función de las propiedades termodinámicas de ROS, al poseer la propiedad de comportarse como muy oxidantes o muy reductores, lo cual genera un orden y velocidad de acción, un ejemplo de ello es la vitamina (Vit) C (ácido ascórbico) y Vit E (tocoferol) en la protección frente a la oxidación de lípidos.

A pesar de que la Vit C es hidrosoluble y la E liposoluble, además de encontrarse una en la membrana celular (Vit E) y otra en las fases acuosas (Vit C), esta última es capaz de reciclar la Vit E mediante la reposición de su radical tocoferoxilo, permitiendo así que esta vuelva a funcionar como antioxidante frente a ROS. Asimismo, se hace mención por Buettner (1993) que, "algunas enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) son antioxidantes preventivos porque solo actúan sobre las especies de ROS que inician las reacciones en cadena, mientras que los antioxidantes no enzimáticos (ascorbato, tocoferoles, urato y glutatión) son capaces de "reparar" los radicales oxidantes directamente, por lo que son considerados antioxidantes que rompen cadenas".
El efecto de exponer ROS ante una mezcla de antioxidantes puede ser significativamente más alto que el calculado a partir de la suma de los compuestos de forma individual respecto a sus concentraciones. De esta forma, la riqueza de fitoquímicos con capacidad antioxidante en los tejidos de las plantas va a incrementar el efecto benéfico en función de la reducción de las ROS (Choudhury *et al.*, 2017).

2.6 Alternativas de cultivos para la diversificación del perfil químico de las plantas

Resulta muy complejo poder controlar en condiciones de campo o invernadero las variables que pueden llegar a influir en el perfil químico de la planta, por ello, los primeros ensayos se desarrollan generalmente en condiciones que permitan un mayor control en la diversificación del perfil químico. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* permite este control, en base al uso de esta alternativa se han podido identificar varios factores que podrían promover diferenciación en la concentración de compuestos secundarios en los tejidos (Dias et al., 2016; Yue et al., 2016; Espinosa-Leal et al., 2018), entre los que se relaciona el tamaño de los frascos donde se alojan las plantas, la eficiencia del sistema utilizado (convencional en medio semisólido, líquido, agitación), factores abióticos como la temperatura, luz (intensidad, fotoperíodo, longitud de onda), humedad relativa, composición de la micro atmósfera en el interior de los frascos de

cultivo, asimismo, la composición del medio de cultivo como disponibilidad de agua, potencial hídrico del medio, contenido de macro y micro nutrientes, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y fitorreguladores del crecimiento también definen la producción de metabolitos secundarios en el cultivo de tejidos *in vitro* (Cardoso et al., 2019).

En este sentido, Saad y Elshahed (2012) señalaron que la sacarosa (2-6%) es utilizada casi exclusivamente como fuente de carbono en los medios de cultivos, producto a la desestimación del uso de lactosa, galactosa, maltosa y almidón por ser menos efectivos. En relación con el uso de sacarosa se documenta el efecto que tiene para inducir la síntesis de compuestos secundarios en raíz (flavonoides, fenoles, ácido clorogénico e hipericina) (Yamaner y Erdag, 2013), en cultivos celulares en suspensión de *Prunella vulgaris* observaron un incrementó en la producción de biomasa, concentración de flavonoides, fenoles, proteínas y otros antioxidantes (Fazal *et al.*, 2016).

En *Vernonia condensata* Fortini et al., (2021) observaron el incremento en la concentración de pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos, además de una mejora en el intercambio de gases, mientras Modarres et al., (2018) en cultivos en suspensión tratados con sacarosa observaron generación de biomasa celular, acumulación de ácidos fenólicos, donde agregaron que concentraciones de sacarosa por encima del nivel utilizado normalmente (30 g L^{-1}) desencadenó acumulación mejorada de ácidos rosmarínico y cafeico en el medio de cultivo, por lo que queda justificado que alternativas con el uso de la sacarosa pueden promover modificaciones en la composición química de los medios de cultivo, además de modificaciones morfológicas en las vitroplantas y alteraciones del perfil bioquímico, esto puede estar relacionado en el criterio de Qian et al., (2018) con la inducción de estrés osmótico por el exceso del carbohidrato en la célula lo cual incrementa la respiración celular y con ello la producción de ROS.

Por otro lado, el uso de promotores de crecimiento en los cultivos de tejidos *in vitro* también genera la producción de compuestos secundarios, en este sentido Ridzuan et al., (2020) al emplear un promotor del enraizamiento (*ácido 1-naftalenacético* en 0.5; 1.0 y 2.5 mg L^{-1}) en el cultivo de segmentos nodales de *Moringa*, cuantificó un incremento en la concentración de

Fenilalanina-amonio liasa (PAL, siglas en inglés) y polifenol oxidasa (PPO, siglas en inglés), debiéndose según el autor a la aplicación de promotores de enraizamiento. Sin embargo, se debe aclarar que las alternativas de estimulantes del crecimiento radicular en su mayor parte se han ocupado en la multiplicación de la planta, no para la síntesis de compuestos secundarios.

Microorganismos benéficos también se relacionan en los antecedentes de cultivo de tejidos *in vitro* para promover moléculas bioactivas (Llorente y Apóstolo, 1998; ; Llorente et al., 2007; Larraburu et al., 2016; Perez, 2017; Orlikowska et al., 2017; Perez-Rosales et al., 2018; Gonzalez et al., 2021), denominado como biotización, y definido como; "respuestas metabólicas de la planta cultivadas *in vitro* ante un inoculante microbiano, conllevando al desarrollo de cambios fisiológicos que mejoran la resistencia al estrés biótico y abiótico de los propágulos derivados"(Nowak, 1998).

Nowak *op. cit.* mencionó como ventajas de la biotización ante las deficiencias de las condiciones de crecimiento de los cultivos *in vitro* (baja humedad, déficit lumínico, baja humedad) y de las plantas obtenidas (baja capacidad fotosintética, disfunción del aparto estomático, sistema radicular desprovisto de pelos radiculares, pobre desarrollo de la cutícula y bajos depósitos de cera), la obtención de plantas con mayor cantidad de lignina en los tejidos vasculares, más pelos foliares y aparato estomático funcional similar al de plantas crecidas en invernadero, además del incremento de la supervivencia respecto a plantas no biotizadas.

Otras de las ventajas del uso de la biotización es el incremento de compuesto antioxidantes (fenoles libres), enzimas antioxidantes (PAL), y presencia de proteínas relacionadas con la patogenicidad (quitinaza extracelular y β-1,3-glucanasa) (Nowak, 1998; Orlikowska et al., 2017). La concentración bacteriana sugerida para promover el crecimiento (raíces y planta) y diversificar el perfil químico (antioxidantes, pigmentos) en condiciones *in vitro* es de 10^8 UFC mL^{-1} aproximadamente, y para la producción de brotes $3x10^8$ UFC mL^{-1} con *Pseudomonas sp*. Cepa PgIN y *Thizobium leguminosarum* (Pillay y Nowak, 1997). Este último aspecto en *M. oleifera* no fue ubicado en la exploración de la bibliografía mediante bases de datos como Google académico y Scopus, por lo que podrían considerarse aislados los resultados con la incógnita si han sido desarrollados o no.

2.7 Cultivo de tejido in vitro de Moringa oleifera. Experiencias en la diversificación del perfil químico.

El desarrollo de estudios mediante cultivos de tejidos *in vitro* con *Moringa oleifera* ha abarcado diferentes intereses, entre ellos, establecimiento y multiplicación (Förster et al., 2013; Drisya Ravi et al., 2019), conservación del germoplasma (Ruiz *et al.*, 2016), además de variantes que han considerado la modificación del medio de crecimiento con adición o combinación de promotores del crecimiento vegetal (Marfori, 2010; Nieves y Aspuria, 2011; Jun-jie et al., 2017; Hamany Djande et al., 2019; Gupta et al., 2020), y en la obtención de plántulas mediante cultivos *in vitro* para ser plantadas en condiciones de campo (Saini *et al.*, 2012).

Para el proceso de multiplicación se han explorado en el cultivo *in vitro* de tejidos de *Moringa* varias combinaciones que incluyen promotores del crecimiento y medios de cultivo, en este sentido Li et al., (2016) sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962) exploraron las combinaciones de 2.0 mg L^{-1} de 6-BA+0.05 mg L^{-1} NAA (ácido 1-naftalenacético); 6-BA 1.0 mg L^{-1}+KT (Cinetina) 0.1 mg L^{-1}+2,4-D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)+ NAA 0.05 mg L^{-1} para la multiplicación, mientras que para promover el enraizamiento, lograron el 100% utilizando MS+0.5 mg L^{-1} IBA (ácido indol-3-butírico).

Mathur et al., (2014) señalaron entre varias combinaciones de promotores del crecimiento para la inducción de callos, el uso de MS+BAP:IBA (3:3 mg L^{-1}) como más eficiente, mientras que MS+BAP:NAA (1.0:0.5 mg L^{-1}) indujo la producción de brotes y MS+BAP:Kn:NAA (2.0:1.0:0.2 mg L^{-1}) propició rebrotes múltiples al mismo tiempo que en el proceso de enraizamiento, los callos que se desarrollaron con esta concentración no precisaron de promotor de crecimiento para producir raíces, el resto de los callos tratados con MS+IBA:NAA (3.0: 0.5 mg L^{-1}) enraizaron, con lo que concluyeron estos autores que el proceso de diferenciación celular requiere de rutas bioquímicas específicas que son reguladas por factores endógenos, determinando la producción de compuestos secundarios mediante la diferenciación de tejidos para su biosíntesis.

Sin embargo, las experiencias en la multiplicación e inducción del enraizamiento en *M. oleifera* es numerosa y variada, donde no se define una concentración u hormona independiente o combinada que pueda ser utilizada, y eso se debe a la exposición a presiones ambientales en las que crecen las plantas madres y que son transferidas a la decendencia (Valdés-Rodríguez et al.,

2018), entiéndase por presiones ambientales aquellos factores bióticos y abióticos que definen los mecanismos de defensa de la planta y con ello las regulaciones mediante la expresión de genes, regulación de hormonas, actividad enzimática, entre otros, que se transfieren a la descendencia para que pueda prosperar en las mismas condiciones (Boopathi *et al.*, 2021), y ello define en los cultivos *in vitro*, la respuesta por parte de las fracciones vegetativas para la desdiferenciación o diferenciación celular mediante tratamientos poli hormonales u mono hormonales.

En este sentido, experiencias para la diversificación del perfil químico de *Moringa* han considerado la obtención y crecimiento de plántulas mediante cultivos *in vitro,* para posteriormente cultivarlas en campo, pudiendo constatarse un incremento en las concentraciones de α-tocoferol y carotenoides totales en las plantas obtenidas por cultivo de tejidos cultivadas en campo, respecto a las cultivadas en campo directamente (Saini *et al.*, 2012), lo que sustenta el efecto positivo que ejercen las PGPR durante el crecimiento en condiciones *in vitro* que predispone el desarrollo de la planta en otras forma de cultivo *ex vitro*.

2.7.1 Interacción entre rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) y plantas.

A nivel de la rizosfera existe una gran diversidad de microorganismos, los cuales, con énfasis en la bacterias (Fig. 7), establecen comunidades en estructuras denominadas biopelículas (Muhammad *et al.*, 2020). Estas bacterias producen sustancias poliméricas extracelulares (dextrano, xantano, escleroglucano) (Vaishnak y Kumar-Coudhary, 2021), mismas que mediante una gran red de microfibrillas unidas fuertemente por enlaces covalente, aglutinan partículas de suelo y crean cavidades porosas en donde se retienen las moléculas de agua (Costa et al., 2018), modificando de esta forma el aspecto físico del suelo, con énfasis al tipo y tamaño de partícula, estructura y densidad aparente, lo cual contribuye a la mejora en la captura de agua y su retención (Zheng et al., 2016).

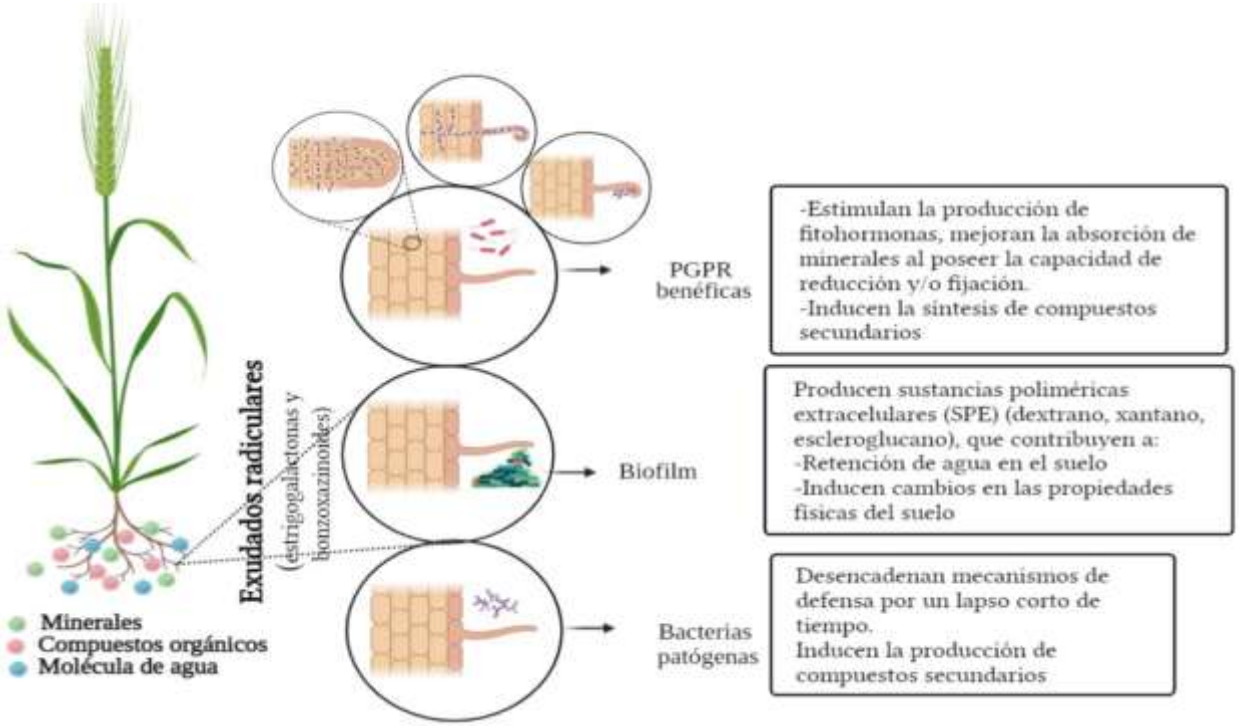


Figura 7. Ecología de las PGPR en beneficio al crecimiento y desarrollo de las plantas. (Elaboración propia mediante BioRender.com).

La planta libera a través del exudado radicular, ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, flavonas, enzimas y compuestos tóxicos para microorganismos, entre los que se mencionan, ácido cianhídrico, glucósidos y saponinas (Oburger y Jones, 2018), y otros compuestos, entre los que se destacan las *estrigogalactonas* y *bonzoxazinoides* que por quimiotaxis atrae a los microorganismos que viven en la rizosfera, donde se incluyen bacterias benéficas pero también agentes patógenos (Robert-Seilaniantz et al., 2011).

Una vez lograda la colonización por las PGPR, comienza la actividad microbiana a nivel de la raíz (externa, intracelular o extracelular). Las PGPR poseen dos mecanismos de acción, reconocidos como directos e indirectos, ambos alteran el perfil bioquímico y hormonal de la planta, además de inducir efectos benéficos en el crecimiento, desarrollo y absorción de nutrientes. El mecanismo directo se identifica por el incremento de concentraciones endógenas de hormonas, también conocidas como fitohormonas entre las que se relacionan los grupos AUX, GBs, Cit y etileno principalmente, variando el efecto en dependencia de la intensidad del estrés, tipo de cepa bacteriana, especie vegetal, y condiciones de crecimiento de forma general (Ahemad y Kibret, 2014) (Fig. 8).

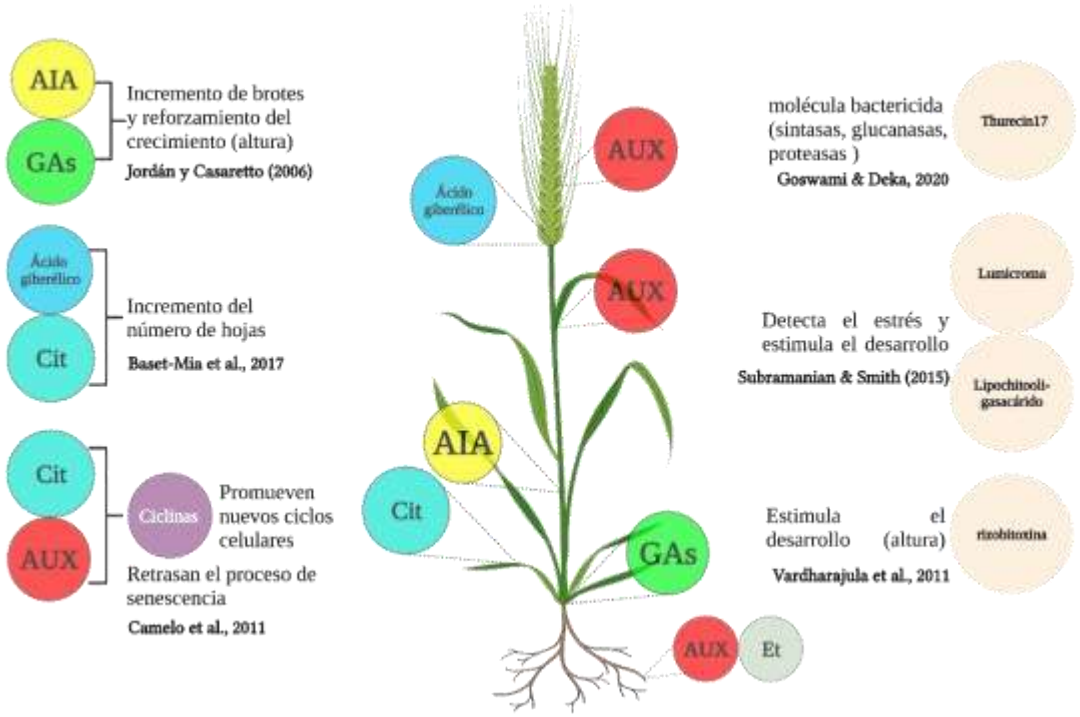


Figura 8. Mecanismo directo de las PGPR. Producción de fitohormonas, sinergismos-antagonismo entre ellas, síntesis de otras moléculas. (Elaboración propia mediante BioRender.com).

La síntesis de hormonas está regulada con precisión por la planta, pero las bacterias también pueden sintetizarlas ya sea desde la rizosfera (rizobacterias) o tejidos vegetales (endófitas) (Shilev, 2020), también se generan algunos precursores que inhiben la producción de determinada hormona (etileno), como es el caso del denominado *ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico* (ACC) (Nadeem *et al.*, 2014), inhibiendo y/o revirtiendo la producción de etileno, hormona que protege a la planta frente a diferentes tipos de estrés pero también detiene el crecimiento en función de la altura y el desarrollo radicular.

Algunas PGPB producen ACC-desaminasa que puede degradar el ACC en amoníaco y *α-cetobutirato*, esta reacción disminuye las concentraciones de etileno en la raíz, con lo cual puede comenzar a incidir las auxinas endógenas para el desarrollo radicular, y los restos de ACC son eliminados a través del exudado radicular suprimiéndose el efecto inhibidor del etileno en las raíces y planta (Shilev, 2020).

Todas las fitohormonas inciden a nivel celular para el desarrollo de tejidos, las PGPR potencian estos efectos al estimular la producción de estas, y que al desarrollarse relaciones antagónicas entre algunas de ellas equilibran y fortalece el crecimiento y desarrollo de las plantas (Baset Mia, 2012), relacionándose entre los efectos antagónicos la combinación de GAs y AIA que potencian el crecimiento de la planta y producción de brotes (Jordán y Casaretto, 2006).

La producción combinada de Cit y AG intervienen de forma directa en la producción de hojas (Baset-Mia *et al.*, 2017), documentándose además, por estos autores que la combinación de las citoquininas con otras hormonas (auxinas) induce la acumulación de ciclinas, las cuales promueven nuevos ciclos en la célula y en la división celular, lo que genera la formación de nuevas estructuras, como tallos, brotes y hojas principalmente, lo cual coadyuva a la tolerancia por parte de la planta a las afectaciones bioquímicas, estructurales y morfológicas que provoca el estrés abiótico y biótico en las plantas.

Las PGR también producen otros tipos de moléculas, como rizobitoxina que promueve el desarrollo de las plantas en función de la altura (Vardharajula *et al.*, 2011), *lumicroma* y *lipochitooligasacarido* que detecta el estrés ambiental y regulan el crecimiento vegetal (Subramanian y Smith, 2015). Subramanian *op. cit.* señalan la producción de Thurecin17, molécula bactericida que modifica el metaboloma de semillas permitiéndole germinar en condiciones de estrés ambiental, promueven además la síntesis de enzimas extracelulares como sintasas, glucanasas y proteasas que promueven la lisis de células bacterianas y degradan la pared celular de hongos patógenos (Goswami y Deka, 2020).

Los mecanismos indirectos incluyen respuestas de defensa sistémica que incrementan la concentración de compuestos endógenos, y algunas hormonas relacionadas con la defensa de la planta como el ácido jazmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno (Pieterse *et al.*, 2000), los cuales estimulan la concentración de determinados compuestos secundarios (del Rosario Cappellari *et al.*, 2019), que protegen a la célula de la oxidación, mantenimiento de la turgencia celular e integridad de membranas producto de la interacción con factores bióticos o abióticos.

Dentro de los factores bióticos se relacionan las afectaciones de defoliación por insectos, herbívoros, competencia por recursos (agua, minerales, espacio) con otras plantas e infecciones

patógenas. Referente a la detección de microbios benéficos o patógenos, Robert-Seilaniantz et al., (2011) explican las dos formas en que las plantas reaccionan ante las infecciones, describiendo un mecanismo que denominan "*Inmunidad activada por patrón*" que involucra la capacidad de la planta de detectar y reconocer una amplia gama de patrones moleculares asociados a patógenos y microbios (P/MAP, siglas en inglés) a través de receptores de reconocimiento de patrones de superficie (PPR, siglas en inglés), resultando en la inmunidad activada por patrón (PTI, siglas en inglés), que es el sistema defensivo capaz de contener y/o reconocer a organismos patógenos y no patógenos, este sistema de defensa solo es superado por patógenos que posean efectores que suprimen el PTI (Fig. 9).

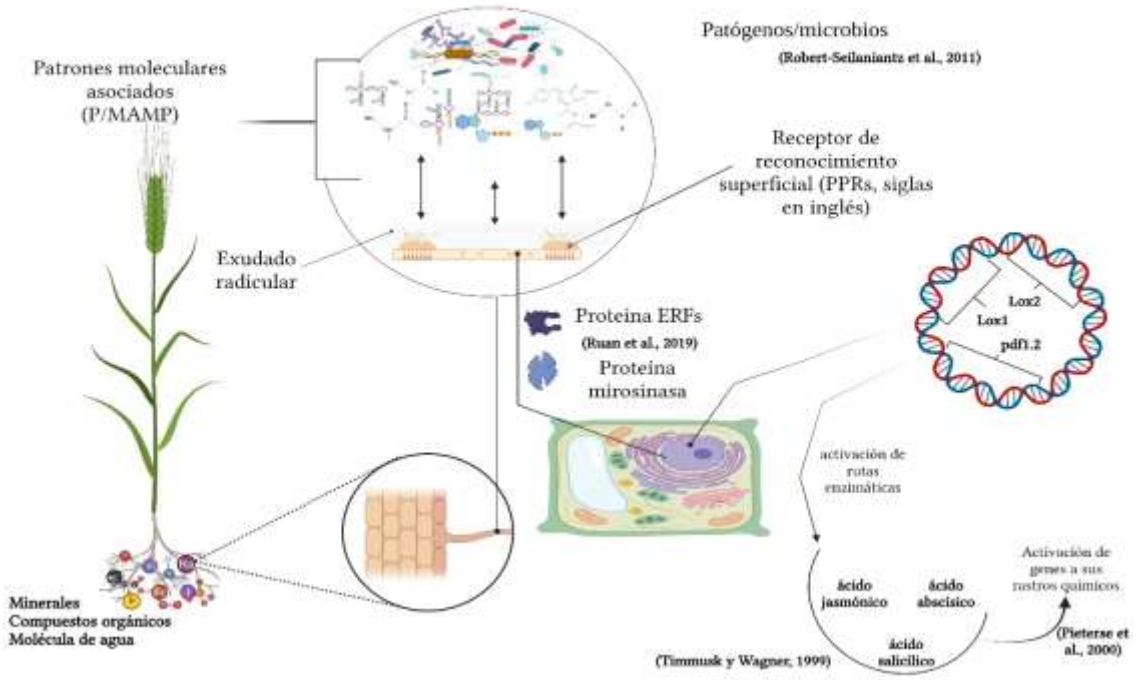


Figura 9. Esquema del mecanismo de inmunidad activada por patrón. (Elaboración propia mediante BioRender.com).

Independientemente de la superación de la barrera, se desencadenan reacciones bioquímicas mediadas por proteínas (ERFs, mirosinasa) (Ruan *et al.*, 2019), que provocan una intervención del genoma de la planta mediante la sensibilización en la expresión de genes (*Lox1, Lox2, pdf1.2*, entre otros), denominada respuesta sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés), mediante la cual se activa la síntesis de ácido abscísico (ABA), etileno, AJ y AS (Timmusk y Wagner, 1999),

así mismo el AJ y AS son activadores de genes sensibilizados a sus rastros químicos (Pieterse et al., 2000).

Sin embargo, la expresión de los genes va a depender del tiempo de exposición al estímulo hormonal e intensidad del mismo, lo cual va a definir cuales rutas metabólicas serán activas para la síntesis de moléculas secundarias, este aspecto fue señalado por van Wees et al., (1999) en la identificación de algunos genes (*Lox1, Lox2, Atvsp, Pdf1.2, Hel, ChiB y Pal1*) relacionados con la producción de AJ y activación de enzimas que definieron las rutas metabólicas para la producción de compuestos secundarios (fenoles, polifenoles, terpenoides, alcaloides, entre otros) como parte de la ISR ante la infección por *Pseudomonas*, señalando que, en dependencia de la intensidad de la señal y vía de señalización se define el tipo de metabolito para el control del estrés oxidativo.

2.8 Las PGPR y su intervención en la modificación de la anatomía foliar y morfología de estomas.

Los efectos hormonales antes mencionados en conjunto con el antagonismo que se produce entre hormonas del crecimiento vegetal conllevan a modificaciones anatómicas y estructurales en toda la planta, acentuándose en las hojas, donde se presentan modificaciones morfológicas en la estructura del estoma y anatomía del parénquima esponjoso (Larraburu et al., 2010). El estoma es la única estructura foliar que permite el intercambio gaseoso de la planta con el medio, y con ello equilibra la relación de la disponibilidad hídrica / intercambio de gases, optimizando el proceso de la fotosíntesis mediante el suministro de oxígeno (Drake et al., 2013), donde el tamaño y densidad estomática juegan un papel determinante en el proceso de intercambio gaseoso y eficiencia fotosintética (Paradiso *et al.*, 2017).

Existen evidencias de que, estomas más pequeños poseen mayor capacidad de respuesta para la apertura y cierre de los mismos, respecto a estomas grandes (Drake et al., 2013), los cuales, no posibilitan un optimizado cierre estomático por lo que la respuesta adaptativa es más prolongada y con ello, retardo en los procesos de ajuste hídrico, si el tamaño se combina con la densidad de estomas por unidad de superficie, podría contemplarse una amplia capacidad de ajuste de la conductancia, lo que a su vez genera eficiencia en el balance hídrico, intercambio gaseoso, actividad fotosintética y movilización de nutrientes a partir de la raíz (Balliu et al.,

2015), por ello se considera que hojas con alta densidad de estomas pequeños son capaces de alcanzar altos niveles de conductancia estomática si las condiciones de crecimiento de la planta son favorables (sin estrés) o desfavorables (estrés abiótico) (Drake et al., 2013).

Es importante mencionar, que tanto las condiciones de crecimiento de la planta como el factor genético influyen en la densidad y tamaño de estomas, determinando los rangos en los que se comporta la variabilidad de los mismos (Pieruschka et al., 2005), así mismo si se inoculan con microbios promotores del crecimiento vegetal, específicamente bacterias, los resultados son variables y aún poco comprendidos.

Jafarian et al., (2017) observaron en el análisis de la hoja bandera de dos variedades de trigo (*Triticum aestivum*) vc harinero y duro, respectivamente, inoculados con *Azospirillum* spp. en condiciones de secano, respuestas diferenciadas en la densidad y tamaño de los estomas, aunque la longitud de los estomas en las plantas inoculadas fue mayor respecto a los testigos no inoculados, aseveraron que las condiciones de baja disponibilidad hídrica contribuyeron a definir la estructura estomática, mientras que la expresión diferencial se debió al factor genotipo, donde la variabilidad genética ajustó las transformaciones estructurales.

En estudios de la diversificación de la morfología estomática por el efecto de las PGPR, Larraburu et al., (2010) señalaron en un estudio realizado con cultivos *in vitro* de *Photinia* (*Photinia x fraseri Dress*) inoculadas con *A. brasilense* Cd y Sp7, y *Azotobacter chroococcum* diferencias en la morfología de los estomas promovidas por las cepas en estudio, donde todo indica que también las características que identifiquen a la PGPR determinará las respuestas que éstas desencadenen para modificar la morfología del estoma.

En ocasiones la capacidad de respuesta de las plantas para ajustes anatómicos o morfológicos es lenta (morfología estomática y ordenamiento de células epidérmicas) y no se llega alcanzar la modificación estructural para la supervivencia y desarrollo, lo que genera retrasos en el crecimiento, improductividad o muerte de la planta (Kottapalli *et al.*, 2018). En este sentido, el uso de PGPR se ha comprobado que indirectamente son capaces de modificar la morfología y tamaño de los estomas, y estructuras conductoras de tallos y hojas (Gonzalez et al., 2015).

El-Afry et al., (2012) observaron en tallos de plantas de *Triticum aestivum* L. sometidas a estrés hídrico e inoculadas con dos bacterias endógenas (*Azotobacter chrocooccum* y *Pseudomonas fluorescens*) un incremento en las dimensiones del xilema y floema por el efecto de *A. chrocooccum*, y en hojas *P. fluorescens* incrementó el diámetro de los haces vasculares de haz y envés esto se relaciona con transformaciones anotómicas en la hoja, entre las que se relacionan, incremento del espesor de la empalizada, parénquima esponjoso y su porosidad, afectando de forma positiva la difusión de gas lateral y vertical dentro de la hoja (Pieruschka et al., 2005).

Efectos similares observaron Gonzalez et al., (2021) en el cultivo de la Jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) en condiciones *in vitro* asociada con cepas de *A. brasilense* para reducir las modificaciones anatómicas de hojas, tallos y raíz por estrés salino, resultando en un incremento en el diámetro de los conductos (xilema y floema) del tallo y hojas similar a plantas sin estrés, lo cual resalta el carácter promisorio de las PGPR para transformar la anatomía de tallos y hojas.

Paradiso et al., (2017) observaron en un cultivo hidropónico de *Glycine max* (L.) Merr modificaciones en el tamaño de los estomas (más pequeños) producto de la inoculación de un consorcio microbiano que incluyó catorce especies de bacterias, doce especies de HMA (hongos micorrizicos arbusculares) y especies benéficas de *Trichoderma* spp., aunque corroboraron predominio de cepas de *Ochrobactrum* colonizando la raíz.

Un estricto control de la apertura y cierre estomático permite utilizar eficientemente la misma cantidad de agua por el sistema radicular, de esta manera para estomas grandes, el control hídrico se desarrolla con la apertura de algunos estomas, mientras que el resto se mantienen cerrados, aunque en ocasiones por el tamaño de las células guardas el cierre no es total y se mantiene de forma no controlada el intercambio gaseoso que genera escape de vapor de agua y por tanto afectaciones en el equilibrio hídrico (Nolasco-Bethencourt, 2017).

Sin embargo, en plantas inoculadas con PGPR, las modificaciones que estás imprimen en los conductos (xilema y floema) y otros vasos conductores, generan una alteración en la actividad respiratoria que provoca ajustes mediante mecanismos regidos por hormonas, genes y enzimas

en la reducción del tamaño de los estomas e incremento de la densidad de los mismos (Paradiso et al., 2017).

2.9 Absorción de minerales, intervención de las PGPR como diversificadoras del perfil mineral de las plantas.

Las plantas vasculares absorben nutrientes esenciales, iones o nanopartículas a través de raíces, estomas, cutículas de hojas o tallos, pudiendo trasladar estas especies químicas, grandes distancias relativas dentro de la planta (Crawford, 2021a). La absorción se desarrolla principalmente de la masa del suelo que es la destinada para la extracción de agua y minerales, mientras que la interfaz suelo-raíz o rizosfera, es la zona del suelo influenciada por la planta, donde predominan un grupo de sustancias químicas y orgánicas que permiten a la raíz interactuar con el medio y microorganismos del suelo (Crawford, 2021b).

Los aspectos biológicos de la rizosfera incluyen las paredes de células más externas que forma el límite interno de la interfaz. Durante el desarrollo radicular, desde la primera radícula, la rizosfera está cubierta por un muci-gel que juega un papel fundamental en la absorción de Fe, Mn, P y Zn en condiciones de deficiencia de estos minerales, mientras que la flora microbiana asociada a la rizosfera predispone disponibilidad de nutrientes para la planta a partir del ciclo de nutrientes (Crawford, 2021a).

A partir de las modificaciones morfológicas y anatómicas de los conductos (xilema y floema) y hojas, respectivamente, combinado con el crecimiento acelerado producto al efecto hormonal estimulado por las PGPR, se incrementa la presión radicular, también conocida como presión hidrostática, con lo que se incrementa la absorción de agua y con ello, la incorporación de macro y microminerales, y elementos benéficos (Palmgren, 2001) , minerales que son utilizados por la planta para la síntesis de enzimas, tejidos, mejoramiento del funcionamiento metabólico (Taiz y Zeiger, 2006), entre otras funciones relacionadas.

Por otra parte, en dependencia de las características de las PGPR (fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos) se acidifica el pH de las rizosfera de las plantas (Carrillo et al., 2002), a partir de la oxidación de NH_4, produciendo H+ y NO_3 (Crawford, 2021a), lo cual altera la bomba de protones, y a su vez, el funcionamiento de los canales de difusión para la entrada de los minerales al interior de la célula vegetal (Campbell et al., 2014).

Se hace referencia entre las alteraciones de pH de la rizosfera por las características de las PGPR, en un ambiente rico en amonio un aumento de la extrusión de protones, y un ambiente rico en nitratos reducción de la extrusión, alterando ambas variantes el potencial de membrana de las raíces para incrementar la salida de protones de la raíz, lo cual incrementa la fuerza motriz, que es la que permite a la planta absorber minerales de la solución del suelo (Bashan et al., 1991). Estos cambios en la extrusión de protones determinan en muchas ocasiones el mineral que se va a absorber para mantener el potencial de membrana y equilibrio electroquímico, en este sentido, ante una alta extrusión de protones se alcanza un potencial electronegativo alto a nivel de membrana, siendo necesario la incorporación de un catión para equilibrar, por excelencia el catión es el K^+ (Gaxiola-Ariza, 2019), por lo que se desarrolla un desplazamiento de minerales con las relaciones de sinergismo y antagonismo que los acompaña; K^+ es antagonista del Ca^{2+} y Mg^{2+}, por cual, se limitará su absorción de la solución del suelo y se debe potenciar la incorporación Fe^{2+} y Mn^{2+} (Nolasco-Bethencourt, 2017). Entre las bacterias que se han estudiado con un enfoque modificador del ambiente de la rizosfera, se encuentra *Azospirillum brasilense* Cd (Bashan et al., 1990; Carrillo et al., 1990) y *Achromobacter* (Bertrand *et al.*, 2000).

Asimismo, las PGPR estimulan la producción de moléculas bioactivas a nivel de la raíz como la escopolamina y posterior producción de escopoletina, cumarinas que se exudan a través de la raíz. La exudación de escopoletina (*7-hidroxi-6-metil-2H-1-benzopiran-2-uno*) promueve la quelación de Fe (III) a nivel de la rizosfera ayudando a movilizarlo para su absorción por la raíz, mientras que la exudación de escopolina también puede suprimir el crecimiento de patógenos en las plantas (Lundberg y Teixeira, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La especie *Moringa oleifera* Lam. ya ha sido objeto de estudio mediante la inoculación con PGPR para la promoción del crecimiento y diversificación de la morfología de la planta, sin embargo, el incremento del potencial antioxidante a partir de los mecanismos indirectos promovidos por PGPR no ha sido abordado, por lo que, un sistema de cultivo que aproveche las bondades de producción de biomasa determinada por la edad de la planta en combinación con la inoculación planificada y estratégica con PGPR, podría conducir a plantas de calidad con un optimizado crecimiento, desarrollo, altamente productora de hojas ricas en compuestos antioxidantes.

4. HIPÓTESIS

Si, se han aislado y caracterizado bacterias con potencialidades para promover el crecimiento en plantas, entonces, es posible que éstas tengan un efecto promotor en el desarrollo, crecimiento, modificación de la morfología estomática y perfil antioxidante de plantas de *Moringa oleifera* Lam.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar el crecimiento, producción, desarrollo, morfología estomática y contenido de antioxidantes en *Moringa oleifera* Lam. inoculada con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la efectividad de medios para el cultivo de tejidos *in vitro* en la germinación, crecimiento y desarrollo de vitroplantas de *Moringa oleifera,* y su multiplicación.

2. Evaluar mediante la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal la morfología estomática de plantas de *M. oleifera* en condiciones de invernadero.

3. Caracterizar el proceso de crecimiento, desarrollo y producción de biomasa de plántulas de *M. oleifera* inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero.

4. Analizar el contenido de antioxidantes en hojas de *M. oleifera* inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Determinar la efectividad de medios para el cultivo de tejidos *in vitro* en la germinación, crecimiento y desarrollo de vitroplantas de *Moringa oleifera,* y su multiplicación.

6.1.1 Material vegetal

Las semillas de *Moringa oleifera* se colectaron de una planta adulta establecida en las coordenadas 24° 07´45.47” LN y 110° 20´14.72” LO en el estado de Baja California Sur, La Paz, México. La planta madre tenía una altura entre cuatro y cinco metros con edad entre seis y siete años, la morfología de los frutos señaló dimensiones que variaron entre 27 y 43 cm de longitud y 18.8 y 27.52 mm para el grosor, como promedio presentaron 21 semillas de 0.31 g de peso promedio.

La cosecha de la semilla se realizó tres meses antes de su uso, de frutos maduros que fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en El Comitán, localizado en la porción meridional de la Península de Baja California donde se encuentran las zonas de mayor aridez en el mundo (Aguilera y Martínez, 1996), entre los 24°08´10.03 LN y 110°25´35.31 LO, localizado al noroeste de La Paz.

Se colectaron 1354 semillas maduras y de forma aleatoria se separó el 10%; a éstas se les determinó con un Vernier digital (STEREN) con precisión de 0.01 mm, el ancho (mm), considerado como del diámetro perpendicular; largo(mm), como el diámetro paralelo con respecto al eje del micrópilo, espesor (mm), al nivel medio del eje del micrópilo según las consideraciones de Valdés-Rodríguez et al., (2018). El peso en gramos se cuantificó en una balanza analítica (Ohaus, OHAUS, EUA), con una precisión de 0.0001 g. Del fruto se valoraron sus dimensiones (largo y ancho) con ayuda de una regla y un vernier respectivamente.

6.1.2 Desinfección de semillas

Se les retiró la testa a las semillas y se lavaron con agua y detergente comercial durante 2 min, luego se enjuagaron con agua destilada y acto seguido se introdujeron en etanol (70% v/v) durante 1 min dentro de una campana de flujo laminar, para luego introducirlas en una solución de hipoclorito de sodio comercial (NaOCl) al 15% (v/v) durante 20 min en agitación constante

(110 rpm). Una vez extraídas de la solución desinfectante fueron enjuagadas con agua destilada estéril por cinco ocasiones durante media hora en agitación constante (Luna, 2019).

6.1.3 Medios de cultivos

Se empleó el medio basal Murashige y SKoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con adición de vitaminas del medio B5 Gamborg (Gamborg, 1970) (Medio MS+ vitaminas del Medio B5; 3% sacarosa; 8 g L^{-1} agar y pH 5.7) (MSG); MS: 3% sacarosa; 8 g L^{-1} agar y pH 5.7; Medio con Agua-Agar (8g de agar en 1000 mL de agua (p/v)) y Medio húmedo (algodón embebido en agua destilada estéril), ajustando el pH para todos los medios a 5.8 mediante un potenciómetro (pH metro 3320, marca YENWEY).

Se agregaron 20 mL de los medios probados en frascos de vidrio con capacidad de 120 mL. Se esterilizaron en autoclave por 15 min a 1.5 atm de presión y 121ºC, se dejaron enfriar, y posteriormente en una campana de flujo laminar S/M (marca ACERART) se ubicó una semilla dentro de cada frasco, todo el procedimiento se desarrolló alrededor de un mechero bunsen. Los frascos se sellaron con plástico autoadherible. Se incubaron es un cuarto de cultivo con temperatura de 25 ± 4°C, humedad relativa de 70%, 16 horas luz por ocho de oscuridad.

6.1.4 Condiciones de cultivo

Todos los frascos con los explantes se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 28ºC ± 2ºC, a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos entre 220 µmol m^{-2} s^{-1} - 250 µmol m^{-2} s^{-1}, con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, subcultivados los explantes cada 30 días al mismo medio de cultivo.

6.1.5 Diseño experimental y tratamientos

El estudio se desarrolló con un diseño experimental completamente aleatoreo con cinco repeticiones, se consideraron como tratamientos diferentes medios de cultivo; Tratamiento T1: Medio de Cultivo Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg (B5) (MSG); T2: Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS); T3: Agua-Agar 0.8 %; T4: Medio húmedo (CT). Las repeticiones estuvieron constituidas por 16 plantas por tratamientos, de las cuales, y en forma aleatoria, se

seleccionaron cinco, que constituyeron las observaciones dentro de cada repetición en cada tratamiento, para un total de 25 observaciones por tratamiento.

6.1.6 Germinación

La evaluación de germinación se desarrolló bajo condiciones señaladas arriba (6.1.3) en frascos con 20 mL de medio de cultivo depositado en cada frasco dentro de la campana de flujo laminar (modelo Edge Gard Hood). Se evaluó el porcentaje de germinación y de contaminación de forma diaria, se consideró como semilla germinada aquella que mostró una raíz de 5 mm de longitud (Luna, 2019). Se cuantificaron: días para iniciar la germinación (DPG), porcentaje del tiempo medio de germinación (TMG, %) (Ellis y Roberts, 1980), índice de germinación (IG) e índice de velocidad de germinación (IVG) (Ranal y De Santana, 2006), mediante las siguientes ecuaciones:

$$TMG=\frac{\sum \text{\# semillas germinadas x \# de días de siembra}}{\sum \text{Semillas germinadas}} \quad (1)$$

$$IVG=\frac{\sum C_i}{\sum C_i T_i} \quad (2)$$

Dónde: Ci= Número de semillas germinadas por día; Ti= Tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo de germinación.

$$IG=\frac{\text{\# semillas germinadas}}{\text{días para la germinación de la primera semilla}}+\frac{\text{\# de semillas germinadas}}{\text{días hasta la germinación de la última semilla}} \quad (3)$$

6.1.7 Crecimiento y desarrollo de plántulas emergidas

Se controló posterior a la germinación y durante el período de crecimiento (16 días), el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas, para ello, de forma aleatoria se seleccionaron veinte plantas desarrollando mediciones de la altura (considerada desde la base de tallo hasta la yema terminal) cada cinco días con un vernier digital (STEREN) para determinar las tasas de crecimiento, las mediciones se realizaron hasta que las plantas estuvieron por exceder la altura interna del frasco, en este momento se extrajeron y se desarrollaron mediciones morfológicas de los tallos (largo y ancho, mm, desde la base hasta la aparición de la primera hoja y a 10 mm de su base, respectivamente), hojas (número, largo y ancho), las mediciones se desarrollaron a partir de la primera hoja, la longitud se consideró desde la base hasta el ápice, y el ancho en la

porción media). Con las medidas de las hojas se estimó el área foliar con la siguiente fórmula (Ahmed et al., 2011):

$$AF=L \times A \times 0.55 \quad (4)$$

Dónde: L=longitud máxima; A=ancho (promedio de la porción base, media y apical)

A partir del valor del área foliar se calculó la Duración del Área Foliar (DAF) e Índice de Área Foliar (IAF) según el método clásico de análisis del crecimiento de acuerdo con Hunt (Hunt y Hunt, 1990) a partir de la relación altura y tiempo de crecimiento.

$$DAF=(AF_2+ AF_1)-\left(\frac{T_2- T_1}{2}\right) \quad (5)$$

Dónde: AF=Área foliar; T=tiempo; S=área del suelo cubierta

Cada cinco días luego de la germinación se tomaron las alturas de la planta pre identificadas para estimar la Tasa de crecimiento absoluta (TCA), tasa de crecimiento relativa (TCR) (De Armas *et al.*, 1988).

$$TCA\ (cm\ día^{-1}) = \left(\frac{A_2-A_1}{T_2-T_1}\right) \quad (6)$$

$$TCR\ (cm\ cm^{-1}\ día^{-1})=\left(\frac{A_2-A_1}{T_2-T_1}\right)x\left(\frac{1}{A_2}\right) \quad (7)$$

Dónde: A1=Altura inicial; A2=Altura final; T1=Tiempo inicial; T2=Tiempo final

6.1.8 Multiplicación de plantas

Posterior a las mediciones morfológicas de tallos, hojas y raíces, se tomaron explantes de tallos (segmentos de 1 cm ± 0.5 cm de longitud, sembrados en posición vertical, provenientes de vitroplantas de *Moringa* (*M. oleifera* Lam) de 16 días de edad, obtenidas *in vitro* como se describe en la sección 6.1.7 en medios declarados en 6.1.3. Los explantes de tallos se ubicaron en los medios de cultivo que aportaron los valores más significativos al proceso de crecimiento y desarrollo de la planta, los medios se suplementaron con 4.44 µM de 6-BAP (Llorente y

Apostolo, 1998). Los segmentos estuvieron en presencia del promotor del crecimiento durante 60 días, en el transcurso de este tiempo se hicieron cambios cada 20 días a medios de cultivos frescos. Para la estimación del porcentaje de número de brotes, se realizaron observaciones diarias hasta completar el tiempo de experimentación.

6.1.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa Statistica v.12.0, y se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (Massey, 1951) y la homogeneidad de varianzas según el criterio de Bartlett (Bartlett, 1937), el modelo matemático por el cual se desarrolló el ANOVA fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + R_j + e_{ij} \quad (8)$$

Dónde: μ= promedio del modelo; T_i= i-ésimo tratamiento; R_j=j-ésima réplica; e_{ij}= error de la estimación

Para determinar la curva de crecimiento de los brotes se realizaron análisis de regresiones no lineales a partir de la edad y altura del brote. Se utilizaron los modelos:

Logístico Nelder (Nelder, 1961):

$$Y=a/(1+b*\exp(-c*T)) \quad (9)$$

Dónde: Y= es el crecimiento del organismo al tiempo t; a= es el crecimiento máximo asintótico esto es cuando t tiende al infinito; b= es el parámetro de curvatura que expresa qué tan rápido alcanza el crecimiento máximo o tiempo de retraso; c= tasa de crecimiento; T= tiempo en días.

Gompertz (Laird, 1965):

$$Y=a*\exp\left(-b*\exp\left(-c*T\right)\right) \quad (10)$$

Dónde: Y= es la variable de respuesta al tiempo (t); a= es el valor del máximo crecimiento y además determina un punto asintótico; b= número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha; c= establece la tasa intrínseca de crecimiento.

Bertalanffy (Bertalanffy, 1957):

$$Y = a * \exp(1 - b * \exp(-c * t)^3 \quad (11)$$

Dónde Y= es la longitud del individuo al tiempo (t); a= es la longitud máxima del individuo (asíntota máxima); c= es el parámetro de curvatura que expresa qué tan rápido la longitud alcanza su valor máximo; T es el tiempo.

Se consideró para el ajuste del modelo que, presentara alto valor de R^2, alta significancia, bajo error estándar de los parámetros y de estimación, menor cuadrado medio del error y aporte significativo de los parámetros de la ecuación.

Para definir los factores que determinan la eficiencia en la germinación *in vitro*, la morfología, y crecimiento de plántulas de *M. oleifera* en cultivos de tejidos, se utilizó la técnica multivariante de componentes principales, se comprobaron los supuestos de correlación entre variables originales según la prueba de Kaiser-Meyer-Olki (KMO) (Kaiser, 1974) y de esfericidad de Bartlett (Bartlett, 1937). Se extrajeron los factores mediante una matriz de correlación basada en autovalor, y para la rotación de la base de datos se empleó el método Varimax con normalizada de Kaiser para minimizar los factores que definen el modelo (Torres et al., 1993).

6.2 Evaluación del cultivo de *M. oleifera* inoculado con PGPR en condiciones de invernadero

6.2.1 Localización, control de temperatura, humedad relativa y preparación de sustrato para la evaluación de plantas inoculadas con PGPR.

La investigación se desarrolló en áreas del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBNOR en condiciones de vivero con climatización permanente durante 45 días. Para el estudio con las bacterias, la temperatura se controló mediante un registrador de temperatura HOBO 8K Pendant, parte UA-001-08, mientras que la humedad fue monitoreada mediante un termómetro digital VEE GEE (modelo 84004) (veegee máximo y mínimo dual-scale Digital termómetro, higrómetro y reloj, 0 A 50 grados C y 32 A 122 F : Amazon.es: Jardín), ambos dentro del cubículo.

Las lecturas de temperatura y humedad se efectuaron cada seis horas a partir de las 6:00 am, en los horarios de la madrugada, mañana, tarde y noche, para ello, el dispositivo HOBO posibilitó la programación del tiempo en que debía efectuarse las lecturas, mismas que fueron descargadas del dispositivo mediante un software auxiliar (Onset HOBOware versión 3.7.18) al concluir el período experimental. Como sustrato se empleó SOGEMIX-PGM® a base de turba de *Sphagnum* sp. de granulación fina.

Para la siembra de las plantas se prepararon cajas de plástico (58.2x 37.3 cm) con capacidad para 15 bolsas de polietileno (18x26 cm) llenas de sustrato SOGEMIX-PGM® a base de turba de *Sphagnum* de granulación fina. Las cajas se permeabilizaron con una lámina de polietileno para conservar una lámina de agua de 5 cm de altura, y se ubicaron 10 bolsas de polietileno llenas de sustrato humedecido durante 24 horas.

En las 24 horas posteriores del llenado de las bolsas para ambos experimentos, se aplicó riego directamente dentro de éstas, y a cada caja de plástico se añadieron nueve litros de agua corriente para garantizar la humedad del sustrato, este procedimiento fue repetido cada seis días durante toda la experimentación disminuyendo el volumen a tres litros de agua por cada caja, asegurando de esta manera la humedad durante el proceso de crecimiento de las plantas. Las bolsas que se emplearon en el estudio fueron perforadas en la base para facilitar la absorción de agua, los orificios se abrieron con un sacabocados de 5 mm de diámetro.

6.2.2 Condiciones de crecimiento de plantas inoculadas con PGPR

Las variaciones de temperatura y humedad relativa se monitorearon durante toda la experimentación cada seis horas para cada variable partir de las 6:00 am, arrojando valores promedios en: madrugada (22.8±0.2ºC), mañana (22.6±0.03ºC; 66.17±0.43%), tarde (31.5±0.22°C; 69.04±1.44%) y noche (23.79±1.54ºC; 69.88±1.70%).

6.2.3 Material vegetal

Las semillas de *M. oleifera* se colectaron en las coordenadas LAT 240° 07´45.47” y LON 110° 20´14.72”, en el estado de Baja California Sur, La Paz, México.

6.2.4 Diseño experimental y tratamientos

Para la evaluación con bacterias, se definieron como tratamientos (Tt): 1-Bacillus niacini; Tt 2-Moraxella osloensis, Tt 3-Bacillus cereus, Tt 4- Azospirillum brasilense Cd (control positivo) y Tt 5-control (CT) (riego con agua destilada sin aplicación de inóculos), los cuales fueron dispuestos en un diseño aleatoreo con cuatro repeticiones (Anexo I). El experimento se desarrolló en junio-julio de 2019.

6.2.5 Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas *Bacillus niacini* (Y11) y *Moraxella osloensis* (Y13) fueron aisladas de suelo, mientras que *Bacillus cereus* (A11) se aisló de rizosfera de albahaca (*Ocimum spp*.) en la localidad "Los Arados" (24° 47′ 12.26′′ N - 111° 11′ 21.14′′ W) a una elevación de 130 msnm, La Paz, Baja California Sur (Aguilar-Díaz, 2014). Estas se encontraban en crio conservación (-80ºC) en tubos de 1 mL en medio YMA Closest Match. *Azospirillum brasilense* Cd se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos DSMZ (DSM 1843).

El proceso de reactivación y generación de los inóculos se desarrolló en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR. Las cepas fueron extraídas de los ultra congeladores ubicados en el CIBNOR y se mantuvieron a 25°C durante media hora para su descongelación, la reactivación se hizo en placas Petri (tres placas por cepa) con agar nutritivo (8 g L^{-1} BD Difco 234000, 2% de agar Sigma 05040), cada placa contenía 15 ml del medio las cuales fueron puestas en reposo dentro de la campana durante 24 horas, y por medio de estría cruzada se sembraron las cepas para comprobar la pureza de estas. Se incubaron a 30ºC durante 24-72 horas utilizando una incubadora marca SHEL-LAB modelo 1510E, transcurrido este tiempo se extrajeron y con la ayuda de un estereoscopio se comprobaron las características morfológicas de las colonias descritas por Aguilar-Díaz (2014). Las placas fueron utilizadas como stock para resiembras posteriores, mantenidas a 4ºC.

Se prepararon tres matraces para cada cepa con 25 mL de caldo nutritivo (BD Difco 234000), los mismos fueron inoculados con tres asadas, incubados (incubadora AMEREX modelo SK-775) a 30ºC en agitación constante (150 rpm) durante 24-72 horas, transcurrido este tiempo se

tomaron 100 µL de cada matraz para disponerlo en un tubo Eppendorf que contenía 900 µL de solución salina fisiológica (80% p/v).

Cada tubo se homogenizó en un Vortex (VWR modelo 97043-562), desarrollándose diluciones seriadas hasta 10^6 UFC, de las cuales se consideraron las tres últimas (10^4, 10^5 y 10^6 UFC). De estas diluciones se tomaron 100 µL que se depositaron en cajas Petri con agar nutritivo (Agar Sigma 05040) por duplicado. Con ayuda de asas bacteriológicas triangulares se sembraron de manera uniforme sobre toda la superficie, se incubaron a 30°C durante 24-72 horas y después de transcurrido este tiempo se sacaron de la incubadora y utilizando un transluminador, se realizó conteo viable de las colonias en cada placa (10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6} UFC) mediante la relación descrita por Madigan et al., (2004):

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias } x \text{ factor de dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}} \quad (12)$$

Este procedimiento se repitió varias veces antes y después de la preparación de los inóculos para estandarizar la biomasa requerida en la preparación de los inóculos a aplicar, además de comprobar la pureza de las cepas y mantener renovado el crecimiento bacteriano.

6.2.6 Preparación de inóculos

Se prepararon 75 mL de caldo nutritivo distribuido (BD Difco 234000) en tres matraces con 25 mL, a razón de 8 g L^{-1} según recomendaciones del fabricante, éstos fueron esterilizados en autoclave a 1.5 atm de presión y 121ºC durante 15 min, después de un reposo de 24 horas éstas fueron inoculadas con cultivo de las placas sembradas como stock descritas en la sección 6.2.5. Se tomaron tres asadas de cada cepa las cuales fueron inoculadas a cada matraz, mismas que fueron incubadas (incubadora AMEREX modelo SK-775) a 30ºC en agitación constante (150 rpm) durante 24-72 horas.

Después de la incubación de cada cepa bacteriana, se prepararon en matraces de dos litros los inóculos bacterianos, suspendidos sin lavado previo en 1.5 L de agua destilada previamente

esterilizada (autoclave a 1.5 atm de presión y 121ºC durante 15 min). La concentración de la suspensión se ajustó a $1x10^7$ UFC mL^{-1} mediante la ecuación de las soluciones concentradas:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (13)$$

Se extrajeron 100 µL de los matraces, y se distribuyeron con asas bacteriológicas triangulares sobre la superficie de cajas Petri que contenían agar nutritivo. A las 24 horas se hizo el conteo de las UFC, para corroborar la concentración preparada.

6.2.7 Aplicación de inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos, (*B. niacini* (Y11), *M. osloensis* (Y13), *B. cereus* (A11), *A. brasilense* Cd (DSM 1843) preparados en 1.5 L a $1x10^7$ UFC mL^{-1}, se aplicaron en dosis de 25 mL en la base del tallo de cada plántula (60 plantas/tratamiento) cada siete días por cuatro ocasiones a las 9:30 am, las aplicaciones comenzaron cuando el 98% de las semillas de *M. oleifera* estuvieron germinadas.

6.3 Evaluación de la morfología estomática de plantas de *M. oleifera* inoculadas con ribacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en condiciones de invernadero.

6.3.1 Mediciones en las plantas inoculadas con PGPR. Anatomía de hojas y estructura estomática.

Un día antes del corte, de las plantas seleccionadas de forma aleatoria en cada réplica correspondiente a cada tratamiento, se tomaron por tratamiento tres láminas foliares de la primera hoja imparipinnada las cuales fueron homogenizadas, seleccionándose dos láminas de forma aleatoria para tomar una submuestra de 1 cm^2 para el análisis de la anatomía de la hoja y estructura estomática mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Las muestras foliares (1 cm^2) se trasladaron al Laboratorio de Microscopia Electrónica del CIBNOR, donde fueron fijadas en glutaraldehído 2.5% en amortiguador de cacodilatos (pH 7.4), se realizaron enjuagues para eliminar el fijador con amortiguador de cacodilatos por 30 minutos tres veces; y se sometieron a un gradiente de alcohol 30, 60, 80 y 100% respectivamente, por 40

minutos cada paso repitiendo tres veces el 100%, con la finalidad de sustituir cualquier residuo de agua restante (Hayat, 1972).

Una vez deshidratadas por alcohol se sometieron a secado a punto crítico utilizando un secador de punto crítico (CPD, siglas en inglés) (SAMDRI PVT-3D). Antes de la observación fueron recubiertas de oro (Au) empleando un sistema de evaporación de metal, Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y toma de imágenes se desarrollaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi, S-300N, Quartz PCl software). Para ello se ubicaron cuadrantes a x300, x500 para conteo y caracterización morfológica, respectivamente, y x1.5 K para observación de detalles del estoma.

De cada muestra foliar se consideró el haz y el envés. Las lecturas fueron realizadas en hojas diferentes dentro de cada réplica correspondiente a cada tratamiento. Se consideró la densidad estomática (mm^2), largo y ancho de los estomas (µ), y el área del estoma a partir de la relación (células guarda + poro) (León de la Luz and Fanjul, 1983). El largo y ancho de los poros (µ), y proporción del área del poro con respecto al tamaño del estoma (%), para las medidas de los estomas se empleó el software libre ImageJ (https://imagej.net/Downloads).

6.3.2 Procedimiento estadístico

Se desarrolló ANAVA unifactorial mediante el software Statistica versión 12.0, y se comprobaron los supuestos mencionados en la sección 6.1.9.

6.4. Caracterización del proceso de crecimiento, desarrollo y producción de biomasa de plántulas de *M. oleifera* inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero.

6.4.1 Análisis morfológico de plantas inoculadas con PGPR

Cinco plantas de *M. oleifera* por réplica, seleccionadas de forma aleatoria para cada tratamiento (inóculos bacterianos) se les midió la altura (cm) (desde la base del tallo hasta la yema apical) antes de la primera aplicación de los inóculos bacterianos y del extracto de microalga dulceacuícola, respectivamente, luego cada cinco días hasta completar la edad de evaluación (45 días).

En el momento del corte (45 días de edad) se consideró el largo y ancho (base, medio y apical) de la primera hoja (cm) con ayuda de un vernier digital de 0.01 mm de precisión, el número de hojas por planta también se cuantificó, también se midió el grosor de los tallos (cm), a cinco centímetros de altura de la base de éste, mediante un vernier (STEREN).

Se midió la longitud de la raíz, desde el cuello hasta la cofia con un vernier digital (STEREN), y con los valores de longitud del tallo y de la raíz se calculó la relación tallo/raíz y el índice de robustez según las relaciones que se describen en la siguiente ecuación:

$$\text{IR}=\frac{\text{Altura de la planta (cm)}}{\text{Diámetro del cuello de la raíz (mm)}} \tag{14}$$

Se separaron las hojas, tallos y raíz de cada réplica dentro de cada tratamiento y se introdujeron en una estufa de circulación a 35 ºC hasta peso constante. El peso seco de cada tejido se utilizó para el cálculo de índices de calidad en base a proporción de biomasa (PB), proporción de hojas (PPH), proporción de tallos (PPT), proporción de raíz (PPr) de acuerdo a Villar et al., (2004) e índice de Dickson (ID) y de lignificación (IL) (Dickson et al., 1960; Villalón et al., 2016), respectivamente, los cuales se relacionan a continuación:

$$\text{Proporción de biomasa}=\frac{\text{Biomasa aérea (BMA)}}{\text{Biomasa de raíz (BMR)}} \tag{15}$$

$$\text{Proporción de hojas } (\text{gr}_{(\text{hojas})}\ \text{gr}^{-1}_{(\text{planta})})(\text{PPH}) = \frac{\text{Peso de hojas}_{(\text{gr})}}{\text{Peso de planta}_{(\text{gr})}} \tag{16}$$

$$\text{Proporción de tallos } (\text{gr}_{(\text{tallos})}\ \text{gr}^{-1}_{(\text{planta})})(\text{PPT}) = \frac{\text{Peso de tallos}_{(\text{gr})}}{\text{Peso de planta}_{(\text{gr})}} \tag{17}$$

$$\text{Proporción de raíz } (\text{gr}_{(\text{raíz})}\ \text{gr}^{-1}_{(\text{planta})})(\text{PPR}) = \frac{\text{Peso de raíz}_{(\text{gr})}}{\text{Peso de planta}_{(\text{gr})}} \tag{18}$$

$$\text{Índice de Dickson (ID)} = \frac{\text{Masa seca total }_{(\text{gr})}}{\frac{\text{Altura}_{\text{cm}}}{\text{Diámetro}_{\text{mm}}}+\frac{\text{Masa seca aérea}_{\text{gr}}}{\text{Peso de la raíz}_{\text{gr}}}} \tag{19}$$

$$\text{Índice de Lignificación (IL)} = \frac{\text{Masa total seca}_{\text{gr}}}{\text{Masa total húmeda}_{\text{gr}}} \tag{20}$$

6.4.2 Determinación del rendimiento de biomasa seca en hojas y planta íntegra

Los valores de peso seco de hojas y tallos se utilizaron para determinar el porcentaje de BS según la siguiente ecuación:

$$\%BS=\left[\left(PF-PS\right)/PF\right] \quad (21)$$

Dónde: PF= Peso fresco de la muestra; PS= Peso seco de la muestra

A partir del peso fresco y las dimensiones de las charolas (0.1225 m^2) se estimó el rendimiento de Materia verde (MV) por metro cuadrado (m^2), y este valor se multiplicó por el porcentaje de BS correspondiente y dividió entre 100 para obtener el peso seco de la muestra (hojas y tallos), luego se extrapoló el valor a una hectárea (10 000 m^2) y de esta manera se obtuvo el rendimiento de hojas BS ha^{-1}. El rendimiento de la planta íntegra se obtuvo a partir de la sumatoria de los pesos secos de hojas y tallos.

6.4.3 Mediciones morfo fisiológicas

La tasa de crecimiento absoluto (TCA) y la tasa de crecimiento relativo (TCR) se calcularon mediante las medidas de altura de las plantas tomadas cada cinco días después de la aplicación del primer inóculo, de acuerdo con los procedimientos descritos por De Armas et al., (1988) y cuyas ecuaciones se identifican en el apartado 6.1.5 como (6) y (7).

La estimación del AF se desarrolló a partir de ecuaciones de regresión múltiple para la evaluación con PGPR (Tabla a) y extractos de microalgas (Tabla 2), según el siguiente modelo matemático:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1_i} + \beta_2 X_{2_i} + \beta_3 X_{3_i} \ldots \beta_k X_{k_i} + \varepsilon_i \quad (22)$$

Dónde:

Y_i= representa AF como variable dependiente; β_0= Y-intercepto o coordenada de origen; β_1, β_2, β_3…β_k= Pendientes de la ecuación; X_{1i}= Representa el efecto medio del promedio de la variable largo de hoja; X_{2i} = Representa el efecto medio del promedio de la variable ancho de hoja; X_{3i}=

Representa el efecto medio del promedio de la variable área de la hoja; $\beta_k X_{ki}$=Recta de regresión de Y sobre X_1, X_2, X_3…… X_k; ε_i= Error para cada variable independiente.

Tabla 2. Expresiones de regresión múltiple para el cálculo de Área Foliar en la evaluación con PGPR.

R: Coeficiente de determinación, R^2: Coeficiente de determinación al cuadrado; R^2 ajustada: Coeficiente de determinación ajustado; ±EE: Error estándar

Tto	Modelo de regresión	R	R^2	R^2 ajustada	±EE
I	0.929633(±0.086853)+0.142093(±0.013275) L * A	0.92	0.86	0.85	1.04
II	0.947314(±0.075497)+0.110796(±0.008830) L* A	0.94	0.89	0.89	0.58
III	0.789944(±0.144528)+0.079625(±0.014568) L* A	0.78	0.62	0.60	0.78
IV	0.891210(±0.106912)+0.084976(±0.010194) L * A	0.89	0.79	0.78	0.61
V	0.886653(±0.112157)+0.080604(±0.010196) L * A	0.88	0.78	0.77	0.63

A partir del valor del (AF) se calculó: Duración del área foliar (DAF) (5) e Índice de área foliar (IAF) (6).

Relacionando el AF, el peso fresco de hojas, tallos, raíces y planta íntegra como sumatoria del peso de los órganos mencionados y considerando los criterios de Villar et al., (2004) se estimaron las siguientes variables:

$$\text{Área Efectiva Foliar (AEF)}(cm^2_{hojas}\ gr^{-1}_{hojas}) = \frac{AF\ (cm^2)}{\text{Peso fresco de hojas}_{(gr)}} \quad (23)$$

$$\text{Tasa de Asimilación Neta (TAN)}(gr_{\text{planta íntegra}}\ cm^2_{hojas}\ día^{-1}) = \frac{AF\ (cm^2)}{\text{Peso fresco de la planta}_{(gr)}} \quad (24)$$

$$\text{La Razón de Área Foliar (LRA)}(gr_{(hoja)}\ gr_{(planta)^{-1}} = \left[\left(AF_{(hojas)} * \text{Peso de hojas}_{(gr)}\right)\right] x \left[\left(gr_{(hojas)} * gr_{(planta)}\right)\right] \quad (25)$$

$$\text{Proporción de hojas}\ (gr_{(hojas)}\ gr^{-1}_{(planta)}) = \frac{\text{Peso de hojas}_{(gr)}}{\text{Peso de planta}_{(gr)}} \quad (26)$$

$$\text{Proporción de tallos}\ (gr_{(tallos)}\ gr^{-1}_{(planta)}) = \frac{\text{Peso de tallos}_{(gr)}}{\text{Peso de planta}_{(gr)}} \quad (27)$$

$$\text{Proporción de raíz}\ (gr_{(raíz)}\ gr^{-1}_{(planta)}) = \frac{\text{Peso de raíz}_{(gr)}}{\text{Peso de planta}_{(gr)}} \quad (28)$$

6.4.4 Análisis estadístico

Se desarrolló ANAVA unifactorial mediante el software Statistica versión 12.0, y se comprobaron los supuestos mencionados en la sección 6.1.9. Para la comparación de media se empleó la prueba de Tukey.

Para la altura de la planta, se procedió en un Análisis de Covarianza (ANACOVA), considerándose como covariable la altura de la planta antes de la aplicación de los tratamientos (inóculos de PGPR) y como variable dependiente, altura final (45 días). Se comprobaron mediante regresión lineal y correlación, la dependencia y multicolinealidad entre variable dependiente y covariable, así mismo los criterios de normalidad y homocedasticidad según las sugerencias de Kolmogorov-Sminirnov y Shapiro-Wilk, respectivamente. El análisis se desarrolló mediante el siguiente modelo matemático:

$$Y=\mu+T_i-b\ X_j+e_{ij} \qquad (29)$$

Dónde: μ= promedio del modelo; T_i= i-ésimo tratamiento; b=constante del modelo; X_j=j-ésima altura; e= error de la estimación.

6.5 Analizar el contenido de antioxidantes en hojas de plantas de *M. oleifera* inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en condiciones de invernadero.

6.5.1 Muestras para determinación de minerales mediante EDX

Las muestras foliares que fueron procesadas para MEB (sección 6.3.1), se utilizaron para la cuantificación mineral en hojas (N, P, K, Mg, Si, Ca, Fe, Zn, Mo, Co, Cu, Al, Cd, As, Pb, Hg, Mn, Na, B) a partir de EDX, y raíz (N, P, S, Si, Ca, Mg, Fe, Zn, Mo, Co, Cu, Al, Cd, As, Pb, Hg, Mn, B), tomándose segmentos de 1 cm^2 de cinco plantas por réplica dentro de cada tratamiento para hojas y raíces.

6.5.2 Preparación de extractos para análisis fitoquímicos

De las láminas foliares, cuyo procedimiento de toma de muestras se describe en la sección 6.3.1, se tomó un gramo y se congeló a -5ºC, para descongelarlas se dejaron 30 minutos a

temperatura ambiente, y luego fueron suspendidas en 100 mL de etanol absoluto y agitación durante 24 horas a temperatura ambiente.

El extracto fue filtrado en papel Whatman® No.1, y concentrado en un evaporador rotativo a 40°C. El extracto fue disuelto nuevamente en 1 mL de etanol metanol para análisis de composición fitoquímica (pigmentos fotosintéticos y metabolitos secundarios).

6.5.3 Pigmentos fotosintéticos

Para el procesamiento de las muestras se procedió según las recomendaciones de Arnon (1949). Se tomaron tres muestras foliares (30±10 mg) por cada réplica, las muestras se introdujeron en tubos Eppendorff que contenían 5 mL de acetona (100% grado HPLC), y se envolvieron en papel aluminio para protegerlas de la luz, se mantuvieron en refrigeración (~4°C) hasta su utilización, pasado este tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min.

El extracto de pigmentos se recuperó con pipetas Pasteur de vidrio limpias y se guardaron en frascos viales color ámbar, posteriormente se procedió a la separación de compuestos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, modelo 1100, Hewlett Packard, Alemania), para la separación de los compuestos se consideraron las recomendaciones de Vidussi et al., (1996).

El extracto (20 µL) se inyectó a través de un circuito de 200 µL en el sistema HPLC (bomba constamétrica LDC 4100, espectromonitor LCD 3100 configurado a 440 nm y detector de matriz de fotodiodo de 991) equipado con un MOS Hypersil® de 3 µm, 10 cm, 4.6 mm (ID) Columna C8 (Shadon). La elución se realizó en caudal de 1 mL min^{-1} usando un gradiente binario lineal entre el disolvente A (MeOH: acetato de amonio acuoso 0,5 N, 70:30 v/v) y el disolvente B (MeOH) que se programó de acuerdo con el siguiente procedimiento (minutos; % solvente A, % solvente B) :(0; 75.25), (15; 0.100), (18.5; 0.100), (19; 75.25). La identificación de los pigmentos se realizó mediante la comparación de los espectros de absorción recogidos de las muestras con los de la biblioteca de espectros establecida a partir de cultivos de referencia.

6.5.4 Flavonoides y polifenoles totales

El contenido fenólico total (CFT) se cuantificó con el Método Foline-Ciocalteu como se informó anteriormente por Ardestani y Yazdanparast (2007), reportándose como mg de ácido gálico (AGA) por gramo de extracto en peso seco (mg g^{-1} PS). El reactivo de Folin-Ciocalteu (125 µL), agua destilada (1.25 mL) y la muestra (250 µL) se mezclaron y se dejó reposar en oscuridad y temperatura ambiente durante cinco minutos. Luego, se agregaron 375 µL de Na_2CO_3 (20%) y 500 µL agua destilada, homogenizándose la solución para colocarla posteriormente en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h. La absorbancia se midió a 750 nm (por sextuplicado) usando un espectrofotómetro ultravioleta visible (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

El contenido total de flavonoides (CTF) se obtuvo mediante el método colorimétrico de Cloruro de aluminio (Panche et al., 2016). Un volumen de 250 µL del extracto se añadió a 75 µL de solución de $NaNO_2$ al 5% y 1 mL de agua destilada. Se dejó que la mezcla reaccionara durante cinco minutos antes de agregar 75 µL de $AlCl_3$ (10%) y se incubaron durante seis minutos. Luego, 500 µL de NaOH (1 M) y 600 µL de agua destilada fueron añadidos. Después de 15 minutos de incubación, la absorbancia se midió a 510 nm (por triplicado). Los CTF se cuantificaron como mg equivalentes de quercetina (QE) por gramo de extracto en peso seco (mg g^{-1} PS) como curva estándar.

6.5.5 Análisis estadístico

Se comprobaron los supuestos mencionados en la sección 6.1.7. Se desarrolló un ANOVA unifactorial y la comparación de medias se desarrolló mediante la prueba de Tukey.

Seguidamente, para definir los factores en que los inóculos resultaron eficientes en cuanto a extracción y contenido mineral de hojas y raíces se empleó la técnica multivariante de componentes principales. Se comprobaron los supuestos de correlación entre variables originales mediante la KMO (Kaiser, 1974) y prueba de esfericidad de Bartlett (Bartlett, 1937). Se extrajeron los factores mediante una matriz de correlación basada en autovalor, y para la rotación de la base de datos se empleó el método Varimax con normalizada de Kaiser para minimizar los factores que definen el modelo (Torres et al., 1993).

7. RESULTADOS

7.1 Germinación

El medio de cultivo húmedo propició el mayor porcentaje en la germinación acumulada (P≤0.05) respecto al resto de los tratamientos, seguido por los medios Agua-Agar 0.8% y MS. En los índices que describen la calidad de la germinación, para las variables DPG, TMG e IVG el medio MSG se mostró significativamente inferior (P≤0.05) respecto al resto de los medios en el aporte a estas variables, para el IG el medio húmedo, volvió a diferenciarse (P≤0.05) del resto de los tratamientos, y MSG permaneció inferior (P≤0.05) (Tabla 3).

Tabla 3. Germinación de semillas de M. oleifera en diferentes medios de crecimiento para el cultivo de tejido in vitro.

DPG: Días para germinar; TMG: Tasa media de germinación; IVG: Índice de velocidad de germinación; IG: Índice de germinación; ±EE: Error estándar; F: valor tabulado, P: pvalor

Medio de cultivo	Germinación Acumulada (%)	DPG (días)	TMG (días)	IVG	IG	[1]Contaminación (%)
MSG	93.9±0.09[c]	7.5±2.45[c]	1.37±1.04[c]	0.95±0.93[c]	1.47±1.32[c]	0.00±0.0 (1.11)
MS	96±0.16[b]	5±1.58[ab]	2.29±1.87[ab]	2.38±2.18[ab]	3.25±2.88[b]	0.004±0.01 (1.12)
Agua-Agar 0.8%	94±0.20[bc]	5±1.58[ab]	2.24±1.42[ab]	2.47±2.30[ab]	3.32±3.21[b]	0.00±0.0 (1.11)
Medio Húmedo	100±0.0[a]	4.5±1.29[a]	2.98±2.38	3.71±3.66[a]	4.85±4.73[a]	0.00±0.0 (1.11)
±EE	7.78	0.54	0.115	0.33	0.2	0.0000016
F	0.55	3.24	0.57	1.08	0.96	1.2
P	0.020	0.046	0.023	0.038	0.043	0.35

[a, b, c] Superíndices diferentes dentro de una misma columna, sugieren diferencias significativas según Tukey (P≤0.05).
[1]Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según

$$Arcos = (\sqrt{(\frac{x}{100})})$$

7.2 Desarrollo de plántulas emergidas

Al evaluar las plantas emergidas y que crecieron sobre los medios de cultivos propuestos (Tabla 4), se obtuvo que el tipo de medio modificó de forma significativa (P≤0.05) el número de brotes, donde los medios MS y MSG estimularon su aparición (P≤0.05) respecto a los medios Agua-Agar 0.8% y húmedo. Para el número de hojas, fueron estos últimos medios y el MS los que favorecieron su aparición (P≤0.05), respecto al MSG, sin embargo, este medio, en conjunto con los medios Agua-Agar 0.8% y húmedo estimularon (P≤0.05) la longitud de la raíz principal, pero sin incrementar (P≥0.05) el número de raíces secundarias.

7.3 Crecimiento de plántulas

El análisis de la dinámica de crecimiento de las plantas sobre los diferentes medios de cultivos mediante regresiones no lineales constituye la primera referencia acerca del crecimiento de plántulas de *M. oleifera* en condiciones *in vitro* (Figura 10).

Tabla 1. Influencia de medios de crecimiento para el cultivo de tejidos in vitro en el desarrollo morfológico de plántulas de M. oleifera germinadas in vitro.

LT: Longitud del tallo; GT: Grosor del tallo; NB: Números de brotes; NH: Número de hojas; LH: Longitud de hojas; AH: Ancho de hojas; LR: Longitud de la raíz; NRS: Número de raíces secundarias.

Medio de cultivo	LT (mm)	GT (mm)	[1]NB	[2]NH	[3]LH (mm)	AH (mm)	LR (mm)	NRs
MSG	53.98±28.5	2.14±0.5	0.20±0.5[a] (2.68)	4.8±2.2[b] (3.11)	12.77±10.1 (3.57)	11.78±10.2	76.92±17.6[a]	17.28±5.4
MS	65.58±15.5	2.29±0.5	0.16±0.6[a] (2.67)	7.08±1.2[a] (3.47)	10.95±2.9 (3.43)	8.78±2.3	48.69±16.3[b]	18.83±3.2
Agua-Agar 0.8%	53.79±12.4	1.68±0.4	0.0±0[b] (2.64)	6.62±0.7[ab] (3.40)	10.27±2.3 (3.33)	6.23±2.3	59.11±12.8[ab]	16.87±7.3
Medio Húmedo	53.47±7.7	1.84±0.5	0.0±0[b] (2.64)	5.50±0.9[ab] (3.23)	8.18±3.5 (2.95)	5.01±2.3	59.84±38.3[ab]	19±11.4
±EE	9.74	0.017	0.017	0.008	0.01	2.06	0.047	0.23
F	0.806	2.64	2.64	4.93	0.726	1.66	4.28	0.22
P	0.49	0.64	0.04 4	0.005	0.54	0.19	0.01	0.87

[a, b] Superíndices diferentes, sugieren diferencias significativas según Tukey para P≤0.05.
[1]Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según √x+5
[2]Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según √x+3
[3]Valores entre paréntesis corresponden a promedios transformados según √x+1

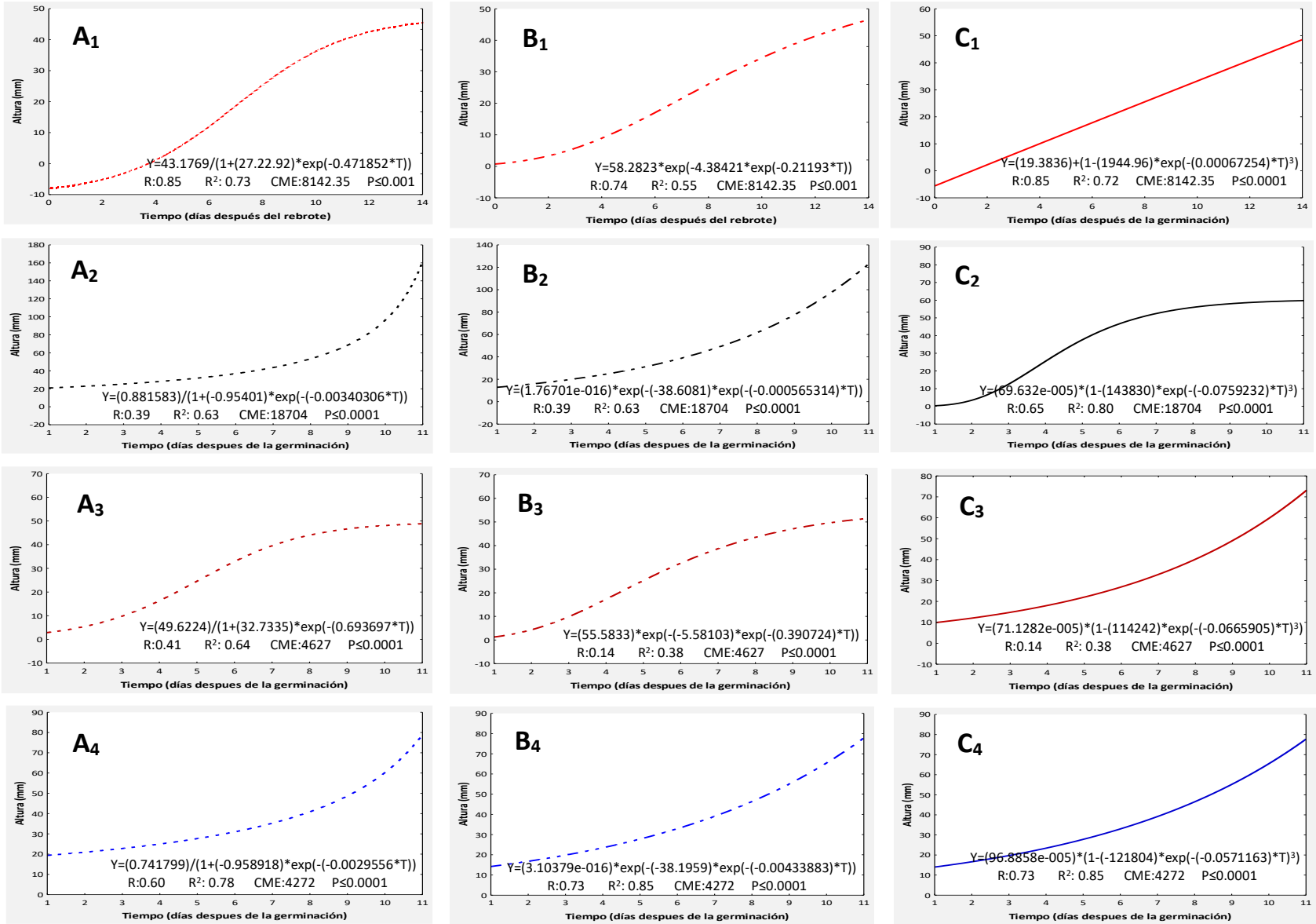


Figura 10. Curvas de crecimiento de plántulas de *M. oleifera* germinadas sobre medio MS (A_1-C_1 línea roja), MSG (A_2-C_2 línea negra), Agua-Agar 0.8% (A_3-C_3 línea rojo oscuro) y húmedo (A_4-C_4, línea azul).

Ajuste a los modelos: Logístico (A): líneas discontinuas; Gompertz (B); Bertalanffy (C). R: coeficiente de determinación; R^2: coeficiente de determinación al cuadrado; CME: Cuadrado medio del error; P: p valor

El modelo que mejor describió el crecimiento de las plantas desde el punto de vista biológico sobre medio MS (R^2: 0.73; P≤0.001) y Agua-Agar 0.8 % (R^2: 0.64; P≤0.001) fue el modelo Logístico (Figura 2 A1 y A3, respectivamente), señalando en medio MS crecimiento máximo de 43.17 mm con tasas de 0,47 mm día^{-1}, observándose para ambos medios una curva de crecimiento similar a la exponencial. El modelo de Bertalanffy describió el crecimiento (R^2: 0.80; P≤0.0001) de aquellas plantas que crecieron sobre MSG (Figura 2 C2) con tasas de 0,07 mm día^{-1} y crecimiento máximo de 69.6 mm en una curva con un largo recorrido y discreto ascenso. Para las plantas CT los modelos Gompertz y Bertalanffy fueron muy parecidos en la descripción del crecimiento (R^2: 0.85) (Figura 2 B4 y C4) con curvas muy similares, sugerentes a un lento crecimiento. Atendiendo al ajuste de los modelos, las diferencias estriban en la composición de los medios de cultivos MS y MSG.

Con sustento a los aportes de los medios en la germinación de las semillas, crecimiento y desarrollo de las plántulas, se seleccionaron los medios MS y MSG para la multiplicación, con adición del promotor del crecimiento 6-Bencilaminospurina (6-BAP 0.001 g mL^{-1}). El medio MSG resultó ser superior (F=7.6123; P=0.010686; ±EE=0.13) en la producción de explantes con 31.54±20.66%, respecto al MS (3.87±9.10%). Indicando estas respuestas, un cambio en la tasa metabólica de las células, respecto al crecimiento de la plántula con cotiledón, ya que en la etapa anterior el medio MSG no arrojó mejores resultados que el medio MS.

7.4 Regresión entre germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas

Se percibió en variables que relacionan la caracterización de la semilla un posicionamiento cercano al origen en una convergencia positiva (Figura 11), y en el orden más alejado del origen, variables que se relacionaron con el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

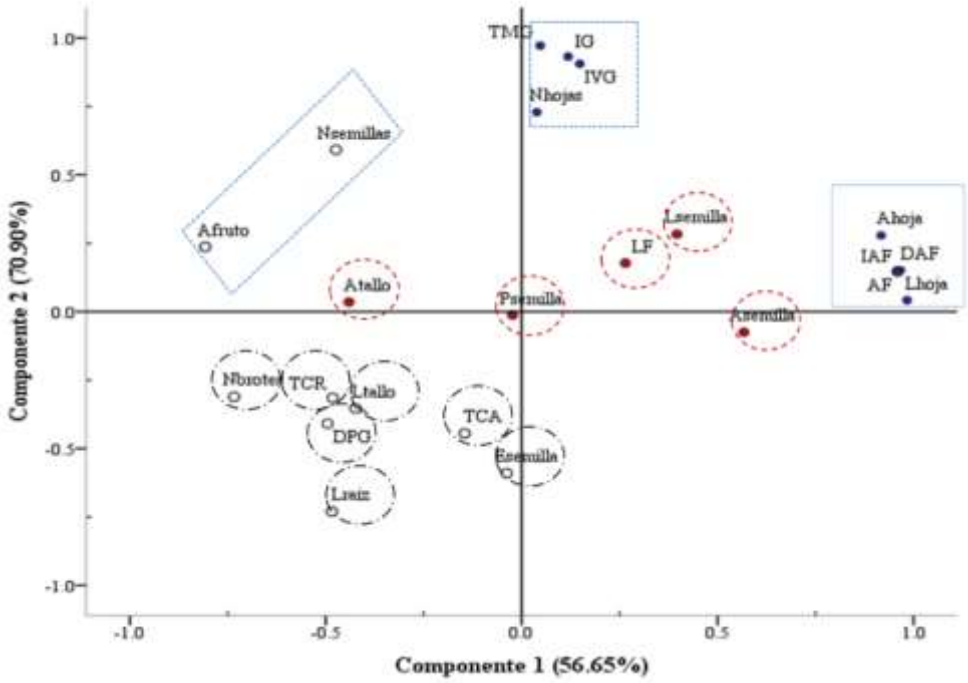


Figura 11. BIPLOT resultante del análisis de componentes principales del proceso de germinación, brotación y desarrollo de vitro plantas de M. oleifera.

ES: Espesor de la semilla; PS: Peso de la semilla; TCA: Tasa de Crecimiento Absoluto; TCR: Tasa de Crecimiento Relativo; LR: Largo de la raíz; LT: LT; DPG: DPG; AS: Ancho de la semilla; AT: Ancho del tallo; AF: Ancho del fruto; NS: Número de semillas; NH: Número de hojas; IG: Índice de germinación; IVG: Índice de la velocidad de germinación; TMG: Tiempo medio para germinar; LS: Largo de semilla; LH: Largo de hoja; DAF: Duración del área foliar; AF: Área foliar; IAF: Índice de área foliar; AH: Ancho de hoja. Líneas rojas: variables de peso; Línea azul: variables de poco aporte el ACP; Línea negra: variables sin ningún aporte al análisis.

Con las variables que se emplearon para caracterizar el proceso de germinación, crecimiento y morfología de plántulas de *M. oleifera* se generó un BIPLOT 3D (Figura 11), para la interpretación de este se consideró, el aporte de cada variable dentro de los componentes, y su ubicación respecto al origen, ya que las más alejadas del mismo son las más inestables y las que menos aportes hacen al proceso de germinación, crecimiento y desarrollo de plántulas de *M. oleifera* en condiciones *in vitro*, considerándose de impacto las variables próximas al origen en el BIPLOT (Varela y Castillo, 2005).

La componente uno vinculó las variables morfológicas de la semilla (peso, largo y ancho de la semilla) con el ancho del tallo e indicadores fisiológicos que describen la germinación y desarrollo foliar en una convergencia positiva para explicar en un 56.65% de la varianza acumulada. Mientras que la componente dos con un 14.24%, posibilitó que entre las dos lograran explicar el 79.90% de la varianza acumulada. Convergió de forma negativa espesor de la semilla, longitud de la raíz, variables fisiológicas que describen el crecimiento (TCA, TCR), la germinación, morfología del tallo, número de brotes y otras fisiológicas que describen la germinación.

7.5 Morfología de estomas y epidermis

La morfología estomática varió por el efecto de los inóculos bacterianos y condiciones de crecimiento de las plantas (Tabla 5). Las plantas inoculadas con *M. osloensis* manifestaron de forma general, una gran variabilidad en la morfología estomática. En la longitud de los estomas, ésta se diferenció ($P \leq 0.001$) de las hojas de plantas inoculadas con *B. cereus*, y *B. niacini*, mientras que, para el ancho de las estructuras en mención, las diferencias se mantuvieron ($P \leq 0.001$) entre las plantas inoculadas respecto al CT. Entre las plantas inoculadas, solo las hojas de las inoculadas con *B. cereus* se diferenciaron del resto de los tratamientos.

Tabla 5. Morfología estomática de hojas de plantas de *M. oleifera* inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

Parámetros	*B. niacini*	*M. osloensis*	*B. cereus*	*A. brasilense*	Control	P valor
Longitud de estomas (µ)	15.96±2.32[bc]	18.12±1.97[a]	14.72±2.71[c]	16.72±2.55[ab]	17.85±2.77[abc]	0.0001
Ancho de estomas (µ)	10.11±2.05[ab]	11.04±1.53[a]	8.98±1.65[b]	9.67±1.65[ab]	8±1.85[bc]	0.0001
Área de estomas (μ^2)	162.43±44.20[b]	199.81±32.6[a]	134.15±41.75[c]	163.53±42.58[b]	144.22±47.40[b]	0.0001
Longitud del poro (µ)	10.75±1.76[b]	11.82±1.78[a]	8.93±2.05[c]	10.84±2.29[b]	11.41±2.59[ab]	0.0001
Ancho del poro (µ)	3.87±1.21[a]	3.95±1.39[a]	2.84±1.51[c]	3.99±1.82[a]	2.38±1.69[c]	0.02
[1]Área del poro (μ^2)	42.77±17.79[a]	48.48±22.5[a]	26.9±19[c]	45.29±25.9[a]	27.75±24.75[ab]	0.001
Proporción poro/estoma (%)	26.44±9.73[a]	23.52±8.67[ab]	18.85±10.13[b]	27.03±10.09[a]	18.82±10.06[ab]	0.02
[2]Densidad estomática (mm^2)	417.73±24.94	509.29±52.13	577.96±169.27	520.73±89.20	480.68±114.44	0.45

[a, b, c, d, e] Valores con superíndices diferentes, difieren entre sí en una misma columna para P≤0.05 según Tukey.

[1]Números entre paréntesis representan valores transformados para √#.

[2]Números entre paréntesis representan valores transformados para √x+15.85

Para el área de los estomas, las diferencias (P≤0.001) se hicieron más notorias entre las hojas de plantas inoculadas, destacándose nuevamente las hojas de plantas que crecieron bajo los efectos de *M. osloensis*, el área de los estomas, de las hojas de plantas inoculadas fueron similares (P≥0.05), pero inferiores (P≤0.001) a las obtenidas para el CT. En la longitud, ancho y área del poro, el *B. cereus* continuó marcando valores inferiores (P≤0.001) respecto al resto de los inóculos y el CT.

Las hojas de plantas inoculadas con *B. cereus* y *A. brasilense* presentaron el mayor valor (P≤0.001) en la proporción poro/estoma respecto a las hojas de las plantas inoculadas con *B. niacini*, el resto de los inóculos y CT, no se diferenciaron entre si (P≥0.05). La densidad estomática de hojas de plantas inoculadas y consideradas como CT, no se diferenciaron de forma significativa (P≥0.05), sin embargo, se observaron valores superiores a 500 estomas mm^2, respecto a *B. niacini* y CT (>400 estomas mm^2), que pudieran facilitar el proceso de intercambio gaseoso de la planta con el medio y tributar a una mayor eficiencia fotosintética. No se observó presencia de tricomas en ninguna de las epidermis de las hojas de plantas en las que se desarrolló el estudio.

Al analizar la anatomía de las hojas de *M. oleifera* que crecieron y se desarrollaron bajo el efecto de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Fig. 12; 13; 14; 15), CT (Fig. 16). Se observó de manera general que la epidermis adaxial (Fig. 12 BN; Fig. 13 MO; Fig 14 BC; Fig 15 AB: Fig. 16 CA; y abaxial (Fig. 12 BN2; Fg. 13 MO2; Fig. 14 BC2; Fig. 15 AB2; Fig. 16 CA2; fueron del tipo hipostomáticas de carácter mesomórfico con ondulación de paredes anticlinales de las células epidérmicas y aparatos estomáticos del tipo anomocítico, ubicados en la epidermis adaxial, los detalles de los estomas mostraron células guardas bien definidas y células oclusivas hundidas respecto a las células epidérmicas que las rodean con reborde cuticular a nivel del ostiolo (Fig. 12 BN1; Fg. 13 MO1; Fig. 14 BC1; Fig.15 AB1; Fig. 16 CA1). En la epidermis abaxial las células anticlinales mostraron el mismo patrón de ondulación. Se constató la presencia de sales en ambas epidermis.

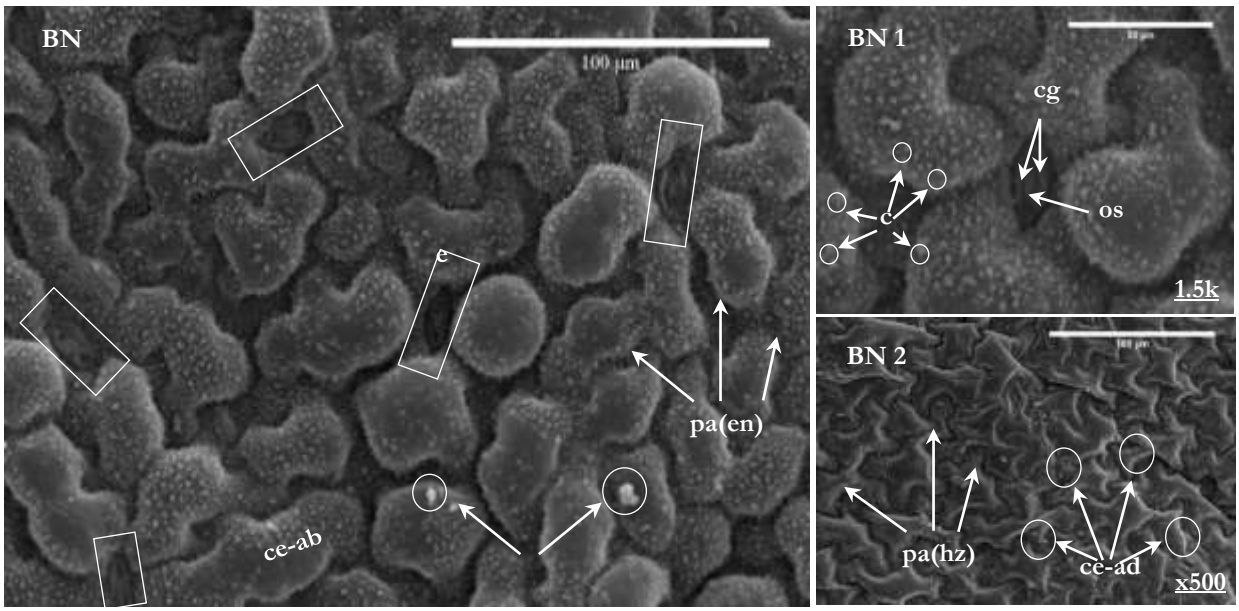


Figura 12. Micrografías de epidermis de hojas de M. oleifera inoculadas con Bacillus niacini (BN): cara Adaxial (BN) (x500), estructura del estoma (BN1) (1.5 k) y cara Abaxial (BN2) (x500).

e: Estoma; **ce-ab:** Célula de la epidermis abaxial; **ce-ad:** Célula de la epidermis adaxial; **cg:** Células guarda; **os:** Ostiolo; **pa(en):** pared anticlinal en células del envés; **pa(hz):** pared anticlinal en células del haz; **c:** Cristales. K representa x1000 magnificaciones

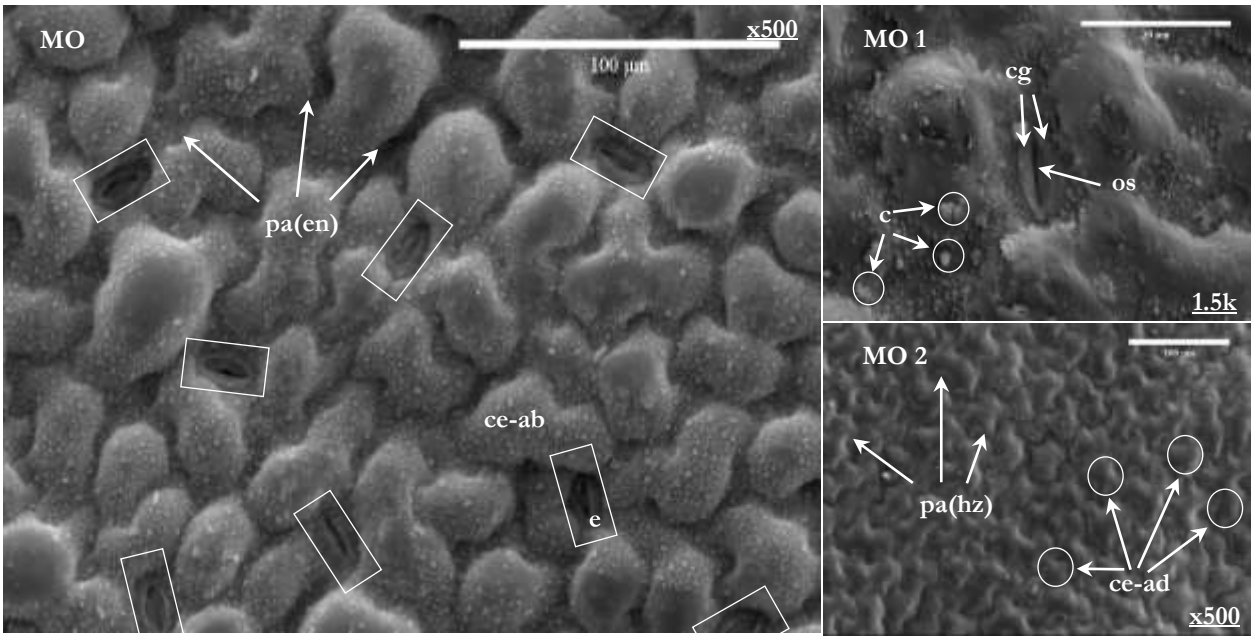


Figura 13. Micrografías de epidermis de hojas de M. oleifera inoculadas con Moraxella osloensis (MO): cara Adaxial (MO) (x500), estructura del estoma (MO1) (1.5 k) y cara Abaxial (MO2) (x500).

e: Estoma; **ce-ab**: Célula de la epidermis abaxial; **ce-ad:** Célula de la epidermis adaxial; **cg**: Células guarda; **os:** Ostiolo; **pa(en):** pared anticlinal en células del envés; **pa(hz):** pared anticlinal en células del haz; **c:** Cristales. K representa x1000 magnificaciones.

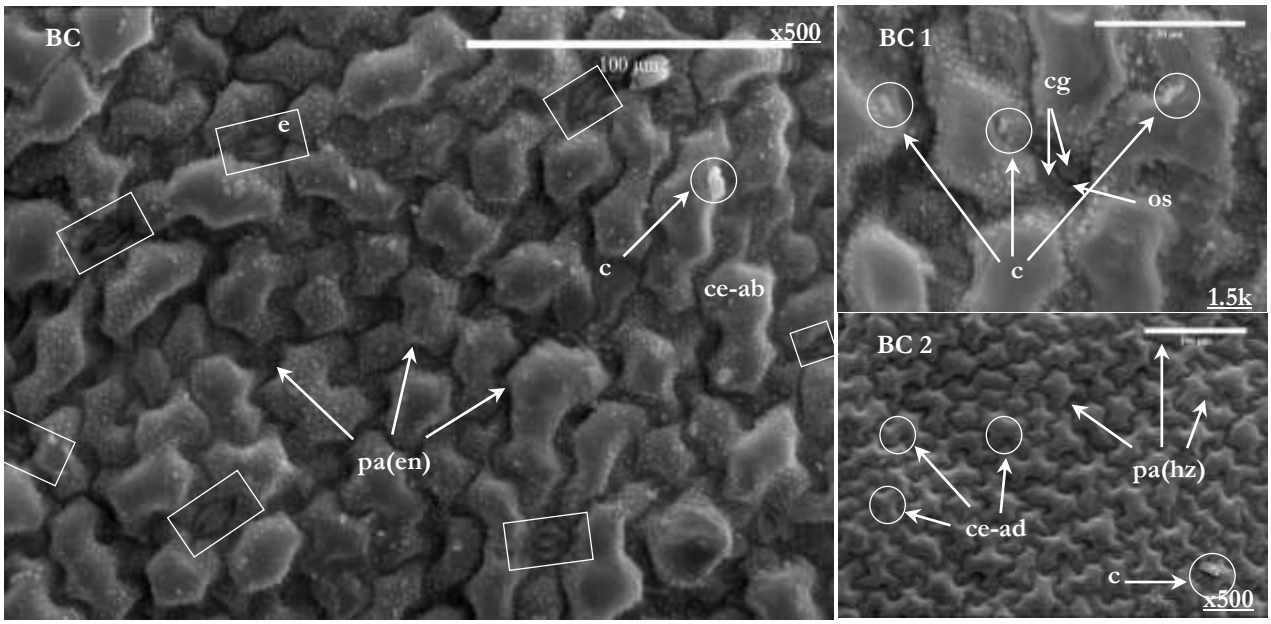


Figura 14. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Bacillus cereus* (BC): cara Adaxial (BC) (x500), estructura del estoma (BC1) (1.5 k) y cara Abaxial (BC2) (x500).

e: Estoma; **ce-ab**: Célula de la epidermis abaxial; **ce-ad:** Célula de la epidermis adaxial; **cg**: Células guarda; **os:** Ostiolo; **pa(en):** pared anticlinal en células del envés; **pa(hz):** pared anticlinal en células del haz; **c:** Cristales. K representa x1000 magnificaciones.

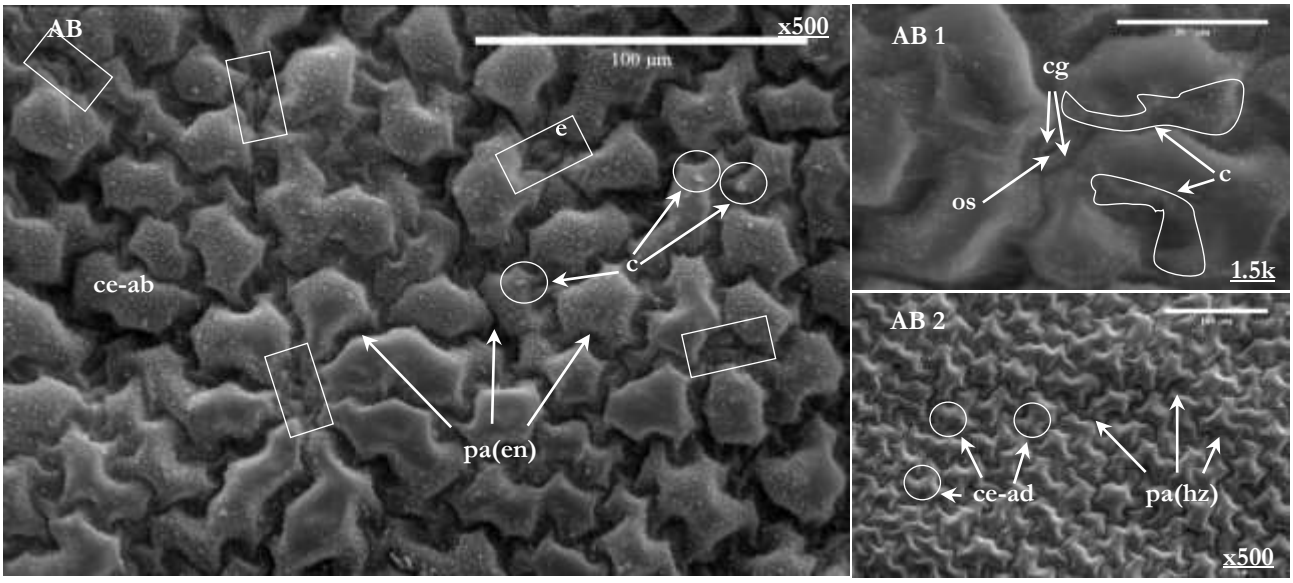


Figura 15. Micrografías de epidermis de hojas de *M. oleifera* inoculadas con *Azospirillum brasilense* Cd (AB): cara Adaxial (AB) (x500), estructura del estoma (AB1) (1.5 k) y cara Abaxial (AB2) (x500).

e: Estoma; **ce-ab**: Célula de la epidermis abaxial; **ce-ad:** Célula de la epidermis adaxial; **cg**: Células guarda; **os:** Ostiolo; **pa(en):** pared anticlinal en células del envés; **pa(hz):** pared anticlinal en células del haz; **c:** Cristales. K representa x1000 magnificaciones.

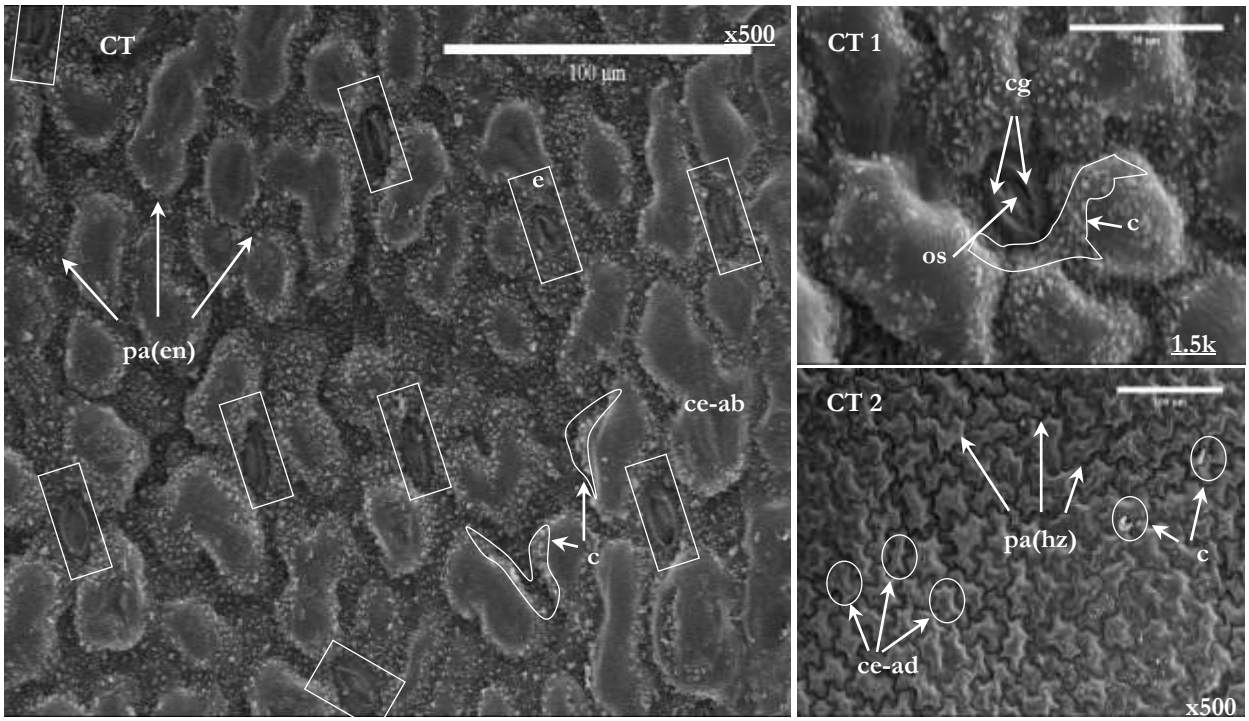


Figura 16. Micrografías de epidermis de hojas de M. oleifera denominadas control (CT): cara Adaxial (CT) (x500), estructura del estoma (CT1) (1.5 k) y cara Abaxial (CT2) (x500).

e: Estoma; **ce-ab**: Célula de la epidermis abaxial; **ce-ad:** Célula de la epidermis adaxial; **cg**: Células guarda; **os:** Ostiolo; **pa(en):** pared anticlinal en células del envés; **pa(hz):** pared anticlinal en células del haz; **c:** Cristales. K representa x1000 magnificaciones.

7.6 Morfofisiología de la planta

Se observó que los inóculos bacterianos promovieron el crecimiento respecto al control, y que *A. brasilense* se diferenció de forma significativa (P≤0.001) del resto de los tratamientos. *B. niacini* fue la cepa que menos aportes tuvo en el incremento de la altura de la planta, pero de igual forma se diferenció (P≤0.001) del control (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de covarianza para altura de la planta de M. oleifera a los 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

Tratamientos	[1]Altura de planta (cm)	±EE[1]	[2]Altura de planta (cm)	±EE[2]	[3]Significancia de la regresión
B. niacini	51.76	2.58	51.77[c]	2.96	
M. osloensis	62.23	3.53	61.78[b]	2.96	
B. cereus	57.55	2.70	60.91[b]	3.02	0.001
A. brasilense	68.70	4.06	67.17[a]	2.97	
Control	44.94	3.76	43.54[d]	2.97	

[1]Altura de la planta. Corresponden a promedios reales.
[2]Altura de la planta. Corresponde a promedios con valor de ajuste de 13.1, según ecuación de regresión del ANACOVA. P≤0.001
[3]Sugiere significación de ajuste del modelo regresión del ANACOVA.
±EE Error estándar para medias [1]reales y [2]ajustadas
[a, b, c, d] Superíndices diferentes dentro de una misma columna, denotan diferencias significativas

En la evaluación de la estructura de la planta (Tabla 7), se obtuvieron diferencias (P≤0.001) entre los tratamientos en el número de hojas y grosor de los tallos, los menores valores los promovió *B. niacini*, estos fueron similares a los del control (P≥0.05).

El control positivo (*A. brasilense*) compartió superíndices (P≥0.05) con los inóculos bacterianos en las variables número de hojas y grosor del tallo. En la acumulación de biomasa seca por hectárea (t BS ha^{-1}) de hojas, *B. cereus* se diferenció (P≤0.001) de todos los tratamientos, y en la acumulación de BS en planta íntegra, *B. cereus* compartió superíndices (P≥0.05) con *M. osloensis* y se diferenció del resto de los tratamientos, los cuales, fueron similares entre sí (P≥0.05).

Tabla 7. Morfología de hojas y tallos de plantas de M. oleifera de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

T BS ha^{-1}: Toneladas de biomasa seca por hectárea; ±EE: Error estándar; P: pvalor

Tratamientos	Número de hojas por planta	Longitud de la hoja (cm)	Ancho medio de la hoja (cm)	Grosor del tallo (cm)	Relación Hoja/Tallo	[1]Rendimiento de hojas (t BS ha^{-1})	Rendimiento total (t BS ha^{-1})
B. niacini	9.2±1.96[bc]	9.61±2.69	4.96±0.78	0.32±0.05[bc]	67.30±21.62	0.29±0.0[b] (1.42)	6.25±0.034[b]
M. osloensis	11.45±2.39[a]	8.76±1.73	5.16±0.84	0.35±0.06[ab]	78.41±22.47	0.30±0.0[b] (1.42)	9.7±2.68[ab]
B. cereus	11.85±2.30[a]	9.12±1.22	5.18±0.96	0.38±0.08[a]	59.72±15.43	0.80±0.04[a] (1.43)	12.92±3.43[a]
A. brasilense	10.8±1.91[ab]	9.26±1.28	5.17±0.82	0.35±0.06[ab]	57.89±8.48	0.30±0.0[b] 1.42	7.17±0.37[b]
Control	8.68±2.22[c]	9.36±1.29	5.15±0.98	0.27±0.1[c]	54.39±32.50	0.26±0.0[b] (1.42)	5.52±1.14[b]
P	*0.001*	*0.64*	*0.93*	*0.001*	*0.68*	*0.01*	*0.01*
±EE	*0.38*	*0.080*	*0.001*	*0.062*	*19.05*	*0.0013*	*1.82*

[a, b, c] Valores con superíndices de letras diferentes para cada columna denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey
[1]Valores entre paréntesis representan promedios transformados para √(x+1)

Para los indicadores morfo fisiológicos foliares (Tabla 8), se observó que, todos los inóculos estimularon el incremento del área foliar (AF), índice de área foliar (IAF), con la consecuente duración del área foliar (DAF). *B. cereus* fue la única cepa que se diferenció (P≤0.001) del control positivo (*A. brasilense*), compartiendo (P≥0.05) superíndices con el resto de los tratamientos, y estos, con el control. Para las tasas de crecimiento absoluto (TCA) y relativo (TCR), *A. brasilense* presentó el de mayor promedio (P≤0.01) respecto al control, pero sin diferencias con el resto de los inóculos bacterianos.

No se observaron diferencias significativas (P≥0.05) para las variables de AFE, TAN, LRA y proporción de hojas, pero si para la proporción de tallos, arrojando los mayores valores (P≤0.01) las plantas inoculadas con cepas de *A. brasilense* y *B. cereus;* diferenciándose éstas del control, mientras que, para la proporción de raíces (Tabla 9), fue el control el que se diferenció (P≤0.001) de las plantas inoculadas con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Tabla 8. Comportamiento de indicadores fisiológicos foliares y de crecimiento en plantas de *M. oleifera* de 45días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

AF: Área foliar; IAF: Índice de área foliar; DAF: Duración del área foliar; TCA: Tasa de crecimiento absoluto; TCR: Tasa de crecimiento relativo; AFE: Área foliar efectiva; TAN: Tasa de asimilación neta; LRA: La razón de área foliar; PPH: Proporción de hojas; PPT: Proporción de tallos; PPR: Proporción de raíces; ±EE: Error estándar; P: pvalor

Indicadores de crecimiento y desarrollo	*B. niacini*	*M. osloensis*	*B. cereus*	*A. brasilense*	Control	**P**	**±EE**
AF (cm^2)	$16.66±4.67^{ab}$	$17.77±4.62^{ab}$	$20.28±4.46^{a}$	$17.16±4.01^{ab}$	$13.9±4.56^{b}$	*0.01*	*1.02*
IAF	$17.56±4.75^{ab}$	$18.54±4.66^{ab}$	$21.13±4.50^{a}$	$17.95±4.06^{ab}$	$14.71±4.62^{b}$	*0.001*	*1.04*
DAF (cm^2 $día^{-1}$)	$1.16±4.67^{ab}$	$2.27±4.62^{ab}$	$4.78±4.46^{a}$	$1.66±4.01^{ab}$	$-1.57±4.56^{b}$	*0.001*	*1.02*
[1]TCA (cm $día^{-1}$)	$0.55±0.47^{ab}$ (1.25)	$0.93±0.86^{a}$ (1.35)	$0.59±0.57^{ab}$ (1.26)	$1.037±1.26^{a}$ (1.35)	$0.12±0.26^{b}$ (1.33)	*0.01*	*0.001*
[1]TCR (cm $día^{-1}$) $*10^{-3}$	$0.009±0.01^{ab}$ (1.102)	$0.014±0.01^{a}$ (1.103)	$0.009±0.01^{ab}$ (1.101)	$0.014±0.02^{a}$ (1.103)	$0.002±0.01^{b}$ (1.099)	*0.01*	*1.01*
AFE (cm^2 gr^{-1})	0.24±0.03	0.24±0.03	0.27±0.05	0.24±0.02	0.23±0.01	*0.57*	*0.03*
TAN (gr cm^2 $día^{-1}$)	10.16±1.77	11.14±1.70	10.18±0.32	11.57±0.85	13±0.75	*0.108*	*0.22*
LRA (cm^2 gr^{-1})	0.096±0.02	0.093±0.01	0.094±0.01	0.087±0.01	0.077±0.00	*0.24*	*0.001*
PPH ($gr_{(hojas)}$ $gr^{-1}_{(planta)}$)	0.41±0.03	0.39±0.07	0.35±0.04	0.37±0.01	0.33±0.01	*0.18*	*0.001*
PPT ($gr_{(tallos)}$ $gr^{-1}_{(planta)}$)	$0.36±0.08^{ab}$	$0.40±0.04^{ab}$	$0.44±0.02^{a}$	$0.42±0.05^{a}$	$0.26±0.07^{b}$	*0.01*	*0.001*
PPR ($gr_{(raíz)}$ $gr^{-1}_{(planta)}$)	$0.24±0.11^{b}$	$0.21±0.04^{b}$	$0.21±0.03^{b}$	$0.21±0.05^{b}$	$0.41±0.06^{a}$	*0.006*	*0.001*

[a, b, c] Valores de superíndices con letras diferentes denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey.
[1]Números entre paréntesis corresponden a valores transformados mediante Log (x+2).

Tabla 9. Morfología de la raíz e índices asociados en plantas de *M. oleifera* de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

BMA/BMR: Relación biomasa aérea con biomasa radicular ID: Índice de Dickson; IL: Índice de Lignificación; ±EE: Error estándar; P: pvalor

Indicadores morfológicos	Tratamientos						
	B. niacini	***M. osloensis***	***B. cereus***	***A. brasilense***	**Control**	**P**	**±EE**
Índice de Robustez	13.48±3.82[b]	14.87±5.60[ab]	13.10±2.82[b]	17.7±5.13[a]	12.99±4.16[b]	*0.01*	*0.79*
Diámetro del cuello de raíz(cm)	0.39±0.07[ab]	0.42±1.08[a]	0.44±0.07[a]	0.40±0.08[ab]	0.34±0.06[b]	*0.001*	*0.0002*
Grosor de la raíz (cm)	1.31±0.48[ab]	1.18±0.44[b]	1.25±0.23[b]	1.30±0.26[ab]	1.58±0.20[a]	*0.01*	*0.004*
Longitud de la raíz (cm)	4.53±1.11[ab]	3.54±1[c]	3.96±0.60[bc]	5.16±1.50[a]	5.05±0.65[a]	*0.001*	*0.37*
*Relación Tallo/Raíz (cm)	12.06±3.84[bc] (3.43)	21.34±2.16[a] (4.41)	14.85±0.61[ab] (3.82)	14.37±1.30[ab] (3.72)	8.9±1.48[c] (2.94)	*0.001*	*0.05*
BMA/BMR	2.28±2.86[ab]	2.53±0.55[b]	2.84±0.42[a]	2.51±1.13[b]	0.83±0.54[c]	0.03	0.008
Peso fresco de raíz (g)	47.70±3.08	42.21±2.58	41.62±1.32	44.04±2.32	51.20±2.0	*0.064*	*30.96*
Peso seco de raíz (gr)	6.09±19.9[ab]	4.98±14.81[b]	4.48±5.26[b]	4.99±8.11[b]	10.65±10.91[a]	*0.01*	*1.28*
ID	2.27±1.69	2.26±0.56	2.15±0.62	1.82±0.33	0.73±0.34	*0.204*	*0.80*
IL	0.10±0.04	0.11±0.01	0.10±0.0	0.10±0.01	0.85±0.02	*0.53*	*0.80*

[a, b, c] Superíndices con letras diferentes denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey.

*Números entre paréntesis corresponden a valores transformados mediante √(x).

Al analizar la morfología de la raíz y otros indicadores asociados, se observaron modificaciones por el efecto de los inóculos bacterianos y los valores fueron poco contrastantes entre variables (Tabla 9). Las plantas con mayor índice de robustez ($P \leq 0.01$) fueron aquellas que se inocularon con *A. brasilense*, y fueron similares ($P \geq 0.05$) a las tratadas con *M. osloensis*, pero diferentes ($P \leq 0.01$) al resto de los tratamientos, los cuales se asemejaron ($P \geq 0.05$) al control. En la variable diámetro del cuello de la raíz las plantas inoculadas con *M. osloensis* y *B. cereus* se diferenciaron de forma significativa ($P \leq 0.001$) del control, las plantas inoculadas con *B. niacini* y *A. brasilense* fueron similares ($P \geq 0.05$) en la expresión de esta variable, y no se diferenciaron del control (Tabla 9).

Para LR y GR el control presentó los mayores promedios, y se diferenciaron ($P \leq 0.01$) de las plantas inoculadas con *M. osloensis* y *B. cereus*. La relación BMA/BMR o como también se denomina, índice de proporcionalidad biométrica, los inóculos bacterianos favorecieron ($P \leq 0.05$) el acúmulo de biomasa aérea respecto a la radicular en atención al control. Las plantas inoculadas con *B. cereus* superaron ($P \leq 0.05$) en la relación BMA/BMR aquellas inoculadas con *M. osloensis* y *A. brasilense*. Las plantas control y las inoculadas con *B. niacini* mostraron los mayores valores ($P \leq 0.01$) de PSR respecto al resto de los tratamientos, para el peso fresco no se registraron diferencias ($P \geq 0.05$).

El índice de Dickson no mostró diferencias ($P \geq 0.05$) entre tratamientos, lo que sugiere uniformidad en el contenido de BS entre la parte aérea (hojas y tallos) y subterránea (raíces), este índice mostró una tendencia ($P \leq 0.10$) en el incremento de la acumulación de BS. De forma similar el índice de lignificación tampoco mostró diferencias promovidas por los tratamientos, y también manifestó una tendencia al incremento de compuestos estructurales y pérdida de agua.

7.7 Contenido de macro, micro minerales, y elementos benéficos en hojas y raíces de plantas inoculadas con PGPR.

La concentración de minerales a nivel de la raíz fuer variable (Tabla 10). En el orden de los microminerales, las raíces de plantas inoculadas con *B niacini*, aportaron las mayores (P≤0.001) concentraciones de microminerales, respecto al resto de los inóculos y CT, excepto para el Zinc, concentrándose (P≤0.001) en raíces de plantas inoculadas con *A. brasilense*, respecto al CT, el resto de los inóculos no superó (P≤0.001) la cantidad de Zinc aportada por el CT.

Tabla 10. Composición mineral de raíces de plantas de M. oleifera de 45 días de edad, inoculadas durante su crecimiento con PGPR.

EDX: Energía dispersiva por rayos X; ± Error estándar de tres repeticiones por tratamientos según el cálculo de la EDX; P: pvalor

Minerales	Tratamientos					P	±EE
	B. niacini	***M. osloensis***	***B. cereus***	***A. brasilense***	**Control**		
			Microminerales (% atómico)				
***Mn^{2+}**	0.12±0.02^{a}	0±0.00^{b}	0±0.0^{b}	0±0.0^{b}	0±0.0^{b}	0.001	0.0005
Fe^{2+}	0.41±0.01^{a}	0.23±0.11^{bc}	0.15±0.0^{c}	0.30±0.0^{b}	0.12±0.02^{c}		0.002
***Cu^{2+}**	0.70±0.0^{a}	0.005±0.0^{d}	0.06±0.01^{c}	0.005±0.0^{d}	0.16±0.01^{b}		0.0002
***$Zinc^{2+}$**	0±0.00^{c}	0±0.0^{c}	0±0.0^{c}	0.31±0.01^{a}	0.04±0.0^{b}		0.0001
			Macrominerales (% atómico)				
***Ca^{2+}**	35.74±0.01^{a}	3.98±0.0^{b}	0.47±0.0^{d}	0.90±0.05^{c}	0.86±0.02^{c}	0.001	0.11
P^{3+}	0.60±0.3^{d}	16.16±0.01^{b}	14.36±0.01^{c}	16.41±0.01^{a}	16.32±0.02^{a}		0.57
Mg^{2+}	1.75±0.05^{e}	3.62±0.02^{d}	5.71±0.01^{c}	7.63±0.0^{a}	6.05±0.05^{b}		1.05
K^{+}	0.79±0.0^{c}	6.85±0.0^{b}	6.15±0.5^{b}	6.85±0.05^{b}	10.22±0.02^{a}		2.13
S^{2+}	4.10±0.1^{d}	6.69±0.01^{c}	9.02±0.02^{b}	9.73±0.03^{a}	4.19±0.01^{d}		1.38
			Elementos benéficos (% atómico)				
Na^{+}	1.48±0.05^{d}	3.17±0.01^{c}	8.85±0.05^{a}	4.61±0.01^{b}	0.30±0.15^{d}	0.001	2.09
Si^{4+}	23.14±0.04^{a}	3.90±0.00^{e}	8.93±0.0^{b}	4.31±0.01^{d}	6.13±0.03^{c}		1.27
Al^{3+}	34.20±0.0^{e}	46.11±0.01^{a}	36.24±0.04^{d}	38.31±0.01^{c}	42.54±0.04^{b}		4.6
			Metales pesados (% atómico)				
***Cd^{5+}**	0±0.00^{c}	0.25±0.05^{b}	0.31±0.0^{b}	0.88±0.0^{a}	0.65±0.0^{b}	0.001	0.0002
***Pb^{4+}**	0±0.00^{c}	0.12±0.0^{b}	0.21±0.01^{b}	1.87±0.01^{a}	0±0.0^{c}		0.0002
***Mo^{6+}**	0±0.0^{c}	0±0.0^{c}	0±0.0^{c}	0±0.0^{c}	1.15±0.0^{a}		0.003
***Co^{3+}**	0±0.0^{c}	0±0.0^{c}	0.03±0.0^{b}	0±0.0^{c}	0.06±0.0^{a}		0.0003
***As^{5+}**	1.50^{b}	1.63±0.03^{a}	1.29±0.00^{c}	1.30±0.0^{c}	1.63±0.0^{a}		0.005
***Br^{7+}**	0±0.0^{d}	7.35^{b}	8.6±0.0^{c}	7.40±0.1^{b}	9.79±0.2^{a}		0.003

$^{a, b, c, d}$ Letras diferentes en una misma fila denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey;

*Corresponden a promedios transformados mediante $Arcos = (\sqrt{(\frac{x}{100})})$

Mientras que, para los macrominerales, la mayor cantidad de calcio fue encontrada en las raíces de plantas inoculadas con *B. niacini*, diferenciándose (P≤0.001) con el resto de los inóculos y *A. brasilense* y CT compartieron (P≥0.05) superíndices en la concentración de este mineral. En las raíces inoculadas con *A. brasilense* se encontraron las mayores concentraciones de Fósforo, Magnesio y Azufre, siendo comunes con CT las lecturas de Fósforo y Azufre, el resto de las raíces inoculadas con *B. niacini*, *B. cereus* y *M. osloensis*, presentaron menores (P≤0.001) contenidos para los tres macrominerales en comentario.

En el orden de los elementos benéficos, raíces inoculadas con *B. cereus* presentaron la mayor (P≤0.001) concentración de Sodio, respecto al resto de los inóculos y CT, y para la Sílice, las plantas inoculadas con *B. cereus* arrojaron los mayores contenidos, diferenciándose (P≤0.001) con el resto de los inóculos y CT, asimismo, el control superó (P≤0.001) en el contenido de Sílice a plantas inoculadas con *M. osloensis* y *A. brasilense*. En el contenido de Aluminio, fue *M. osloensis* quién mejor desempeño tuvo en el contenido de este a nivel de la raíz, los valores se diferenciaron (P≤0.001) del resto de los inóculos y CT. El CT superó (P≤0.001) al resto de los inóculos, y éstos a su vez, entre(P≤0.001) sí. Respecto al contenido de metales pesados, *M. osloensis* retuvo mayor cantidad de Arsénico al igual que el CT, diferenciándose (P≤0.001) del resto de los inóculos, mientras que *A. brasilense* concentró (P≤0.001) Cadmio y Plomo respecto al CT e inóculos bacterianos.

Para el contenido mineral de hojas (Figura 17), solo se observaron diferencias en el orden de los macrominerales, y dentro de éstos, en Magnesio y Potasio. El mayor contenido de Magnesio se obtuvo en las raíces de las plantas inoculadas con PGPR, sin observarse diferencias (P≥0.05) entre ellos, todos se diferenciaron (P≤0.01) del CT. El contenido de Potasio por su parte se concentró en el CT, diferenciándose (P≤0.05) solamente de las plantas inoculadas con *B. niacini*, el CT compartió superíndices (P≥0.05) con el resto de los inóculos.

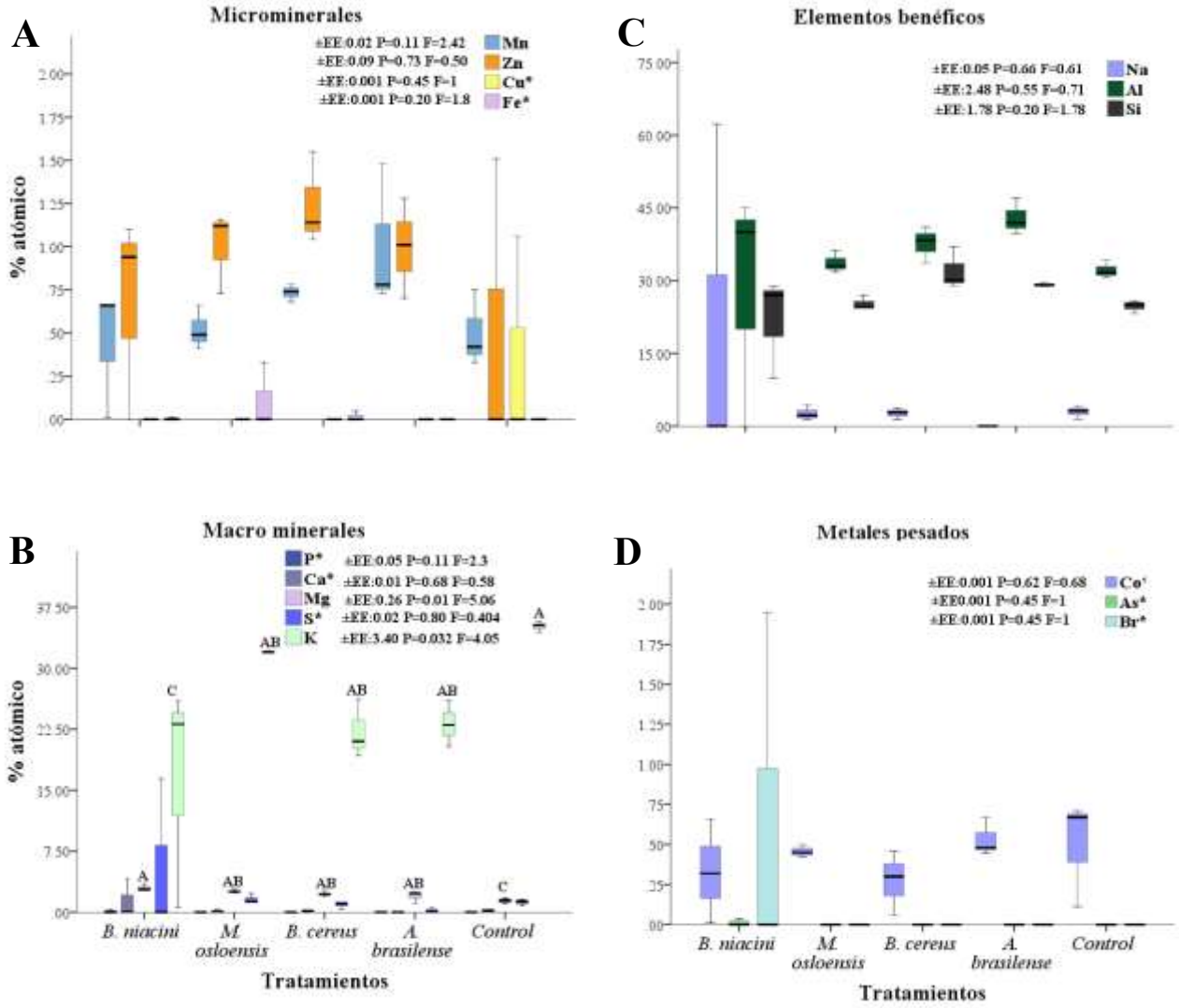


Figura 17. Contenido mineral (% atómico) en hojas de plántulas de M. oleifera de 45 días de edad, mediado por PGPR.

[a, b, c] Letras diferentes denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey.

*Significación alcanzada mediante la transformación de los datos a partir de la proporción $Arcos = (\sqrt{(\frac{x}{100})})$.

Según el ACP desarrollado sobre la base de la eficiencia de las PGPR en la planta para concentrar elementos minerales en raíces y hojas, los inóculos bacterianos mostraron diferentes preferencias en función del tipo de mineral y órgano vegetal (Figura 18). En raíces, los macro,

micro y elementos benéficos se mostraron en convergencia positiva dentro del primer componente, aportando 54.35% a la explicación de la varianza, mostrando afinidad las PGPR por K^+, Br^+ y P^{3+} a partir de la amplitud del ángulo. Y en una convergencia negativa metales pesados y micro minerales, aportando dentro de la segunda componente 24.81% a la explicación de la varianza (Figura 18A).

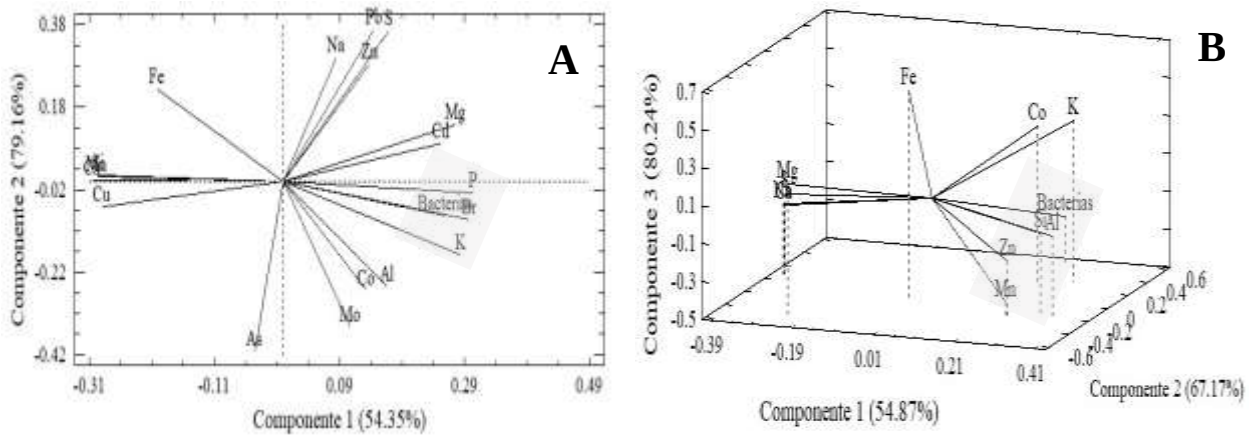


Figura 18. Análisis de componentes principales (ACP) en la intervención de PGPR en el contenido mineral de raíces (A) y hojas (B).

Mientras que, para describir el aporte de las PGPR al contenido mineral de hojas se agruparon tres componentes, en el componente uno en convergencia positiva se ubicaron las bacterias con microminerales, aportando en conjunto el 54.87% de la varianza acumulada del sistema, mientras que la segunda componente agruparon microminerales y metales pesados, quienes incrementaron la explicación de la varianza total en 12.3% para un total de 67.17%, y en la tercera componente, metales pesados y algunos macrominerales en una convergencia negativa para un aporte de 13.07% y un total de 80.61% de la varianza explicada (Figura 18B). Esta distribución de los pesos de las componentes tan variada puede estar relacionada con los procesos fisiológicos que se desarrollan a nivel foliar.

7.7.1 Pigmentos fotosintéticos y foto protectores

Ninguno de los tratamientos promovió diferenciación en el contenido de carotenoides (Violaxantina, Luteína y Zeaxantina), pigmentos (clorofila *a* y *b*) y sus relaciones (Tabla 11). Solo

la proporción Violaxantina/ Luteína+Zeaxantina manifestó variaciones (P≤0.05), arrojando el valor significativamente inferior las plantas inoculadas con *A. brasilense*, el resto de los tratamientos no se diferenciaron entre sí (P≥0.05).

Tabla 11. Concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de plantas de M. oleifera de 45 días de edad, inoculadas con PGPR durante su crecimiento.

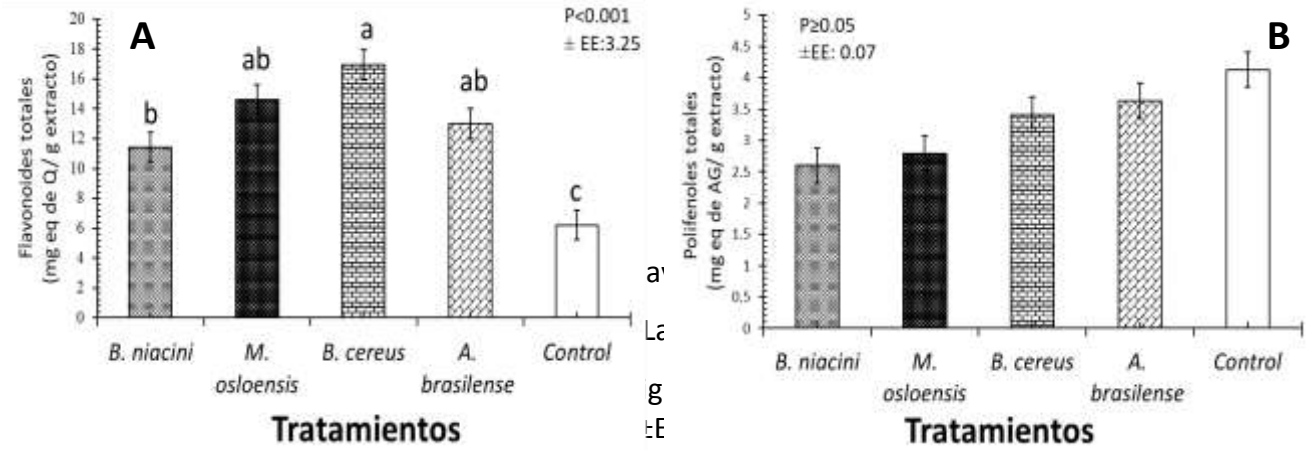
CV, %: Coeficiente de variación, ±EE: Error estándar; P: pvalor.

Indicadores (mg g peso fresco)	Tratamientos					Estadígrafos		
	B. niacini	***M. osloensis***	***B. cereus***	***A. brasilense***	**Control**	**CV, %**	**±EE**	**P**
Violaxantina	0.015±0.07	0.013±0.02	0.010±0.001	0.006±0.01	0.015±0.05	46.48	0.001	0.22
Luteína	0.021±0.06	0.018±0.03	0.018±0.003	0.015±0.02	0.021±0.07	29.60	0.001	0.75
Zeaxantina	0.328±0.11	0.281±0.05	0.279±0.03	0.262±0.01	0.327±0.10	27.95	0.02	0.85
Violaxantina / Luteína+ Zeaxantina	0.04±0.07[a]	0.042±0.05[a]	0.35±0.001[a]	0.021±0.02[b]	0.044±0.03[a]	26.4	0.002	0.02
Clorofila *a*	3.08±1.148	2.10±0.725	2.51±0.390	2.14±0.181	2.63±0.726	32.35	0.21	0.72
Clorofila *b*	0.927±0.35	0.669±0.22	0.738±0.12	0.659±0.05	0.784±0.19	33.19	0.06	0.65
β-caroteno	0.23±0.087	0.16±0.057	0.18±0.024	0.15±0.018	0.20±0.058	34.26	0.01	0.66
Clorofila *a* + Clorofila *b*	4.01±1.49	2.77±0.952	3.25±0.510	2.80±0.227	3.41±0.924	32.95	0.27	0.67
Clorofila *a* / Clorofila b	3.41±0.054	3.15±0.198	3.41±0.044	3.25±0.115	3.33±0.089	4.58	0.039	0.25

[a, b] Superíndices diferentes denotan diferencias significativas para P≤0.05 según Tukey

7.7.2 Metabolitos secundarios en hojas de plantas de *M. oleifera* inoculadas con PGPR

Los inóculos bacterianos no promovieron diferencias significativas (P≥0.05) en las concentraciones de polifenoles totales contenidos en hojas de plantas de *M. oleifera* (Fig. 19 B).



Se observaron diferencias en la concentración de flavonoides totales de los tratamientos respecto al control (P≤0.001) (Figura 19A), entre los inóculos también existieron diferencias, las plantas inoculadas con *B. cereus* presentaron de forma significativa (P≤0.001) mayor concentración de flavonoides totales en comparación con las plantas inoculadas con *B. niacini*, el resto de los inóculos compartieron superíndices con el *B. cereus* (P≥0.05).

8. DISCUSIÓN

En el cultivo de *M. oleifera* en medio MS, Aguirre (2017) obtuvo valores de 26.7% en la germinación acumulada, afectándose la misma por contaminación (28.9%) con hongos, aún, cuando sumergieron las semillas en solución de NaOCl al 5% y dos gotas de Tween durante seis minutos, donde el tiempo de exposición a los agentes desinfectantes tuvo un efecto negativo para la eliminación de los patógenos. Avila-Treviño et al., (2017) lograron 95.5% de germinación acumulada de *M. oleifera* en medio MS, los resultados acerca del efecto del medio no fueron concluyentes, obtuvieron una baja contaminación con el empleo de etanol 70%, Tween 20 (Thermo Scientific, USA) y una solución de lejía comercial (10%) en la que sumergieron las semillas durante 15 minutos, tiempo similar al del presente estudio, lo que sugiere que el tiempo de exposición a agentes desinfectantes tiene un efecto sobre la disminución y/o erradicación de agentes patógenos para el cultivo *in vitro* en semillas de *M. oleifera*.

A pesar de que la germinación se expresa habitualmente como valor absoluto de la calidad de la semilla, éste no es suficiente para detectar diferencias en el potencial fisiológico de la misma, por lo que la inclusión de índices como indicadores de vigor constituyen un eslabón esencial (Navarro et al., 2015), sin embargo, son escasos en la bibliografía (Luna, 2019). El principio del IG es relacionar la germinación dependiendo de la cantidad semillas, limitando la capacidad de germinación la confiabilidad del valor final, por lo cual se limita su uso (Ranal y De Santana, 2006), no obstante, en el presente estudio los valores más altos de IG se ubicaron en el medio húmedo, lo que sugiere uniformidad en la calidad germinativa de las semillas colectadas.

Los valores del IVG del presente estudio, son similares a los obtenidos en biorreactores de inmersión (3.92) (Luna, 2019), lo que denota la alta capacidad higroscópica de la semilla de *Moringa*, lo cual estuvo manifiesto en el presente estudio. Los DPG se ubicaron en el rango señalado por Marcos Filho (2010) y Muhl et al., (2011) en estudios previos de germinación en *M. oleifera*, mientras que para la TMG se señalan hasta 13 días (Luna, 2019); en el centro Sur de México con ecotipos climatizados se obtuvieron valores de 5.9 (Valdés-Rodríguez et al., 2018), valores inferiores a los del presente estudio, lo que redunda en la calidad fisiológica de las semillas colectadas.

El medio de cultivo tiene un efecto directo sobre la germinación por el alto contenido de humedad que los caracteriza, sin embargo, la capacidad de germinación va a depender de las características de la semilla. La semilla de *Moringa* se caracteriza por ser higroscópica, por lo que responde de forma positiva a la humedad, siempre y cuando no llegue al exceso y provoque la pérdida de la integridad de las membranas (Navarro et al., 2015).

Con la incorporación de la humedad del medio al interior de la semilla, se activan enzimas específicas (amilasa y fosforilasa), desencadenando la reducción de los hidratos de carbono para la emergencia de la primera radícula, siendo esto consecuente para que los valores más altos en la germinación y sus índices se hayan concentrado en el medio húmedo respecto al resto de los medios en evaluación. Otro aspecto que define la germinación son las condiciones de crecimiento de la planta donadora, determinando la calidad de la semilla por las presiones ambientales de medio donde crece (Copeland y McDonald, 1995; Valdés-Rodríguez et al., 2018). Matos-Ruiz et al., (2016) en la germinación de semillas de *M. oleifera* durante 21 días en medio semisólido MS, sacarosa, tiamina, mioinositol y sin reguladores del crecimiento, obtuvieron germinaciones acumuladas entre 31.35 y 54.24%, sin embargo, no evaluaron las características morfológicas de las semillas y su efecto en la germinación.

En consideración al planteamiento anterior, al conformar el BIPLOT, se pudo observar que, la variable más próxima a su origen y que se ubicó en el primer componente, fue el peso de la semilla; varios trabajos han relacionado la germinación, crecimiento y desarrollo de la plántula con el peso de la semilla de *M. oleifera* mediante ecuaciones de regresión (Valdés-Rodríguez et al., 2014; Valdés-Rodríguez et al., 2018), también en otros géneros como el *Ricinus communis* L. (Ahmed et al., 2011), sin embargo, los coeficientes de determinación fueron bajos y numéricamente no justificaron el significado biológico que tiene el peso de la semilla para la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas. Al respecto Valdés Rodríguez et al., (2018) mencionaron que las reservas energéticas que posean las semillas se vinculan con el peso de ésta, posibilitándole una rápida germinación, adecuado crecimiento y desarrollo de la plántula.

De igual forma se podría esperar que, el número de semillas, ancho del fruto en conjunto con el peso de la semilla se relacionen con el ancho del tallo, al respecto Fotouo et al., (2015), señalaron que semillas almacenadas dentro de los frutos tienen un tiempo de conservación mayor, y preserva la integridad de membranas imposibilitando el escape de soluto y de esta forma garantizar plantas vigorosas con finos y alongados tallos. En este sentido, Valdés-Rodríguez et al., (2014) señalaron que en plántulas de *Moringa* es característico un crecimiento inicial acelerado con protrusión del tallo, y que la longitud de éste podría relacionarse con la longitud de la semilla, lo cual puede tener relación con la longitud del embrión, sin embargo, esta hipótesis carece de sustento biológico.

Referente al fenómeno de agrupación de la componente dos, las diferencias estriban en los diferentes procesos metabólicos intermedios que interfieren entre una etapa y otra, o sea, de la germinación a la expansión radicular, transformaciones morfológicas de la plántula, el tallo y el crecimiento de esta, los procesos mencionados están biológicamente escalonados, y, por tanto, estadísticamente no se pueden relacionar todos.

En la evaluación de las plantas emergidas, se observó una acumulación importante en el número de hojas, ésta es una variable muy apreciada ya que las hojas contienen los principales constituyentes antioxidantes, proteína bruta, vitaminas y compuestos secundarios con valor antioxidante, por lo que, los medios de cultivos basados en la humedad principalmente contribuyan a la aparición de hojas es un resultado muy favorable, sin embargo, se debe mencionar que en medio Agua-Agar 0.8% y medio húmedo después de las hojas expandirse comenzaron a necrosarse, aunque otro brote con nuevas hojas la sustituía. Este fenómeno se relaciona con las carencias de minerales en el medio (Poothong et al., 2018), por lo que no es recomendable su uso para el crecimiento y desarrollo *in vitro* de plantas de *Moringa*.

En la aparición de brotes y hojas, Poothong et al., (2018) al evaluar diferentes formulaciones del medio MS en la multiplicación de brotes apicales de *Stevia rebaudiana* Bertoni, observaron una estrecha relación entre el contenido de microminerales y el incremento de las fracciones mencionadas, lo cual se observó en el presente estudio en los medios MS y MSG para ambas

variables, aunque para el largo de la raíz el medio MS no tuvo representatividad respecto al MSG, estimulando las diferencias la cantidad y variedad de nutrientes.

Desde la composición química, los medios MS y MSG se diferencian en la concentración de algunos microminerales (H_3BO_3; $ZnSO_4.7H_2O$), macrominerales (KNO_3; $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$) además del contenido de vitaminas (clorhidrato de tiamina, ácido nicotínico, clorhidratos de piradoxina) que posee el medio MSG (Sharry et al., 2015; Nadirah et al., 2019), sin embargo, en el criterio de Phillips y Garda (2019), las principales diferencias se encuentran en la separación del nitrato de amonio del medio MSG en otras sales, lo cual posibilita el ajuste para diferentes genotipos sin generar toxicidad.

La variable composición y diferenciación de minerales en los medios de cultivos conllevó a diferencias importantes para el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas, al respecto Kothari (2004) señaló que el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos vegetales en condiciones *in vitro* están influenciados en gran medida con la composición del medio de crecimiento, asimismo agregó que, la tasa de crecimiento de los tejidos vegetales *in vitro* es una función de la tasa neta de asimilación, resultante de la absorción de nutrientes del medio.

El desarrollo foliar de vitro plantas de *M. oleifera* obtenidas mediante cultivos de tejidos no ha sido referido en la bibliografía especializada, seguramente por los intereses de investigación que, se han centrado y a la vez limitado a la multiplicación *in vitro* para la conservación de germoplasma (Stephenson y Fahey, 2004; Crosby y Craker, 2007) y propagación *in vitro* (Saini et al., 2012; Agramonte et al., 2014; Matos-Ruiz et al., 2016), principalmente.

Experiencias en el estudio del desarrollo foliar de algunas especies que fueron sometidas al efecto de diferentes medios de cultivos, señalan en *Phalaenopsis* “Bahía Blanca” una diferenciada respuesta por el efecto de los medios de cultivos (MS, MS de fuerza media (1/2MS), Knudson C (KC) y, Vacin y Went (VW) suplementados con agua de coco y peptona) (Mehrnaz-Abbaszadeh et al., 2018) mostrando un comportamiento favorable en medio MS, según los autores esto se relacionó con el contenido de NH_4NO_3 que favorece a este medio,

haciendo mención además al contenido de Ca^{2+} que es utilizado para la formación de pared celular, funcionamiento de la membrana celular y señalización celular; lo cual puede contribuir a la formación de estructuras celulares y con ello órganos, hojas específicamente.

En *Acianthera prolifera* (Orchidaceae) las semillas fueron germinadas en diferentes medios (WPM (Wole Plant Medium), WPM. I; complementadas con carbón activado; WPM con diferentes concentraciones de carbón activado (de izquierda a derecha: 0, 1, 2 y 4 g L^{-1}; y WPM; KC y MS/2), respectivamente, suplementados con sacarosa (0, 15, 30 y 60 g L^{-1}), señalando diferencias importantes en el proceso de crecimiento y desarrollo radicular principalmente, donde se destacaron los valores para el medio WPM por el contenido de nitrógeno, elemento muy importante para el crecimiento y desarrollo de *A. prolifera* (Koene et al., 2019).

Referente al presente estudio, se podría considerar que la disponibilidad de NH_4NO_3 pudo favorecer la aparición de hojas en las plántulas que crecieron sobre medio MS respecto a MSG, ya que el contenido de fuentes de nitrógeno define hasta cierto nivel el crecimiento de la *Moringa* en edades tempranas, sin embargo, no existe un consenso del alcance en el favorecimiento de la planta y el costo ambiental ante el suministro de nitrógeno (He et al., 2020).

En la biología de *Moringa*, los requerimientos de nitrógeno se vuelven indispensable en el proceso de producción de frutos (Ledea Rodríguez et al., 2018c) y producción de biomasa entre los 45 y 60 días de brotación de la planta (Peng et al., 2021), mientras que el resto de los macro y microminerales son destinados para la formación de tejidos en edades más tempranas del crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006), donde las reservas de carbohidratos y lípidos contenidos en el cotiledón de la semilla de *Moringa*, ofrecen a la joven planta la ventaja de un acelerado desarrollo radicular para la exploración del medio e incorporación de nutrimientos (Rubio-Sanz et al., 2020) como se evidenció en el medio MSG, lo cual pudo estar relacionado al ser un medio considerable más enriquecido que el MS, y por lo tanto, más acorde para el desarrollo de arbustivas (Murashige y Skoog, 1962), quizás esta “riqueza” en macrominerales y vitaminas

pudo estar relacionado con un mayor crecimiento radicular respecto al resto de los medios en evaluación.

Además del desarrollo morfológico y foliar de la planta, este aspecto pudiera estar relacionado con la reconversión de tejidos debido al prolongado período de retardo alrededor del punto de inflexión según la curva del modelo de Bertalanffy, este medio por su composición química, permite a la célula vegetal incrementar la tasa metabólica, para una acelerada tasa de formación de tejidos, lo cual podría generar un rápido agotamiento del medio; éste fenómeno fue observado en cultivos celulares de *Citrus × latifolia* (Bulbarela-Marini et al., 2019).

En este sentido se podría agregar la peculiaridad del medio MS para el crecimiento y desarrollo de un gran grupo de géneros de planta, donde se destacan las leguminosas y arbóreas principalmente. Para las arbóreas el medio de crecimiento para leñosas (WPM, siglas en inglés) han arrojado mejores resultados en el crecimiento de las plantas respecto al MS, debido al alto contenido de amonio (Gamborg et al., 1976). Sin embargo, según la curva y el ajuste del modelo Logístico en el análisis del crecimiento de las plántulas sobre medio MS, sugiere que el medio provee los requerimientos necesarios para un rápido crecimiento, mientras que el MSG predispone un incremento del recambio de tejidos.

Referente al uso de las vitaminas, experiencias en su utilización formulada sobre diferentes concentraciones en la etapa de callo embriogénico de palma datilera *in vitro* (cultivares Sakkoty y Bartamuda), Ghorbanpour y Varma (2017) indicaron un efecto directo en el incremento de peso fresco relacionado, según los autores, con el contenido de aminoácidos que provee la síntesis de proteínas y con ello, mayor eficiencia en los procesos metabólicos en la formación de tejidos, este es otro aspecto que respalda al medio MSG respecto al MS y otros medios de crecimiento para cultivos de tejidos *in vitro*, sin embargo, ha sido poco documentado (Phillips y Garda, 2019).

Para las plantas que crecieron en medio Agua-Agar 0.8% se debe mencionar que, la composición del agar se circunscribe a su origen como polisacárido de galactosa y galactomanano que se

obtiene de las algas rojas (*Echema, Gelidium, Gracilaria*), contiene 70% de agarosa y un 30% de agaropectina, el resto de los constituyentes no están definidos (Sharry et al., 2015), estas condicionantes pudieron propiciar que las plantas manifestaran un crecimiento acelerado (0,69 mm día^{-1}) en un principio tal como lo describe el modelo Logístico, pero aún deficiente hasta los siete días según el punto de inflexión (37.85 mm). Posteriormente, se observó un crecimiento lineal a partir de los ocho días generado probablemente por la escasez de nutrientes del medio o quizás factores relacionados con la calidad de este.

Lo anterior puede deberse según lo señalado por Sharry et al. (2015) a la calidad del agar, lo cual va a depender de varios factores, entre ellos, la época del año en que el alga fue colectada, el nivel de contaminantes, el proceso de manufactura y la manera en que el producto fue purificado, considerando que, cualquier nivel de impurezas en el agar pudo tener efecto en la respuesta del cultivo *in vitro*. No obstante, no fue evaluado en el presente trabajo.

Las plantas que crecieron en medio de cultivo húmedo debieron su crecimiento a las reservas energéticas del cotiledón, manifestando un crecimiento lento y constante, con una tasa de 0.004 y 0.05 mm día^{-1} según los modelos de Gompertz y Bertalanffy, respectivamente, que fueron los que mejor describieron el proceso de crecimiento. Por otra parte, el modelo de Gompertz describió un crecimiento lento al inicio, pero que se acelera después del punto de inflexión para ralentizarse nuevamente, tal cual se observa en la Figura 10 B4, mientras que el modelo de Bertalanffy (Figura 10 C4), asocia este tipo del crecimiento con roles catabolismo, pero sin detenerse el crecimiento (Bertalanffy, 1957).

Referente al uso de promotores del crecimiento vegetal para la multiplicación, Jun-jie et al., (2017) evaluaron diferentes promotores del crecimiento en explantes de hojas de *Moringa* vc PKM-1, observando con la aplicación de 6-benzyladenina (6-BA) porcentajes de explantes entre 20-73% en función del decremento de la dosis que se empleó, sin embargo, el mayor porcentaje lo observaron cuando vincularon tres reguladores del crecimiento (6-benzyladenina; cinetina (KT); ácido naftalenacético (AN)), las respuestas en función de reguladores de forma individual o combinados aún no se esclarece, en el criterio de Montalbán et al., (2013) se debe a las

diferentes actividades celulares que, durante la regeneración de brotes se controlan por varios factores internos, incluidas las citoquininas, que causan diferencias químicas y estructurales internas, lo que conduce a diferentes respuestas cuando se presentan en el medio.

Las diferencias encontradas en el presente estudio podrían relacionarse con las concentraciones de compuestos promotores del crecimiento en la vitroplanta, que, a su vez, es una disposición de la planta madre, que se condiciona en función de las presiones ambientales en las que se ha desarrollado la misma (Valdés et al., 2018), otros autores, como Phillips (1988) señalan como causa de las respuestas diferenciadas en la producción de explantes en la misma especie o genotipo, a una especificidad tisular entre receptores y efectores hormonales, por lo que es evidente que no se llega aún a un consenso de la diferenciación en la producción de rebrotes a partir de promotores del crecimiento vegetal. En contexto, algunas de las variaciones en mención fueron observadas en *Moringa* (Jun-jie et al., 2017); *Crisantemo* (Lim et al., 2012; Naing et al., 2014); y *Jatropha curcas* (Zhang et al., 2013).

En otro orden, en la morfología de los estomas de las plantas que crecieron en condiciones de invernadero (Tabla 5), se obtuvo gran variabilidad por el efecto de los inóculos bacterianos, AbdulRahaman et al., (2018) emplearon mutágenos químicos en plántulas de *M. oleifera*, y éstos promovieron transformaciones morfológicas a nivel de los estomas, García (2018) en condiciones de vivero registraron valores de longitud de estomas superiores a las del presente estudio, las dimensiones oscilaron entre 28.40-34.60 µm, de igual forma, los resultados obtenidos por Abubakar et al., (2013) para largo y ancho (16.6-35.3µm y 14.5-25.1µm, respectivamente), superaron los promedios de la presente investigación, lo cual se vincula con las condiciones de crecimiento de las plantas de los investigadores en mención (campo abierto en diferentes puntos de la sabana de Nigeria).

Así mismo, la densidad estomática referida por AbdulRahaman et al., (2018) fue inferior a las obtenidas en el presente estudio, quienes señalaron para su control 26.60 estomas mm^{-2}, mientras que el resto de sus tratamientos variaron de 28.40 a 34.60 estomas mm^{-2}, aspecto considerado normal al resultar los estomas de gran tamaño, del Rosario Cappellari et al., (2015)

mediante la combinación de dos inóculos bacterianos (*P. fluorescens* + *P. putida*) obtuvieron promedios de 140 estomas mm^{-2}, y su control fue de 93 estomas mm^{-2}.

La variabilidad en morfología y densidad estomática se relacionan cuando las plantas son inoculadas con PGPR, a los efectos hormonales que éstas promueven y que tributan a diversificar la morfología de la planta y sus órganos, un ejemplo de ello es el incremento de diámetro y grosor de los conductos xilema y floema (El-Afry et al., 2012; Gonzalez et al., 2021) lo que genera alteraciones en la anatomía de la hoja (parénquima esponjoso) lográndose una mejor economía del recurso hídrico (del Rosario Cappellari et al., 2015), e incremento de la eficiencia fotosintética, equilibrando la planta de esta manera, el gasto de agua por la transpiración y la actividad fotosintética (Taiz y Zeiger, 2006).

Al inocular una planta con PGPR la tendencia es producir estomas pequeños en grandes cantidades para lograr un eficiente control estomático (Paradiso et al., 2017), intercambio gaseoso y actividad fotosintética (Balliu et al., 2015), a partir de mecanismos regidos por hormonas, genes y enzimas (Paradiso et al., 2017), por el contrario si los estomas son grandes la apertura y cierre de los mismos es lenta y con ello la pérdida de agua, además de que los cierres son incompletos por lo que no existe control de la evapotranspiración y se afecta el equilibrio hídrico, aspectos que podrían ayudar a comprender el carácter hipostomático (estomas en la epidermis adaxial) de las hojas de las plantas en estudio (Fig. 13 BN; Fig. 14 MO; Fig. 15 BC; Fig. 16 AB; Fig. 17 CA), ya que previamente se había descrito de carácter infoestomático (estomas en ambas epidermis) en hojas de *Moringa* (Ruiz et al., 2019).

Las posibles modificaciones anatómicas del parénquima esponjoso combinadas con las condiciones de experimentación pudieron estimular el desarrollo de paredes anticlinales de forma curva, morfología que se relaciona cuando la planta crece con abundante disponibilidad de agua (Arambarri et al., 2011), proporcionando un alto grado de suculencia a las hojas. En este sentido Muhl et al., (2011) observaron importantes modificaciones de la epidermis de hojas de *Moringa* cuando evaluaron diferentes rangos de temperatura, entre ellas, la no existencia de paredes curvas, sino células anticlinales de forma romboide con paredes rectas, lo

que sugiere que, la disponibilidad de agua determina la morfología de las paredes anticlinales, probablemente por las transformaciones a nivel del parénquima esponjoso y cavidad subestomática mencionadas con anterioridad.

Estomas anomocíticos a nivel de las células epidérmicas fueron observados por Abubakar et al., (2011) y Salama (2014) en hojas de *Moringa*, mientras que Ruiz et al., (2019) señalaban la presencia de estomas anomocíticos y actinocíticos en una misma hoja de plantas de *Moringa*, para el presente estudio los estomas estuvieron por debajo del nivel de las células epidérmicas, en el criterio de Bhakta et al., (2017), además de los hábitos y condiciones de crecimiento de las plantas, este fenómeno morfológico de los estomas, habitualmente se relaciona con la especie de plantas con la que se esté experimentando.

La no presencia de tricomas en las plantas inoculadas se debe según del Rosario Cappellari et al., (2019) a que, la inoculación y colonización de raíces por PGPR no están relacionadas con el incremento de la concentración de AJ necesario para desencadenar transformaciones de la epidermis de la hoja, a menos que la infección sea por bacterias patógenas, en este sentido, Pieterse et al., (2000) señalaron la necesidad de una prolongada exposición a los patógenos para que el tipo de AJ y AS principalmente, pueda llegar a activar genes sensibles a estos compuestos y se desarrolle la producción de aceite esencial, lo cual desencadena modificaciones morfológicas a nivel de hoja para el almacenamiento del mismo, pero las bacterias benéficas generalmente, no desencadenan este tipo de modificaciones, si no, que influyen en cambios de la composición química del aceite esencial (Rezaei-Chiyaneh et al., 2020), pero este aspecto no fue objeto de estudio en el presente trabajo.

En otro sentido, se declara que en el presente estudio no se empleó ningún tipo de fertilizante ni fuente nitrogenada, sin embargo, las plantas inoculadas con *A. brasilense* fueron las que más crecieron respecto al resto de los inóculos y el control. Camelo et al., (2011) señalaron que cuando esta bacteria crece en un medio desprovisto de fuentes nitrogenadas, promueve el crecimiento de las plantas produciendo AIA a partir del triptófano, mediante la ruta del ácido-3-pirúvico (PIyA) (Tien et al., 1979), considerándose este mecanismo como específico de la

bacteria, este es un resultado muy importante para la agronomía de *Moringa* en ecosistemas semidesérticos, tal cual es la condición de aproximadamente el 15% de la nación mexicana, donde está incluida la Península de Baja California.

Dentro de las transformaciones que promueve el *A. brasilense* en la planta, Romero et al., (2014) señalaron que el AIA producido por esta bacteria, además de promover reacciones en cadena que se expresan en el crecimiento de la planta. Al sobrepasar las concentraciones endógenas de AIA por el efecto bacteriano provoca inhibición del crecimiento; la planta para contrarrestar este efecto acumulativo de la hormona la redirige al floema y raíz, en esta última se mantiene como reserva, y la ubicada en el floema, incrementa su diámetro, lo que facilita mayor incorporación de agua en la planta y facilita el crecimiento, por esta particularidad, a esta cepa bacteriana se le considera como el inóculo ideal para plantas que crecen en condiciones de estrés (Bashan y Dubrovsky, 1996), considerándose un control positivo adecuado para los experimentos presentados en este trabajo.

Una de las limitantes de las plántulas de alto porte para el trasplante en ecosistemas áridos, es su directa relación con un alto consumo de agua por el mayor desarrollo foliar, por lo que se consideran plantas de baja calidad al limitarse la supervivencia en ecosistemas áridos (Villalón et al., 2016), sin embargo, las transformaciones anatómicas y estructurales que promueve el *A. brasilense* a nivel de floema y raíces disminuyen esta limitante (Cassán et al., 2008), efectos que pueden relacionarse con los resultados obtenidos y que favorece su aplicación en ecosistemas adversos o de climas extremos condicionados por el déficit hídrico (Omar et al., 2017).

Zayed (2012) experimentó inoculando bacterias promotoras del crecimiento vegetal en plántulas de *M. oleifera* hasta 90 días de edad. Obtuvo alturas por el efecto combinado de los inóculos bacterianos y la edad superiores a las del presente estudio, señalando valores de altura para plantas inoculadas con *A. brasilense* de 120.80 cm*;* 110.80 cm en *Azotobacter chroococcum;* 89.20 cm con *Saccharomyces cerevisiae* y para las inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* alcanzaron 90.40 cm, la edad de corte (90 días) posibilitó según este autor mayor tiempo de exposición a las cepas microbianas y con ello mayor desarrollo de la planta.

Este autor identificó que la promoción del crecimiento por parte del *A. brasilense* y *S. fluorescens* había sido mediante el efecto de AIA y citoquininas, mientras que *A. chroococcum y S. cerevisiae* estimularon la producción de citoquininas y GAs, donde todo pareció indicar que la producción de más de una hormona por parte de algunas bacterias (*A. brasilense y P. fluorescens*) tuvo un mejor efecto, y por tanto, mejor respuesta en las plantas que en aquellas donde la bacteria promueve o direcciona su estímulo a un solo tipo de hormona, sin embargo, se debe considerar que la respuesta en la planta se verá influenciada por la representatividad en términos de concentración del tipo de hormona, y su consecuente efecto (Zayed, 2012).

La variable producción de hojas (Tabla 7), tiene una importancia relevante en el cultivo de *Moringa*, ya que en ellas se encuentran los principales compuestos activos (Cuellar-Nuñez et al., 2018). Hassanein y Al-Soqeer (2018) en la caracterización de ocho procedencias de *Moringa* en cuatro localidades de Arabia Saudita, obtuvieron menor número de hojas en comparación con el control del presente estudio, el ancho (0.3-1.2 cm) y largo (1-4 cm) también resultaron inferiores. Es consecuente que, a mayor rapidez de crecimiento, mayor demanda energética, y, por tanto, mayor desarrollo de láminas foliares para captar suficiente energía solar y producir compuestos osmóticamente activos que servirán, como fuente de energía primaria en el proceso de multiplicación celular (Ledea Rodríguez et al., 2018a, b).

En la presente investigación la variabilidad en números de hojas y su morfología se vinculan con estímulos hormonales que se promueven por los inóculos bacterianos, Jordán y Casaretto, (2006) señalaron que la combinación de GAs y AIA, ambas promovidas por el *A. brasilense*, estimulan el crecimiento de la planta y la producción de brotes a partir de una relación sinérgica entre ellas. Mientras que para los *Bacillus* spp. la producción de citoquininas y ácido giberélico intervienen de forma directa en la producción de hojas (Baset-Mia et al., 2017), a partir de los antecedentes mencionados, se considera que dichos efectos promovieron la producción de hojas en el presente estudio (Tabla 7).

Dentro del papel sinérgico entre hormonas relacionadas con el crecimiento vegetal se ha documentado que, la combinación de las citoquininas con otras hormonas (auxinas) induce la

acumulación de ciclinas (Jordán y Casaretto, 2006; Baset-Mia et al., 2017), éstas promueven nuevos ciclos en la célula y en la división celular, lo que genera la formación de nuevas estructuras, como tallos, brotes y hojas principalmente (Camelo et al., 2011). Se puede suponer entonces que, en el presente estudio se manifestaron los fenómenos mencionados, al coincidir las plantas que manifestaron un crecimiento más acelerado con las que presentaron significativamente mayor número de hojas ($P \leq 0.05$).

La proporción de hojas respecto a los tallos indicó ser una particularidad de la edad de la planta y condiciones de experimentación al no presentarse diferencias entre los tratamientos ($P \geq 0.05$). Los valores (1.4) indicados por Ledea-Rodríguez et al., (2018b) en las condiciones de campo en la región oriental de Cuba, fueron inferiores a los de la presente investigación (rango entre 54.39-78.41), donde, las condiciones en las que crecieron las plantas de la presente experimentación pudieron retardar el período de senescencia, referente a esto, se ha señalado que las ciclinas inducen este efecto (Camelo et al., 2011). La permanencia de hojas en la planta en estudio incrementa de forma relevante su valor nutricional, y que ésta no se vea afectada por el desarrollo de los tallos es un mérito para resaltar por parte de los inóculos bacterianos considerados en la presente investigación.

En el grosor del tallo, los resultados que se obtuvieron en dos accesiones de *Moringa* fueron superiores a los del presente estudio, refiriéndose valores de 0.72 y 0.70 cm (Bernice et al., 2018), las diferencias pueden estribar en las condiciones de experimentación respecto a la presente investigación. En esta misma variable, los valores obtenidos por Haouvang et al., (2017) al someter plántulas de *M. oleifera* Lam. a fertilización química, orgánica y sus combinaciones oscilaron entre 0.2-0.47 cm siendo similares a los de la presente investigación, lo que sugiere, que la fertilización química, bioquímica o su combinación inducen una sobre expresión en los ritmos de crecimiento de la planta que estimulan la división y multiplicación celular, lo que podría traducirse en una inversión de compuestos estructurales (lignina, celulosa y hemicelulosa) para la elongación del tallo y no para su engrosamiento, lo cual en intereses agronómicos es favorable debido a las limitantes que los compuestos estructurales, que

condicionalmente están presentes, restan para el valor nutritivo del órgano y de la biomasa de la planta.

Para el presente estudio, el conjunto de manifestaciones morfológicas tuvo efecto en la productividad de la planta y acumulación de biomasa seca (BS) (Tabla 7). Foidl y Mayorga (2003) para el rendimiento total de BS de *M. oleifera* se señalaron valores de 5.067 t ha^{-1}, promedio que resultó congruente para todos los tratamientos excepto para el tratamiento con *B. cereus* que promovió rendimientos de 12.92 t BS ha^{-1}, valor que se aproximó al obtenido con el empleo de densidades de siembra de 65000 plantas ha^{-1} (Zheng et al., 2016), lo cual podría sugerir la efectividad de los inóculos bacterianos para la acumulación de BS a nivel de planta, sin embargo, considerando que el rendimiento de hojas resultó en valores muy bajos (0.26-0.8 t BS ha^{-1}), podría afirmarse que la acumulación de BS en planta íntegra estuvo determinada por el aporte del peso de los tallos y no de hojas, lo cual, a su vez, se condiciona con el hábito de crecimiento inducido por las PGPR.

En este sentido, en el análisis de las tasas de crecimiento y variables relacionadas con componentes morfológicos y fisiológicos del crecimiento (Tabla 8), análisis que constituye en el primer reporte para el cultivo de *Moringa* mediante inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, se pudo constatar que, los inóculos bacterianos promovieron el desarrollo foliar de la planta (AF, IAF, DAF), así como el crecimiento (TCA y TCR) en función del tiempo (Tabla 8), por lo cual, las bacterias empleadas pueden ser consideradas en *M. oleifera* como promotoras del crecimiento vegetal (Barrera et al., 2010).

El crecimiento de las plantas está muy relacionado con la evolución del desarrollo foliar de las mismas, en este sentido, variables fisiológicas como TAN, LRA y AFE en el criterio de Villar et al., (2004) pueden llegar a explicar hasta el 80% en la variación de las tasas de crecimiento. La TAN al describir el balance neto de las ganancias por la tasa de fotosíntesis y las perdidas por las tasas de respiración mediante hojas, tallos y raíces sugiere con los resultados obtenidos en el presente estudio, la no incidencia de la inoculación con las PGPR en estos procesos, considerando los resultados de una uniforme expresión de TAN a una particularidad del género,

al respecto, Araújo et al., (2016) señalaron en la evaluación de plántulas de *M. oleifera* sometidas a estrés, la capacidad de controlar la respiración a fin de hacer un uso racional del recurso hídrico, lo cual ayuda, en función de la relación que establece TAN, con una aparente disminuida tasa fotosintética, aunque esta variable también se ve alterada por la distribución de biomasa a diferentes órganos, la composición química y la formación de área foliar (Villar et al., 2004).

En estudios donde la evaluación de la TAN fue objeto de análisis, se desarrollaron ensayos en condiciones de invernadero y cámaras de cultivos con disponibilidad de iluminación de ≥ 300 µmol m^{-2} s^{-1} de radiación fotosintéticamente activa, condiciones que no permiten la activación de enzimas fotosintéticas (Lambers et al., 1979), esto condiciona que no se expresen diferencias en la eficiencia de la fotosíntesis (Villar et al., 2004), traduciéndose el efecto del déficit de luminiscencia según Villar *op. cit.* en modificaciones en la morfología y arquitectura de la planta, donde la TAN tiene un efecto directo, en las tasas de crecimiento de la planta y eficiencia en el uso de nutrientes (Miyashita et al., 2012; Li et al., 2016). Las modificaciones del crecimiento y morfología en el presente estudio fueron perceptibles, pero no asociadas con la calidad de la iluminación sino con el efecto de los inóculos bacterianos.

La LRA por su parte, relaciona la ganancia de peso total de la planta por la cantidad de área foliar, siendo la TCR, el producto de la combinación de TAN x LRA cuando se considera el incremento de peso en tejidos. En condiciones de experimentación en invernaderos suele sobre expresarse la LRA, sin embargo, las combinaciones de disminuida capacidad fotosintética, abundante disponibilidad de agua y rápido crecimiento promovido por las PGPR, propiciaron hojas suculentas de bajos pesos específicos por unidad de área foliar, contribuyendo a que se manifestaran LRA entre 0.077-0.096 cm^2 para ganar 0.01 g de tejido.

Se considera que las condiciones de experimentación y el acelerado crecimiento por el efecto de los inóculos bacterianos, modificaron el desarrollo de las plantas y distribución de recursos de forma diferente entre los órganos, lo cual quedó en evidencia en las diferencias morfológicas que se manifestaron, y que se relaciona en el criterio de Villar et al., (2004) con aspectos

fisiológicos como, la captación de luz, asimilación de dióxido de carbono (hojas), absorción de agua y nutrientes minerales (raíces), sostén (tallos), aspectos no abordados en el presente estudio.

Para las proporciones de hojas, tallos y raíces respecto al peso de la planta, resultados publicados señalan valores de 0.40; 0.28 y 0.32, respectivamente (Poorter y Nagel, 2000). Respecto al presente estudio los valores se asemejan a los reflejados en el control y, significando la expresión morfológica en respuesta a la producción endógena de estas hormonas, donde se puede afirmar la producción por parte de los inóculos bacterianos, *Bacillus* (Islam et al., 2017; Aloo et al., 2019) *y Azospirillum* (Hadas y Okon, 1987; Zayed, 2012; Larraburu y Llorente, 2015), de citoquininas (promotoras de la aparición de brotes y hojas) en las plantas inoculadas.

Por parte de las variables morfológicas consideradas como indicadores de calidad de la planta (Tabla 9), se hace mención del índice de robustez, esta variable, relaciona la altura de la planta con el grosor del tallo, definiendo la fortaleza de la planta para afrontar la desecación y rachas de viento. En su interpretación valores inferiores a seis sugieren plantas robustas, mientras que valores superiores a éste, indican plantas débiles, y mientras más alejados sean, más frágiles resultan ser las plantas para la resistencia al viento, y lograr un crecimiento erecto y desarrollo en condiciones de campo (García, 2018). Otras consideraciones sugieren que una planta de buena calidad presentan elevados valores en el diámetro del cuello de la raíz y bajos coeficientes de índice de robustez (García y Mora, 2016).

El desarrollo radicular refleja la capacidad de almacenamiento de energía por parte de las plantas, y que, en caso de una desproporción en el desarrollo radicular-altura de la planta, ésta podría no sobrevivir. Para un sistema de policultivo en condiciones de vivero que incluía *M. oleifera*; *L. leucocephala* y *Cajanus cajan*, Noguera-Talavera et al., (2014) observaron longitudes de raíces de 19.7 cm; 23.8 y 27.1 cm, respectivamente, superiores a las mostradas en la Tabla 9, las cuales oscilaron entre 3.54-5.16 cm. Las características morfológica de un sistema radicular tuberoso, como lo es el de *Moringa*, indican poco desarrollo de la región de la cofia (Taiz y

Zeiger, 2006), por lo que las diferencias respecto a la investigación que se cita fue el tiempo de experimentación que dedicaron a la evaluación del cultivo (70 días) y no por factores que favorecieron este tipo de desarrollo.

Estos mismos autores para el grosor de la raíz señalaron valores de 1.17; 0.4 y 0.2 cm, respectivamente, notablemente inferiores a los obtenidos en la presente investigación que osciló entre 1.18-1.58 cm (Tabla 9). En este sentido, es importante mencionar que las características morfológicas del tipo de raíz de *Moringa* señalan un desarrollo importante de la región del córtex, relacionado con el almacenamiento de agua, carbohidratos y minerales, principalmente (Taiz y Zeiger, 2006), considerando el tiempo de investigación de los autores Noguera-Talavera *op. cit*. para el desarrollo de la planta con asistencia de riego, se podrían considerar las diferencias por el fenotipo de los cultivares (respecto a los valores del control de la presente investigación), y no al efecto de la inoculación con PGPR.

Para la relación tallo/raíz, las plantas inoculadas con bacterias desarrollaron tallos más largos y raíces más cortas respecto a las plantas consideradas como control, en el cual, la longitud de la raíz fue mayor y los tallos más cortos, se evidenció que los efectos de las cepas bacterianas provocaron un mayor crecimiento de los tallos respecto a las raíces, en consideración Romero et al., (2014) señalaron que cuando las raíces, por sus características morfológicas, se caracterizan por una deficiente absorción de nutrientes y agua, y no provean la energía suficiente a la planta, entonces se generarán tallos cortos y plantas débiles, aspecto descartado en la presente investigación.

La BMA/MBR expresa en base seca la relación biomasa aérea (hojas y tallos) respecto biomasa radicular (raíces) (Villar et al., 2004). Las plantas inoculadas tuvieron una proporción más cercana a lo aceptable considerada entre 1.5-2.5 (Noda-Leyva et al., 2015), mientras que el control se alejó de este valor, lo que significa que hubo mayor proporción de biomasa aérea respecto a raíces. Para *M. oleifera* se refieren índices de 1.8 (Noguera-Talavera et al., 2014), sin embargo, es de interés para la presente investigación obtener una mayor proporción de biomasa aérea respecto a la radicular. Todos los inóculos bacterianos promovieron el

crecimiento de la planta y de su área foliar, pero no el de raíces, Jordán y Casaretto, (2006) mencionaron que cuando existen sinergismos entre hormonas se limita la producción de etileno por parte de la planta, al respecto Camelo et al., (2011) afirmaron que el uso de PGPR disminuye y en algunos casos inhiben la producción de etileno en la planta debido a la intervención de otras hormonas potenciadas por la acción bacteriana.

Dentro de los indicadores de calidad, el índice de Dickson constituye uno de los criterios más utilizados, expresando el equilibrio en la distribución de la masa y la robustez de la planta (Villalón *et al.*, 2016). Los valores de 3.8-4.44 señalados por Aparecida-Rodrigues et al., (2016) en la evaluación de diferentes proporciones de sustratos orgánicos con fibra de coco verde en el cultivo de *M. oleifera* Lam.; y los referidos en *Quercus canby* Trel (5.0-8.0) (Villalón et al., 2016) fueron superiores a los del presente estudio, no así los promedios señalados por Nascimento de Almeida et al., (2019) en *M. oleifera* Lam. en diferentes sustratos, los cuales estuvieron muy cercanos a 0.2, definido como el valor bajo permisible para este índice, atendiendo a este valor, las plántulas obtenidas en el presente estudio pueden considerar como plántulas de calidad, sin embargo, para esta variables no observaron diferencias respecto al control (Tabla 9).

La variabilidad de los valores en el índice de calidad de Dickson va a estar sujeta a varios factores, entre ellos, especie con que se trabaje, manejo de las plántulas en el vivero, tipo y proporción del sustrato, volumen del contenedor y, principalmente, la edad de la plántula en que los cambios fueron evaluados (Pereira-Oliveira et al., 2017), por lo que, a diferencia de otros estudios solo deberían ubicarse en consideraciones de los autores acerca de su resultado, sin enfatizar una discusión basada en las diferencias numéricas, considerándose además que el índice de Dickson es un valor preconcebido para valorar la calidad de las plántulas, donde 0.2 es el mínimo permisible independientemente de las condiciones de experimentación (Villar et al., 2004), argumento a considerar para establecer una discusión respecto a resultados de otros autores.

Referente al contenido mineral por mediación de PGPR en raíces (Tabla 10), el efecto de *B. niacini* sobre el contenido de microminerales a nivel de la raíz se basa según Belimov y Dietz

(2000) en un mecanismo para reducir la toxicidad por metales pesados, estos autores observaron en plantas de cebada inoculada con PGPR y cultivadas en un medio con altas dosis de Cd^{5+}, un incremento en la absorción de Ca^{2+}, Fe^{2+} y Mn^{2+}, este fenómeno también fue observado por Shabaev et al., (1999).

También fue observado por Shabaev *op. cit*. diferencias ($P \leq 0.001$) en la efectividad de las cepas de *Bacillus* en el enriquecimiento del perfil mineral de las raíces, *B. cereus* enriqueció el contenido de microminerales (Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{3+}) y elementos benéficos (Si^{4+}); *B. niacini* de macrominerales (P^{3+}, Mg^{2+}, K^{+}, S^{2+}) y metales pesados (Cd^{5+}, Pb^{4+}, Co^{3+}, Br^{7+}), respecto a *B. cereus* que solo incrementó la concentración de As, esto puede deberse a particularidades específicas de cada cepa, Bashan et al., (1991) tuvieron una experiencia similar en estudios con varias cepas de *A. brasilense* en la acumulación de Si^{4+}, observaron diferencias en función de las cepas para la acumulación de este mineral pero sin una descripción al respecto, lo que denota que es un aspecto en el que se debe profundizar, sobre todo por el número de factores que intervienen. En este mismo sentido, la acumulación de Si^{4+} promovida por *B. niacini* pudo estar sujeta a un mecanismo compensador por la incorporación de Fe^{2+} y Mn^{2+}, donde el Si actúa como reductor de la toxicidad de estos dos elementos (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

La composición mineral de hojas de *M. oleifera* (Figura 17); Kumssa et al., (2017) señalaron de forma comparativa el contenido mineral en diferentes órganos (hojas y flores) en dos variedades de *Moringa* (*M. oleifera* y *M. stenopetala*) respecto a otras especies y ecotipos existentes en África, señalando que, la variabilidad en el contenido mineral se debía a condiciones de crecimiento, factor genético y disponibilidad de compuestos en el suelo, aunque Olson et al., (2016) definió a *M. oleifera* como heterogénea en su composición mineralógica. Para el presente estudio, dado que las plantas crecieron bajo condiciones controladas y las semillas provienen de la misma planta madre, se puede considerar de poco aporte la aplicación de inóculos bacterianos para la diversificación del perfil mineral de hojas de *M. oleifera*.

La composición de metales pesados en hojas, los porcentajes atómicos para algunos fueron muy bajos por tratarse probablemente de elementos trazas, en este sentido Agboola et al., (2016)

señalaron que elementos como Co^{3+}, As^{5+}, Br^{7+} y Cd^{5+} forman parte del contenido mineral de la célula y que intervienen en diferentes procesos metabólicos, solo que, en muy bajas concentraciones, aspecto que por el cual quizás fueron detectados en el presente estudio.

El contenido de microminerales por su parte, coincidió con el referido por Olson et al., (2016) en hojas de cinco especies de *Moringa* (*M. oleifera*, *M. concanensis*, *M. stenopetala*, *M. concanensis* x *oleifera* híbrido, y *M. longituba*) cultivadas en huertas del estado de Jalisco, México, estos autores señalaron que, *M. oleifera* posee una predisposición en comparación con el resto de las especies en estudio, a acumular microminerales (Fe^{2+}, Mn^{2+} y Zn^{2+}; P^{3+}) y macrominerales (Ca^{2+}); y en menor cantidad Mg^{2+}, y Na^{+} como elemento beneficioso.

En el presente estudio, la inoculación con PGPR determinó que se establecieran diferencias en la acumulación de Mg^{2+} en hojas, esto significó que el inóculo que más Mg^{2+} incorporó a la planta (*B. niacini*) respecto al control, predispuso una menor absorción de K^{+} respecto al control, el resto de los inóculos al parecer establecieron un balance para la absorción de estos dos minerales al permanecer entre los rangos superiores e inferiores. Las diferencias en el contenido de Mg^{2+} y K^{+} en hojas se deben al efecto antagónico que presenta el K^{+} para Mg^{2+} (Nolasco-Bethencourt, 2017), por ello las hojas de plantas inoculadas con *B. niacini* presentaron más Mg^{2+} que K^{+}, y de forma inversa el tratamiento control, considerándose a los inóculos bacterianos de poco prácticos para diversificar el perfil mineral en los tejidos de las plantas debido a las relaciones de antagonismo y sinergismos que se establecen entre ellos (Gaxiola-Ariza, 2019), aspecto que se confirmó en las relaciones mediante en el ACP de raíz (Fig. 18 A) y de hojas (Fig. 18 B).

A nivel de raíz (Fig. 18A) se constató la presencia de tres minerales por el efecto de los inóculos (P^{3+}, Br^{+} y K^{+}), con cercanías de Mg^{2+} que es sinérgico a P^{3+}, sin embargo, en hojas (Fig. 18B) se observó Mn^{2+}, Zn^{2+} y Al^{3+}. El Mn^{2+} es sinérgico a K^{+}, por lo que se asume que fue este mineral el que prevaleció en la absorción para posibilitar la incorporación de Mn^{2+} a la célula vegetal, mientras que la presencia de Al^{3+} en el tejido vegetal de hojas se podría relacionar con actividad

de ácidos orgánicos producidos a nivel de la raíz (donde se observa muy próximo a los inóculos (Fig. 18 A)) para su quelación y posterior incorporación a la célula vegetal (Gaxiola-Ariza, 2019). Este reordenamiento (relación entre disponibles y absorbidos) en la composición mineral, pudo haber afectado la concentración de pigmentos fotosintéticos mediante el uso de PGPB. Los pigmentos tienen roles importantes en su desempeño como metabolitos, antioxidantes y precursores hormonales (Howitt y Pogson, 2006), intervienen de forma activa en la respuesta al estrés ambiental y con ello a la eficiencia fotosintética (Reol, 2012), debería esperarse entonces, una mayor concentración en las plantas inoculadas, ya que según del Rosario Cappellari et al., (2015), las PGPR posibilitan mayor absorción de agua y nutrientes en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas, y por tanto existe una sensibilidad a la tensión oxidativa que puede dañar al aparato fotosintético.

Abd El-Aal y Salem, (2018) en su estudio consideraron variantes de fertilización con PGPR distribuidas en dos grupos (A y B) modificadas con ¾ de fertilización química, entre las cepas de PGPR relacionaron dos especies de *Bacillus* y la presencia distintiva de *Azospirillum lipoferium* y *Azotobacter chroococcum* en cada grupo conformado por estos autores, las suspensiones celulares fueron concebidas en el orden de 7 x 10^9 para la evaluación de la promoción del crecimiento y desarrollo de plantas de *M. oleifera,* y componentes químicos (expresión de enzimas antioxidantes y concentración de pigmentos fotosintéticos) en edades comprendidas entre 75 y 150 días.

En la concentración de pigmentos fotosintéticos con el uso de las bacterias modificadas con ¾ de fertilizantes químicos obtuvieron valores de concentración de clorofila *a*, *b*, carotenos y relación clorofila *a* + clorofila *b* de 1.14-1.94; 0.58-0.94; 0.72-1.81; 1.81-2.85 mg g^{-1} peso fresco, respectivamente. De estos valores, la concentración de clorofila *a, b* y relación de clorofila *a* + clorofila *b* fueron inferiores a los promedios obtenidos en el presente estudio (Tabla 11), solo el contenido de carotenos fue superior a la presente investigación. Según El-Aal *op. cit.* los altos valores de clorofila *b* obtenidos en la combinación de los inóculos bacterianos y fertilización química se debe al mejoramiento del aparato fotosintético por la producción de fotosintatos

mediante la disponibilidad de minerales suministrados por la fertilización química, compensado con el desarrollo foliar alcanzado por el efecto hormonal de las bacterias.

Sin embargo, en la experiencia del presente estudio, se observa un importante aporte de los inóculos en la disponibilidad mineral (raíz), pero poco en la concentración mineral en hojas respecto al tratamiento control, debido principalmente a las relaciones antagónicas y sinérgicas que se establecen entre los diferentes tipos de minerales cuando van a ser absorbidos, aspecto este que no fue considerado por El-Aal *op. cit.*, y que para el presente estudio pudo probablemente, predisponer la expresión de diferencias en el contenido de clorofilas principalmente, al haberse limitado la absorción de Mg^{2+} por el antagonismo con K^{+} como se explicó anteriormente.

Es probable, para la presente investigación, aunque no se alcanzaron diferencias significativas, que los valores numéricos más altos se concentraran en *Bacillus niacini*, por el efecto de las citoquininas, hormonas promovidas por este género de bacteria, en este sentido Jordán y Casaretto, (2006) señalaron como una de las funciones de estas hormonas, el retraso en la senescencia, lo cual pudo influir fisiológicamente en la permanencia del color verde en el tiempo y con ello la concentración de clorofilas, aunque numéricamente no se alcanzara significación.

La similitud de las plantas inoculadas respecto al tratamiento control en la concentración de los pigmentos fotoprotectores (carotenoides, denominados xantofilas (Violaxantina, Luteína y Zeaxantina)) puede estar relacionado por una parte al efecto de las PGPR. Según Anli et al., (2020) las PGPR pueden estimular de forma indirecta la síntesis de compuestos antioxidantes (metabolitos secundarios) para controlar/eliminar compuestos residuales (ROS) de los fotosistemas, contribuyendo a mejorar la fotosíntesis sin necesidad de incrementarse la concentración de pigmentos fotosintéticos o foto protectores, por lo que, el efecto de la inoculación con PGPR no siempre se podría traducir en un incremento del contenido de clorofilas como expresión del incremento del potencial antioxidante a partir de la concentración de pigmentos fotosintéticos (Sati et al., 2021).

La concentración de compuestos secundarios (flavonoides) mostró variaciones en función de los inóculos bacterianos (Figura 19B), sugiriendo el reconocimiento de las rizo bacterias por parte de la *M. oleifera*, del Rosario Cappellari et al., (2015) obtuvieron resultados similares en cuanto a la variabilidad de concentraciones promovidas por inóculos de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* en plantas de *Mentha piperita*. La diferenciación obedece a estímulos que promueven la producción de AJ y AS, involucrados ambos en la resistencia sistémica inducida (Ochoa et al., 2010).

La producción de estos dos compuestos (AJ, AS) está mediada por la activación de genes, que a su vez activan rutas enzimáticas. El AS se sintetiza a través de la ruta fenilpropanoide que comienza en el citoplasma mediante la vía fenilalanina amoníaco-liasa, y por la vía isocrosmato (IC) a nivel de los cloroplastos celulares, dependiendo ambas del corismato, producto final de la vía shikimato. La transformación final a AS se desarrolla mediante el ácido ortocumárico o ácido benzoico dependiendo del tipo de planta y condiciones de crecimiento (Tounekti et al., 1995), mientras que el AJ existen varias especies químicas con sus respectivas rutas que complejizan la compresión de la vía se señalización (Ruan et al., 2019).

Referente de la intervención del AJ y As en la síntesis de compuestos secundarios, del Rosario Cappellari et al., (2015); del Rosario Cappellari et al., (2019) señalaron que, el incremento en la concentración de ácido jasmónico en plantas de *M. piperita* promueve el incremento de terpenos mediante el aumento de la transcripción del gen LeMTS1 que codifica un monoterpeno sintetasa para la producción específica de linealol, mientras que para la producción de flavonoides solo es preciso para la activación de su metabolismo condiciones estresantes, abióticas o bióticas, que se transcribe mediante la intervención de dos enzimas multigénicas: la fenilalanina amonio liasa y chalcona sintasa (Torronen et al., 1997).

A partir de los resultados, y considerando las condiciones de experimentación, se puede inferir que las bacterias inoculadas provocaron una reacción defensiva en la planta incrementando la producción de flavonoides en hojas, respecto a las plantas no inoculadas.

9. CONCLUSIONES

1. Los medios MS y MSG determinaron el proceso de crecimiento, desarrollo, morfología de plántulas de M. oleifera, y la multiplicación mediante porciones apicales con la adición de 0.001 g L^{-1} de 6-BAP, pero no aportan en la germinación de semillas.

2. *Bacillus niacini* promovió los menores tamaños de estomas, el resto de los inóculos bacterianos promovieron transformaciones morfológicas en la estructura estomática sin reducir su tamaño.

3. Las modificaciones morfológicas en la planta estuvieron en función del tipo de inóculo, *A. brasilense* promovió el crecimiento en función de la altura; y *B. cereus* diversificó el desarrollo foliar con incremento en el número de hojas y acumulación de BS de hojas y planta íntegra.

4. La disponibilidad mineral a nivel de raíz por parte de los inóculos y diversificación del perfil mineral de hojas de plantas inoculadas con *B. niacini* mediante el incremento del contenido de K^+, y las concentraciones significativas de flavonoides totales en hojas podrían conducir a una mejora en el perfil antioxidante de las plantas inoculadas, a pesar de que no se obtuvieron diferencias en el contenido de polifenoles totales y pigmentos fotosintéticos.

10. LITERATURA CITADA

Abbaszadeh, S., Miri, S. y Naderi, R. (2018). An Effective Nutrient Media for Asymbiotic Seed Germination and *In Vitro* Seedling Development of *Phalaenopsis* 'Bahia Blanca'. *Journal of Ornamental Plants*, 8(3): pp. 183-192. ISSN: 2251-6441

Abd El-Aal, M. y Salem, A. (2018). Ameliorating Growth Performance and Active Compounds of Moringa Plant by Integrated Nutrients Management. *Journal of Plant Production*, 9(3): 259-268. doi: 10.21608/jpp.2018.35467

AbdulRahaman, AA., Afolabi, AA., Zhigila, DA., Oladele, FA. y Al Sahli, AA. (2018). Morpho-anatomical effects of sodium azide and nitrous acid on *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai (*Cucurbitaceae*) and *Moringa oleifera* Lam. (*Moringaceae*). *Hoehnea*, 45(2): 225-237. doi: 10.1590/2236-8906-26/2017

Abubakar, B., MuA'zu, S., Khan, A. y Adamu, A. (2013). Variability Studies as Inferred from Leaf Morpho-Stomatal Features in *Moringa oleifera* Lam. from Northern Nigeria. *Agrosearch*, 13(1): 37. doi: 10.4314/agrosh.v13i1.4

Abubakar, BY., Mua 'zu, S., Khan, AU. y Adamu, AK. (2011). Morpho-anatomical variation in some accessions of *Moringa oleifera* Lam. from Northern Nigeria. *African Journal of Plant Science*, 5(12): 742-748

Adouko, S., Soha, S., Ohouko, O. Fréjus, Y. y Dougnon, T. (2019). A comparative study of phytochemical profile and antioxidant activity of Sahelian plants used in the treatment of infectious diseases in northern part of Burkina Faso: *Acacia seyal* Delile and *Acacia tortilis* (Forssk.) Hayne subsp. raddiana (Savi). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 11(3): 74-79. doi: 10.5897/jpp2019.0555

Agboola, OO., Orji, DI., Olatunji, OA. y Olowoyo, JO. (2016). Bioaccumulation of heavy metals by *Moringa oleifera* in automobile workshops from three selected local governments area, Ibadan, Nigeria. *West African Journal of Applied Ecology*, 24(1): 9-18

Aguilar-Díaz, T. (2014). Búsqueda y selección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para su uso en el cultivo del tomillo y orégano. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Departamento de Ecología Microbiana, México.

Aguirre, LE. (2017). Establecimiento de la primera etapa de un cultivo *in vitro* de moringa (*Moringa oleifera*). *Revista Nova*, 3: 59-69. doi: 10.23850/25004476.1542.

Ahemad, M. y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1): 1-20. doi: 10.1016/j.jksus.2013.05.001

Ahmed, N., Khan, D. y Zaki, MJ. (2011). Seed and seedling size relationship in Castor (*Ricinus communis* L .). *Int J Biol Biotech*, 8(4): 613-622

Aloo, BN., Makumba, BA. y Mbega, ER. (2019). The potential of Bacilli rhizobacteria for sustainable crop production and environmental sustainability. *Microbiological Research*, 219(November 2018): 26-39. doi: 10.1016/j.micres.2018.10.011

Amaglo, NK., Bennett, RN., Lo Curto, RB., Rosa, EAS., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A Lo., Crea, F. y Timpo, GM. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4): 1047-1054. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.03.073

Anli, M., Baslam, M., Tahiri, A., Raklami, A., Symanczik, S., Boutasknit, A., Ait-El-Mokhtar, M., Ben-Laouane, R., Toubali, S., Ait Rahou, Y., Ait Chitt, M., Oufdou, K., Mitsui, T., Hafidi, M. y

Meddich, A. (2020). Biofertilizers as Strategies to Improve Photosynthetic Apparatus, Growth, and Drought Stress Tolerance in the Date Palm. *Frontiers in Plant Science*, 11(October). doi: 10.3389/fpls.2020.516818

Aparecida-Rodrigues, L., Araujo-Muniz, T., Silva-Samarão, S. y Erse-Cyrino, A. (2016). Qualidade de mudas de *Moringa oleifera* Lam. cultivadas em substratos com fibra de coco verde e compostos orgânicos. *Revista Ceres Vicosa*, 63(4): 545-552. doi: 10.1590/0034-737X201663040016

Arambarri, AM., Novoa, MC., Bayón, ND., Hernández, MP., Colares, MN. y Monti, C. (2011). Anatomía foliar de arbustos y árboles medicinales de la región chaqueña semiárida de la Argentina. *Domingueziana*, 27(1): 5-24

Araújo, M., Santos, C., Costa, M., Moutinho-Pereira, J., Correia, C. y Dias, MC. (2016). Plasticity of young Moringa oleifera L. plants to face water deficit and UVB radiation challenges. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology,* 162: 278-285. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.06.048

Ardestani, A. y Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104(1): 21-29. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.10.066

Arnon, DI. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1): 1-15. doi: 10.1104/pp.24.1.1

Avila-Treviño, JA., Muñoz-Alemán, JM., Pérez-Molphe-Balch, E., Rodríguez-Sahagún, A. y Morales-Domínguez, JF. (2017). *In vitro* propagation from bud and apex explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker. *South African Journal of Botany*, 108: 149-156. doi: 10.1016/j.sajb.2016.10.003

Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. , Segunda ed. McGraw-Hill, Barcelona. ISBN: 9788578110796. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Aziz-Sawal, H., Asghar, K. y Jalal, N. (2017). Bystander signaling via oxidative metabolism. *OncoTargets and Therapy,* 10: 3925-3940. doi:10.2147/OTT.SI36076

Balliu, A., Sallaku, G. y Rewald, B. (2015). AMF inoculation enhances growth and improves the nutrient uptake rates of transplanted, Salt-stressed tomato seedlings. *Sustainability (Switzerland)*, 7(12): 15967-15981. doi: 10.3390/su71215799

Barrera, J., Suárez, D. y Melgarejo, LM. (2010). Análisis de crecimiento en Plantas. En: Luz Marina M (ed) Experimentos en fisiologíay bioquímica vegetal, Edition fi ed. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, pp 25-38

Bartlett, MS. (1937). Properties of sufficiency and statiscal test. *Proceedings of the Royal Society of London Series A-Mathematical and Physical Sciences*, 160(901): 268-282

Baset-Mia, MA., Aminun- Naher, A., Ali-Panhwar, Q. y Tofazzal-Islam, M. (2017). Growth Promotion of Nonlegumes by the Inoculation of *Bacillus* Species. En: Tofazzal M, Pandey P, Aeron A, Mahfuz R, Kumar C (eds) Bacilli and Agrobiotechnology, First ed. Switzerland, p 57

Bashan, Y. y Dubrovsky, JG. (1996). *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. *Biology and Fertility of Soils*, 23(4): 435-440. doi: 10.1007/BF00335919

Bashan, Y., Harrison, SK. y Whitmoyer, RE. (1990). Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl Environ Microbiol*, 56: 769-775. doi: 10.1128/aem.56.3.769-775.1990.

Bashan, Y., Levanony, H. y Whitmoyer, RE. (1991). Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*, 137(1): 187-196. doi: 10.1099/00221287-137-1-187

Belimov, AA. y Dietz, K. (2000). Effect of associative bacteria on element composition of barley seedlings grown in solution culture at toxic cadmium concentrations. *Microbiological research*, 155(2): 113-121. doi: 10.1016/S0944-5013(00)80046-4

Bennett, RN., Mellon, FA., Foidl, N., Pratt, JH., Dupont, MS., Perkins, L. y Kroon, PA. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and Moringa stenopetala L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12): 3546-3553. doi: 10.1021/jf0211480

Bernice, NF., Gailyson, YJ. y Maryam, HA. (2018). Nursery performance and early growth of two *Moringa oleifera* accessions grown under varied manure levels. *Journal of Research in Forestry, Wildlife & Environment*, 10(1): 1-10. ISBN: 2141 – 1778

Bertalanffy, L Von. (1957). Quantitative laws in metabolism and growth. *The Quartery review of Biology T*, 32(3): 333-406

Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P. y Cleyet-Marel, JC. (2000). Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, 46(3): 229-236. doi: 10.1139/w99-137

Bhakta, JN., Lahiri, S. y Bhuiyna, FA. (2017). Profiling of heavy metal (loid) -resistant bacterial community structure by metagenomic-DNA fingerprinting using PCR – DGGE for monitoring and bioremediation of contaminated environment. Energy, Ecol Environ. doi: 10.1007/s40974-017-0079-2

Bhattacharyya, P. y Jha, DK. (2015). Plants as a source of natural antioxidants. ISBN: 9781780642666. doi: 10.1079/9781780642666.0000

Boopathi, NM., Harshith, JD., Santhanakrishnan, VP. y Raveendran, M. (2021). Tissue Culture and Genetic Engineering in Moringa BT - The Moringa Genome. En: Boopathi NM, Raveendran M, Kole C (eds)Springer International Publishing, Cham, pp 67-83

Buettner, GR. (1993). The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α-Tocopherol, and Ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300:535-543. doi: 10.1006/abbi.1993.1074

Bulbarela-Marini, JE., Gómez-Merino, FC., Galindo-Tovar, ME., Solano-Rodríguez, LA., Murguía-González, J., Pastelín-Solano, MC., Núñez-Pastrana, R. y Castañeda-Castro, O. (2019). The *in vitro* propagation system of *Citrus × latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (*Rutaceae*) affects the growth and depletion of nutriments. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(3): 290-295. doi: 10.1007/s11627-019-09976-4

Cabello, A., Olivas, F., Valdés, A. y Alcalá, L. (2019). Evaluation of *Bacillus subtilis* as promoters of plant growth Evaluación de cepas de *Bacillus subtilis* como promotoras de crecimiento vegetal. *Revista Bio Ciencias*, 52(844): 1-13. ISSN 2007-3380.

Camelo, M., Vera, S. y Bonilla., R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2): 159. doi: 10.21930/rcta.vol12_num2_art:227

Campbell, A., Mitchell, L. y Reece, J. (2014). Campbell Biology. , 3th Edition ed. Pearson education. ISBN: 968-444-413-3

Cardoso, JC., de Oliveira, ME. y Cardoso, F de CI. (2019). Advances and challenges on the *in vitro*

production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2): 124-132. doi: 10.1590/s0102-053620190201

Carrillo, AE., Li, CY. y Bashan, Y. (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften*, 89(9): 428-432. doi: 10.1007/s00114-002-0347-6

Cassán, F., Sgroy, V., Perrig, D., Masciarelli, O. y Luna, V. (2008). Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. En: Cassán F, García de Salamone I (eds) *Azospirillum* sp., cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina, Asociación ed. Asociación Argentina de Microbología, Buenos Aires, pp 61-86

Cheraghi, M., Namdari, M., Daraee, H. y Negahdari, B. (2017). Cardioprotective effect of magnetic hydrogel nanocomposite loaded N,α-L-rhamnopyranosyl vincosamide isolated from *Moringa oleifera* leaves against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats: *in vitro* and in vivo studies. *Journal of Microencapsulation*, 34(4): 335-341. doi: 10.1080/02652048.2017.1311955

Choudhury, FK., Rivero, RM., Blumwald, E. y Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5): 856-867. doi: 10.1111/tpj.13299

Compant, S., Clément, C. y Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5): 669-678. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024

Copeland, LO., y McDonald, MB. (1995). Principles of Seed Science and Technology. Third edition. Chapman and Hall. New York, USA. 409 pp

Costa, OYA., Raaijmakers, JM. y Kuramae, EE. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL): 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2018.01636

Crawford, TJ. (2021a). Plant nutrition-Rates of transport and metabolism. En: Press C (ed) Handbook of Plant and Crop Physiology, 4 Edition ed. Taylor and Francis Group, pp 261-288

Crawford, TJ. (2021b). Plant Nutrition--Interactions of Mineral and Organic Substances. En: Press C (ed) Handbook of Plant and Crop Physiology, 4 Edition ed. Taylor and Francis Group, pp 297-314

Crosby, GW. y Craker, LE. (2007). Development of soilless culture methods for production of Moringa (Moringa oleifera Lam.) root and leaf biomass. Acta Hortic. 756. 139-146. doi: 10.17660/ActaHortic.2007.756.15

Cuellar-Nuñez, ML., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, MA., González de Mejía, E. y Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of moringa (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an *in vivo* AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food Research International*, 105(November 2017): 159-168. doi: 10.1016/j.foodres.2017.11.004

De Armas, U., Delgado, R., Ortega, E. y García, R. (1988). Fisiología vegetal. , Pueblo y E ed. La Habana.

del Rosario Cappellari, L., Santoro, MV., Reinoso, H., Travaglia, C., Giordano, W. y Banchio, E. (2015). Anatomical, Morphological, and Phytochemical Effects of Inoculation with Plant Growth- Promoting Rhizobacteria on Peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Chemical*

Ecology, 41(2): 149-158. doi: 10.1007/s10886-015-0549-y

del Rosario Cappellari, L., Santoro, MV., Schmidt, A., Gershenzon, J. y Banchio, E. (2019). Induction of essential oil production in Mentha x piperita by plant growth promoting bacteria was correlated with an increase in jasmonate and salicylate levels and a higher density of glandular trichomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141(March): 142-153. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.05.030

Dias, MI., Sousa, MJ., Alves, RC. y Ferreira, ICFR. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products*, 82: 9-22. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.016

Dickson, A., Leaf, AL. y Hosner, JF. (1960). Quality Appraisal of White Spruce and White Pine Seedling Stock in Nurseries. *The Forestry Chronicle*, 36(1): 10-13. doi: 10.5558/tfc36010-1

Dou, H. y Kister, J. (2016). Research and development on *Moringa Oleifera* – Comparison between academic research and patents. *World Patent Information*, 47: 21-33. doi: 10.1016/j.wpi.2016.09.001

Drake, PL., Froend, RH. y Franks, PJ. (2013). Smaller, faster stomata: Scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64(2): 495-505. doi: 10.1093/jxb/ers347

Drisya Ravi, RS., Siril, EA. y Nair, BR. (2019). The effect of silver nitrate on micropropagation of *Moringa oleifera* Lam. an important vegetable crop of tropics with substantial nutritional value. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(5): 1311-1322. doi: 10.1007/s12298-019-00689-x

El-Afry, MM., El-Nady, MF., Abdelmonteleb, EB. y Metwaly, MMS. (2012). Anatomical studies on drought-stressed wheat plants (*Triticum aestivum* l.) treated with some bacterial strains. *Acta Biologica Szegediensis*, 56(2): 165-174. Disponible en: http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2782. Fecha de acceso, 20 de diciembre de 2020.

Ellis, RH. y Roberts, EH. (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany*, 45(1): 13-30. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a085797

Espinosa-Leal, CA., Puente-Garza, CA. y García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1): 1-18. doi: 10.1007/s00425-018-2910-1

Fahey, JW., Olson, ME., Stephenson, KK., Wade, KL., Chodur, GM., Odee, D., Nouman, W., Massiah, M., Alt, J., Egner, PA. y Hubbard, WC. (2018). The Diversity of Chemoprotective Glucosinolates in *Moringaceae* (*Moringa* spp.). *Scientific Reports*, 8(1): 1-14. doi: 10.1038/s41598-018-26058-4

Faizi, S., Siddiqui, BS., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K. y Gilani, A ul H. (1994). Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *Journal of Natural Products*, 57(9): 1256-1261. doi: 10.1021/np50111a011

FAO. (2019). Código internacional de conducta para el uso y manejo de fertilizantes. , FAO ed. Roma. ISBN: 978-92-5-131768-6. doi: https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00109-2

Farooq, F. (2012). Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(27): 4368-4374. doi: 10.5897/jmpr012.279

Fazal, H., Abbasi, BH., Ahmad, N., Ali, M. y Ali, S. (2016). Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary

metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124(3): 573-581. doi: 10.1007/s11240-015-0915-z

Foidl, N. y Mayorga, L. (2003). Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. *Conferencia electrónica de la FAO sobre «Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica»*, (utilizacion del marango): 3-7. Disponible en: http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/FRG/Agrofor1/Foidl16.htm. Fecha de acceso, 20 de junio de 2020.

Förster, N., Mewis, I. y Ulrichs, C. (2013). *Moringa oleifera*-Establishment and Multiplication of Different Ecotypes *In Vitro*. *Gesunde Pflanzen*, 65(1): 21-31. doi: 10.1007/s10343-013-0291-8

Fortini, EA., Batista, DS., Mamedes-Rodrigues, TC., Felipe, SHS., Correia, LNF., Chagas, K., Silva, PO., Rocha, DI. y Otoni, WC. (2021). Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144(3): 593-605. doi: 10.1007/s11240-020-01981-5

Fotouo-M., H., du Toit, ES. y Robbertse, PJ. (2015). Germination and ultrastructural studies of seeds produced by a fast-growing, drought-resistant tree: Implications for its domestication and seed storage. *AoB PLANTS*, 7(1): 1-12. doi: 10.1093/aobpla/plv016

Gamborg, OL., Murashige, T., Thorpe, TA. y Vasil, IK. (1976). Plant Culture Medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 12(15): 473-478

García, II. (2018). Origen, bondades y usos de *Moringa oleifera*, Lam: una revisión sistemática. En: Árboles y arbustos para la ganadería tropicalpp 43-68

García, II. y Mora, J. (2016). Manejo y desempeño de *Moringa oleifera* (Lam) en la etapa de vivero y trasplante. En: Árboles y arbustos para silvopasturasColombia, pp 86-106

Gaxiola-Ariza, R. (2019). Manipulación de las Protón Pirofosfatasas (H+-PPasa) en plantas. In: Instituto de Investigaciones Agrícolas | UCR (Video de Youtube). Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=pFwsfBLIwIs. [consulta: 23 de noviembre de 2021]

Geletii, I V., Balavoine, GG., Efimov, ON. y Kulikova, VS. (2002). The determination of total concentration and activity of antioxidants in foodstuffs. *Bioorganicheskaia khimiia*, 28(6): 551-566. doi: 10.1023/A:1021249717025

Ghorbanpour, M. y Varma, A. (2017). Medicinal plants and environmental challenges. *Medicinal Plants and Environmental Challenges*, (December): 1-413. doi: 10.1007/978-3-319-68717-9

Gijon, D., Reyes-becerril, M., Junco, E. y Angulo, C. (2020). Uso de hierbas aromáticas en la producción animal. *Recursos Naturales y Sociedad*, 6(2): 23-29. doi: 10.18846/ renaysoc.2020.06.06.02.0003

Glover-Amengor, M., Aryeetey, R., Afari, E. y Nyarko, A. (2017). Micronutrient composition and acceptability of *Moringa oleifera* leaf-fortified dishes by children in Ada-East district, Ghana. *Food Science and Nutrition*, 5(2): 317-323. doi: 10.1002/fsn3.395

Gonzalez, AJ., Larraburu, EE. y Llorente, BE. (2015). *Azospirillum brasilense* increased salt tolerance of jojoba during *in vitro* rooting. *Industrial Crops and Products*, 76: 41-48. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.017

Gonzalez, AJ., Larraburu, EE. y Llorente, BE. (2021). *Azospirillum brasilense* mitigates anatomical alterations produced by salt stress in jojoba *in vitro* plants. Vegetos. doi: 10.1007/s42535-021-00275-1

Goswami, M. y Deka, S. (2020). Plant growth-promoting rhizobacteria—alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere*, 30(1): 40-61. doi: 10.1016/S1002-0160(19)60839-8

Gupta, BM. (2020). *Moringa oleifera*: A Bibliometric Analysis of International Publications during 1935-2019. *International Journal of Library Information Network*, 14(28): 82-90.

Habtemariam, S. y Varghese, G. (2015). Extractability of Rutin in Herbal Tea Preparations of *Moringa stenopetala* Leaves. *Beverages*, 1(3): 169-182. doi: 10.3390/beverages1030169

Hadas, R. y Okon, Y. (1987). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*, 5(3): 241-247. doi: 10.1007/BF00256908

Hamany Djande, CY., Steenkamp, PA., Piater, LA., Madala, NE. y Dubery, IA. (2019). Habituated *Moringa oleifera* callus retains metabolic responsiveness to external plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 137(2): 249-264. doi: 10.1007/s11240-019-01565-y

Hamid, AA., Aiyelaagbe, OO., Usman, LA., Ameen, OM. y Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8): 142-151.

Haouvang, LC., Albert, N., Martin, Y. y Mbaiguinam, M. (2017). Growth response of *Moringa oleifera* Lam. as affected by various amounts of compost under greenhouse conditions. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(2): 221-226. doi: 10.1016/j.aoas.2017.12.004

Hassanein, AMA. y Al-Soqeer, AA. (2018). Morphological and genetic diversity of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* genotypes. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59(2): 251-261. doi: 10.1007/s13580-018-0024-0

Hayat, MA. (1972). Basic electron microscopy techniques.Elsevier.Disponible en: < https://books.google.com.mx/books?id=coLKDYOB1PkC&lpg=PP1&ots=tSJTqgVRGm&dq=Basic%20electron%20microscopy%20techniques&lr&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q=Basic%20electron%20microscopy%20techniques&f=false. Fecha de acceso: 03 dic. 2020.

He Q., Hao Y., Gao X., Zhou W, y Li D. (2020). Biomass production of *Moringa oleifera* as affected by N, P, and K fertilization. Journal of Plant Nutrition. DOI: 10.1080/01904167.2020.1739305

Howitt, CA. y Pogson, BJ. (2006). Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*, 29(3): 435-445. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01492.x

Hunt, R. y Hunt, R. (1990). Relative growth rates. *Basic Growth Analysis*, : 25-34. doi: 10.1007/978-94-010-9117-6_3

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, MCB. y Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. doi: 10.1155/2016/7432797

Islam, MT., Rahman, M., Pandey, P., Jha, CK. y Aeron, A. (2017). Bacilli and Agrobiotechnology. ISBN: 9783319444093. doi: 10.1007/978-3-319-44409-3

Jafarian, T., Javad Zarea, M. y Siosemardeh, A. (2017). Histological Responses of Two Wheat Species to *Azospirillum* Inoculation under Dryland Farming. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 7(2): 67-79. ISSN: 2008-5168. Disponible en: https://breeding.tabrizu.ac.ir/article_7999.html. Fecha de acceso: 03 dic. 2020.

Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En: Squeo FA, Cardemil L (eds) Fisiología Vegetal, Universida ed. La Serena, pp 1-28

Jun-jie, Z., Yue-sheng, Y., Meng-fei, L., Shu-qi, L., Yi, T., Han-bin, C. y Xiao-yang, C. (2017). An

efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). *Industrial Crops and Products*, 103: 59-63. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.03.028

Kaiser, HF. (1974). An index of factor simplicity. *Psychometrica*, 39(1): 31-36. doi: 10.1007/BF02291575

Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R. y Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene*, 19(March): 100182. doi: 10.1016/j.plgene.2019.100182

Kothari, SL., Agarwal, K. y Kumar, S. (2004). Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet - Eleusine coracana (L.) gaertn. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 40(5): 515-519. doi: 10.1079/IVP2004564

Kottapalli, J., David-Schwartz, R., Khamaisi, B., Brandsma, D., Lugassi, N., Egbaria, A., Kelly, G. y Granot, D. (2018). Sucrose-induced stomatal closure is conserved across evolution. *PLoS ONE*, 13(10): 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0205359

Koene, FM., Amano, É. y Ribas, LLF. (2019). Symbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of Acianthera prolifera (Orchidaceae). South African J. of Bot. 121. 83-91. doi: 10.1016/j.sajb.2018.07.019

Kou, X., Li, B., Olayanju, JB., Drake, JM. y Chen, N. (2018). Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3). doi: 10.3390/nu10030343

Kumssa, D., Joy, E., Young, S., Odee, D., Ander, E. y Broadley, M. (2017). Variation in the mineral element concentration of *Moringa oleifera* Lam. and *M. stenopetala* (Bak. f.) Cuf.: Role in human nutrition. *PloS one*, 12(4): 1-26. doi: 10.1371/journal.pone.0175503

Laird, AK. (1965). Dynamics of relative growth. *Growth*, 29: 249-263

Lambers, H., Chapin III, SF. y Pons, TL. (1979). Plant Physiological Ecology. doi: 10.2307/3242233

Larraburu, EE., Apóstolo, NM. y Llorente, BE. (2010). Anatomy and morphology of photinia (*Photinia × fraseri Dress*) *in vitro* plants inoculated with rhizobacteria. *Trees - Structure and Function*, 24(4): 635-642. doi: 10.1007/s00468-010-0433-x

Larraburu, EE., Bususcovich, AC. y Llorente, BE. (2016). *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* and *ex vitro* rooting-acclimatization of jojoba. *Scientia Horticulturae*, 209: 139-147. doi: 10.1016/j.scienta.2016.06.016

Larraburu, EE. y Llorente, BE. (2015). Anatomical changes induced by *Azospirillum brasilense* in *in vitro* rooting of pink lapacho. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1): 175-184. doi: 10.1007/s11240-015-0759-6

Ledea-Rodríguez, J., Rosell -Alonso, G., Benítez-Jímenez, D., Cruz-Tejeda, J. y Arias-Pérez, R. (2018a). Sprouting and development of *Moringa oleifera* Lam plantlets, established with agamic seed. *Cuban Jornal of Agricultural Science*, 52(1): 97-103. ISSN 2079-3480. Disponible en: <>http://cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/784/793. Fecha de acceso: 03 dic. 2020.

Ledea Rodríguez, JL., Rosell Alonso, G., Benítez Jiménez, DG., Arias Pérez, RC. y Nuviola Pérez, Y. (2018b). Estructura y rendimiento forrajero de *Moringa oleifera* cv Nicaragua en diferentes frecuencias de corte. *Revista de Producción Animal*, 30(3): 13-21. ISSN 2224-7920.

Ledea Rodríguez, JL., Rosell Alonso, G., Benítez Jiménez, DG., Arias Pérez, RC., Ray Ramírez, JV. y Nuviola Pérez, Y. (2017). Efecto del ecotipo y la frecuencia de corte en el rendimiento forrajero de *Moringa oleifera* Lam, en el Valle del Cauto. *Revista de Producción Animal*, 29(3): 12-17. ISSN 2224-7920.

Ledea-Rodríguez, JL., Rosell-Alonso, G., Benítez-Jiménez, DG., Arias-Pérez, RC., Ray-Ramírez, JV. y Reyes-Pérez, JJ. (2018c). Producción de semillas de variedades de *Moringa oleifera* Lam en el Valle del Cauto. *Agron. Mesoamericana*.*29*(2): 415-423.doi: 10.15517/MA.V29I2.29545

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J. y Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6): 12791-12835. doi: 10.3390/ijms160612791

Li, G., Zhou, Q. y Li, X. (2016a). High-frequency planta regeneration from leaf cultures of *Moringa oleifera* Lam: A multipurpose plant. *Agricultural Science and Teconology*, 17(6): 1318-1358. Disponible en: http://marefateadyan.nashriyat.ir/node/150

Li, X., Lin, J., Han, W., Mai, W., Wang, L., Li, Q., Lin, M., Bai, M., Zhang, L. y Chen, D. (2012). Antioxidant ability and mechanism of rhizoma atractylodes macrocephala. *Molecules*, 17(11): 13457-13472. doi: 10.3390/molecules171113457

Li, X., Schmid, B., Wang, F. y Paine, CET. (2016b). Net assimilation rate determines the growth rates of 14 species of subtropical forest trees. *PLoS ONE*, 11(3): 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0150644

Liaudet, L., Soriano, FG. y Szabó, C. (2000). Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*, 28(4 SUPPL.). doi: 10.1097/00003246-200004001-00005

Lim, KB., Kwon, SJ., Lee, SI., Hwang, YJ. y Naing, AH. (2012). Influence of genotype, explant source, and gelling agent on in vitro shoot regeneration of *Chrysanthemum*. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 53(4): 329-335. doi: 10.1007/s13580-012-0063-x

Llorente, BE. y Apóstolo, NM. (1998). Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* propagation of jojoba. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26(1): 55-62. doi: 10.1080/01140671.1998.9514040

Llorente, BE., Juarez, LM. y Apóstolo, NM. (2007). Exogenous trehalose affects morphogenesis *in vitro* of jojoba. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(2-3): 193-201. doi: 10.1007/s11240-007-9237-0

Lobaina-Borges, J., Cabrera-Hechevarría, A., Fernández-Leyva, I. y Telo-Crespo, L. (2016). Efecto de diferentes sustratos orgánicos en el crecimiento de plántulas de *Moringa oleifera* Lam. *Hombre, Ciencia y Tecnología*, 1(576): 431-435. ISSN: 1028-0871.

Luna, CV. (2019). Establishment of an efficient standardization method of *in vitro* germination of *Moringa oleifera* (*Moringaceae*). *Acta Botanica Mexicana*, 126(1496): 1-14. doi: 10.21829/abm126.2019.1496

Lundberg, DS. y Teixeira, PJPL. (2018). Root-exuded coumarin shapes the root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(22): 5629-5631. doi: 10.1073/pnas.1805944115

Baset Mia, MA. (2012). Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*, 11(16): 3758-3765. doi: 10.5897/ajb09.1337

Ma, ZF., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I. y Muhammad, S. (2019). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of *Moringa* (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. South African J Bot. doi: 10.1016/j.sajb.2018.12.002

Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). Crecimiento bacteriano. En: Capella I, Caicoya M,

Clares J, Hernán J (eds) BROCK. Biología de los microorganismos, Décima edi ed. Pearson Prentice Hall, Madrid, pp 137-162

Mahmood, KT., Mugal, T. y Haq, IU. (2010). *Moringa oleifera*: A natural gift-a review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(11): 775-781. ISSN: 0975-1459.

Maldini, M., Maksoud, SA., Natella, F., Montoro, P., Petretto, GL., Foddai, M., De Nicola, GR., Chessa, M. y Pintore, G. (2014). *Moringa oleifera*: Study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9): 900-910. doi: 10.1002/jms.3437

Maldonado-Garcia, M., Angulo, C., Vazquez-Martinez, J., Sanchez, V., Lopez, MG. y Reyes-Becerril, M. (2019). Antioxidant and immunostimulant potentials of *Chenopodium ambrosioides* L. in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). *Aquaculture*, 513(May). doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734414

Marcos Filho, J. (2010). Sistema computadorizado de análise de imagens de plântulas (SVIS®) para avaliação do vigor de sementes. Work. Bras. sobre Control. Qual. Sementes, 20(3):40-44

Marfori, EC. (2010). Clonal micropropagation of *Moringa oleifera* L. *Philippine Agricultural Scientist*, 93(4): 454-457

Martínez, Y., Más, D., Betancur, C., Gebeyew, K., Adebowale, T., Hussain, T., Lan, W. y Ding, X. (2020). Role of the Phytochemical Compounds like Modulators in Gut Microbiota and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, 26(22): 2642-2656. doi: 10.2174/1381612826666200515132218

Massey, FJ. (1951). The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253): 68-78. doi: 10.1080/01621459.1951.10500769

Mathur, M., Yadav, S., Katariya, PK. y Kamal, R. (2014). *In vitro* propagation and biosynthesis of steroidal sapogenins from various morphogenetic stages of *Moringa oleifera* Lam., and their antioxidant potential. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7): 1749-1762. doi: 10.1007/s11738-014-1549-1

Matos-Ruiz, A., Capote-Betancourt, I., Pérez-Martínez, A., Pina-Morgado, D., Vives-Hernández, K., Daquinta-Gradaille, M. y Escalona-Morgado, M. (2016). Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales*, 37(especial): 49-56. doi: 10.13140/RG.2.1.1717.7202

Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1): 11-19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002

Miyashita, A., Sugiura, D., Sawakami, K., Ichihashi, R., Tani, T. y Tateno, M. (2012). Long-term, short-interval measurements of the frequency distributions of the photosynthetically active photon flux density and net assimilation rate of leaves in a cool-temperate forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, 152(1): 1-10. doi: 10.1016/j.agrformet.2011.08.001

Modarres, M., Esmaeilzadeh Bahabadi, S. y Taghavizadeh Yazdi, ME. (2018). Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. *Cytotechnology*, 70(2): 741-750. doi: 10.1007/s10616-017-0178-0

Montalbán, IA., Novák, O., Rolčik, J., Strnad, M. y Moncaleán, P. (2013). Endogenous cytokinin and auxin profiles during *in vitro* organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physiologia Plantarum*, 148(2): 214-231. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01709.x

Mora, JS. y Guacharná, N. (2015). El árbol milagroso: La *Moringa oleifera. Biodiversidad*

Colombia, 1(5): 45-58. ISSN: 2344-8539.

Moyo, B., Oyedemi, S., Masika, PJ. y Muchenje, V. (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Science*, 91(4): 441-447. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.02.029

Muhammad, MH., Idris, AL., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. y Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11(May): 1-20. doi: 10.3389/fmicb.2020.00928

Muhl, QE., Du Toit, ES. y Robbertse, PJ. (2011). Temperature effect on seed germination and seedling growth of *Moringa oleifera* Lam. *Seed Science and Technology*, 39(1): 208-213. doi: 10.15258/sst.2011.39.1.19

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid grownt and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 474-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Nadeem, SM., Ahmad, M., Zahir, ZA., Javaid, A. y Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2): 429-448. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.005

Nadirah, MNA., Awal, A., Azma, YN. y Sulaiman, A. (2019). POME: An Alternative Nutrient Source for Bio-Organic Plant Tissue Culture Media. IOP Publ. 327. doi:10.1088/1755-1315/327/1/012029

Naing, AH., Jeon, SM., Han, JS., Lim, SH., Lim, KB. y Kim, CK. (2014). Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. *Comptes Rendus - Biologies*, 337(6): 383-390. doi: 10.1016/j.crvi.2014.03.005

Nascimento de Almeida, G., Grazielly, L., Nascimento de Almeida, G., Rayron, J., José de Holanda, M. y Cristina, E. (2019). Desenvolvimento de mudas de *Moringa oleifera* submetidas a diferentes substratos. *Ciencia Agrícola*, 7(2): 846-848

Navarro, M., Cicero, SM. y Gomes, FG. (2015). Determinación de la temperatura de germinación de las semillas de *Moringa oleifera* con apoyo de las pruebas de vigor. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(4): 509-514. ISSN: 2079-3480.

Nelder, AJA. (1961). The Fitting of a Generalization of the Logistic Curve Published by : International Biometric Society Stable, 17(1): 89-110. doi.org/10.2307/2527498

Nieves, MC. y Aspuria, ET. (2011). Callus induction in cotyledons of *Moringa oleifera* Lam. *Philippine Agricultural Scientist*, 94(3): 239-247. ISSN 0031-7454.

Noda-Leyva, Y., Pérez-Vásquez, A. y Valdés-Rodríguez, OA. (2015). Establecimiento de tres especies de oleaginosas bajo asociación. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2): 323. doi: 10.15517/am.v26i2.19326

Noguera-Talavera, A., Reyes-Sánchez, N., Membreño, JJ., Duarte-Aguilar, C. y Mendieta-Araica, B. (2014). Calidad de plántulas de tres especies forrajeras (*Moringa oleifera* Lam., *Leucaena leucocephala* y *Cajanus cajan*) en condiciones de vivero. *La Calera*, 14(22): 21-27

Nolasco-Bethencourt, J. (2017). Bioestimulación: Rompiendo Paradigmas que Limitan la Producción Agrícola. In: Tradecorp México (Video de Youtube). Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=str4IW2z0_8. [Consulta: 19 noviembre 2021]

Nouman, W., Anwar, F., Gull, T., Newton, A., Rosa, E. y Domínguez-Perles, R. (2016). Profiling of polyphenolics, nutrients and antioxidant potential of germplasm's leaves from seven

cultivars of *Moringa oleifera* Lam. *Industrial Crops and Products*, 83: 166-176. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.032

Nowak, J. (1998). Benefits of in vitro «biotization» of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 34(2): 122-130. doi: 10.1007/BF02822776

Oburger, E. y Jones, DL. (2018). Sampling root exudates – Mission impossible? *Rhizosphere*, 6(June): 116-133. doi: 10.1016/j.rhisph.2018.06.004

Ochoa, MS., Pedraza, RM. y Martínez, M. (2010). Plantas , hongos micorrízicos y bacterias : su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1): 65-71

Olson, ME. (2002). Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of *Moringaceae* (*Brassicales*). *Systematic Botany*, 27(1): 55-73. doi: 10.1043/0363-6445-27.1.55

Olson, ME., Sankaran, RP., Fahey, JW., Grusak, MA., Odee, D. y Nouman, W. (2016). Leaf protein and mineral concentrations across the «Miracle tree» genus *Moringa*. *PLoS ONE*, 11(7). doi: 10.1371/journal.pone.0159782

Omar, MN., Osman, ME., Kasim, WA. y Salama, S. (2017). Characterization of Two Drought-Tolerant PGPB : *Azospirillum brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas maltophilia*. 46(2): 121-136. ISSN 2090-9233.

Orlikowska, T., Nowak, K. y Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3): 487-508. doi: 10.1007/s11240-016-1144-9

Osman, HE. y Abohassan, AA. (2012). Morphological and Analytical characterization of *Moringa peregrina* Populations In Western Saudi Arabia. *International Journal of Theoretical & Applied Sciences*, 4(2): 174-184. ISSN: 2249-3247.

Padayachee, B. y Baijnath, H. (2019). An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. South African J Bot. doi: 10.1016/j.sajb.2019.08.021

Padayachee, B. y Baijnath, H. (2020). An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. *South African Journal of Botany*, 129: 304-316. doi: 10.1016/j.sajb.2019.08.021

Palmgren, MG. (2001). Plant plasma memebrane H+-ATPasas: powerhoueses of nutrient uptake. *Annual review of plant physiology and molecular biology*, 52: 817-845. doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.817

Panche, AN., Diwan, AD. y Chandra, SR. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. doi: 10.1017/jns.2016.41

Peng, Z., Chen, M., Huang, Z., Zou, H., Qin, X., Yu, Y., Bao, Y., Zeng, S. y Mo, Q. (2021). Non-Structural Carbohydrates Regulated by Nitrogen and Phosphorus Fertilization Varied with Organs and Fertilizer Levels in *Moringa oleifera* Seedlings. *J Plant Growth Regul*. 40. 1777–1786 (2021). https://doi.org/10.1007/s00344-020-10228-8

Paradiso, R., Arena, C., De Micco, V., Giordano, M., Aronne, G. y De Pascale, S. (2017). Changes in leaf anatomical traits enhanced photosynthetic activity of soybean grown in hydroponics with plant growth-promoting microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 8(May): 1-13. doi: 10.3389/fpls.2017.00674

Pereira-Oliveira, KT., Assis deOliveira, F De., Gonçalves-Cavalcante, AL., De Paiva-Dantas, R., Teixeira de Oliveira, MK. y Barbosa de Medeiros Costa, JP. (2017). Qualidade de mudas de

Moringa sob diferentes níveis de nutrientes aplicados via fertirrigação. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 36(88): 497. doi: 10.4336/2016.pfb.36.88.1038

Perez-Rosales, E., Alcaraz-Meléndez, L., Puente, ME., Vázquez-Juárez, R., Zenteno-Savín, T. y Morales-Bojórquez, E. (2018). Endophytic bacteria isolated from wild jojoba [*Simmondsia chinensis* L. (Schneider)] roots improve *in vitro* propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135(3): 515-522. doi: 10.1007/s11240-018-1483-9

Perez, E. (2017). Micropropagación y biotización de Jojoba (*Simmondsia chinensis* L. [Scheider]) mediante bacterias endófitas promotoras de crecimiento vegetal. : 114Disponible en: http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/556

Phillips, G. (1988). Developmental models for the expression of totipotency and plant regeneration *in vitro*. *SAAS Bulletin: Biochemistry and Biotechnology*,1: 12-16.

Phillips, GC. y Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology - *Plant*, 55(3): 242-257. doi: 10.1007/s11627-019-09983-5

Pieruschka, R., Schurr, U. y Jahnke, S. (2005). Lateral gas diffusion inside leaves. *Journal of Experimental Botany*, 56(413): 857-864. doi: 10.1093/jxb/eri072

Pieterse, CMJ., Van Pelt, JA., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, MJ., Buchala, AJ., Métraux, JP. y Van Loon, LC. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3): 123-134. doi: 10.1006/pmpp.2000.0291

Pillay, V. y Nowak, J. (1997). Inoculum density, temperature and genotype effects on epiphytic and endophytic colonization and *in vitro* growth promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by a *Pseudomonas* bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 354-361

Poothong, S., Khen, T. y Chumphukam, O. (2018). *In vitro* mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia. *Agriculture and Natural Resources*, 52(5): 477-483. doi: 10.1016/j.anres.2018.11.007

Popov, IN. y Lewin, G. (2013). Antioxidative system of the organism and thermo-initiated chemiluminescence method for quantitative evaluation of its state. *Biophysics (Russian Federation)*, 58(5): 669-675. doi: 10.1134/S0006350913050138

Qian, Y., Zhang, S., Yao, S., Xia, J., Li, Y., Dai, X., Wang, W., Jiang, X., Liu, Y., Li, M., Gao, L. y Xia, T. (2018). Effects of vitro sucrose on quality components of tea plants (*Camellia sinensis*) based on transcriptomic and metabolic analysis. *BMC Plant Biology*, 18(1): 1-20. doi: 10.1186/s12870-018-1335-0

Ranal, MA. y De Santana, DG. (2006). How and why to measure the germination process? *Revista Brasileira de Botanica*, 29(1): 1-11. doi: 10.1590/S0100-84042006000100002

Reol, EM. (2012). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 1(2003): 11

Reyes-Becerril, M., Angulo, C., Sanchez, V., Vázquez-Martínez, J. y López, MG. (2019a). Antioxidant, intestinal immune status and anti-inflammatory potential of Chenopodium ambrosioides L. in fish: *In vitro* and *in vivo* studies. *Fish and Shellfish Immunology*, 86(October 2018): 420-428. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.059

Reyes-Becerril, M., Martínez-Preciado, A., Guluarte, C., Guerra, K., Tovar-Ramirez, D., Macias,

ME. y Angulo, C. (2019b). Phytochemical composition and immunobiological activity of *Hawthorn crataegus* mexicana nanoencapsulated in Longfin yellowtail *Seriola rivoliana* leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 92(May): 308-314. doi: 10.1016/j.fsi.2019.06.024

Rezaei-Chiyaneh, E., Amirnia, R., Amani Machiani, M., Javanmard, A., Maggi, F. y Morshedloo, MR. (2020). Intercropping fennel (*Foeniculum vulgare* L.) with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by PGPR inoculation: A strategy for improving yield, essential oil and fatty acid composition. *Scientia Horticulturae*, 261(September 2019): 108951. doi: 10.1016/j.scienta.2019.108951

Ridzuan, NI., Abdullah, N., Vun, YL. y Supramaniam, C V. (2020). Micropropagation and defence enzymes assessment of *Moringa oleifera* L. plantlets using nodal segments as explant. *South African Journal of Botany*, 129: 56-61. doi: 10.1016/j.sajb.2018.12.010

Ríos, N., Prolo, C., Álvarez, MN., Piacenza, L. y Radi, R. (2017). Peroxynitrite Formation and Detection in Living Cells. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology: Third Edition*, : 271-288. doi: 10.1016/B978-0-12-804273-1.00021-1

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. y Jones, JDG. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49: 317-343. doi: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447

Romero, AM., Vega, D. y Correa, OS. (2014). *Azospirillum brasilense* mitigates water stress imposed by a vascular disease by increasing xylem vessel area and stem hydraulic conductivity in tomato. *Applied Soil Ecology*, 82: 38-43. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.05.010

Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J. y Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). doi: 10.3390/ijms20102479

Rubluo, A., Kartha, KK., Mroginski, LA. y Dyck, J. (1984). Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultured *in vitro* and Genetic Stability of Regenerants. *Journal of Plant Physiology*, 117(2): 119-130. doi: 10.1016/S0176-1617(84)80024-3

Ruiz, A., Mercado, M., Guantay, M. y Ponessa, G. (2019). Anatomía e histoquímica foliar y caulinar de *Moringa oleifera* (*Moringaceae*). *Bol Soc Argent Bot*, 54: 325-343. doi: http://dx.doi. org/10.31055/1851.2372.v54. n3.25357

Ruiz, AM., Betancourt, IC., Martínez, AP., Más, YL., Abreu, CEA. y Morgado, DP. (2016). Propagación *in vitro* de cultivares de *Moringa oleifera* Lam. *Cultivos Tropicales*, 37: 49-56. doi: 10.1234/ct.v37i5

Rubio-Sanz, L., Garzón-Molina, M., Arnés-García, M. y Jaizme-Vega, MC. (2020). Optimización del desarrollo, nutrición y producción de semillas de *Moringa oleifera* mediante el uso de micorrizas bajo manejo agroecológico. *Agroecología.*14(1): 81-90.

Saad, AIM. y Elshahed, AM. (2012). Plant Tissue Culture Media. En: Leva A, Rinaldi L (eds) Recent Advances in Plant *in vitro* Culture, IntechOpen ed. IntechOpen, pp 137-144

Sahakitpichan, P., Mahidol, C., Disadee, W., Ruchirawat, S. y Kanchanapoom, T. (2011). Unusual glycosides of pyrrole alkaloid and 4'-hydroxyphenylethanamide from leaves of *Moringa oleifera*. *Phytochemistry*, 72(8): 791-795. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.021

Saini, RK., Shetty, NP., Giridhar, P. y Ravishankar, GA. (2012). Rapid *in vitro* regeneration method for *Moringa oleifera* and performance evaluation of field grown nutritionally enriched tissue cultured plants. *3 Biotech*, 2(3): 187-192. doi: 10.1007/s13205-012-0045-9

Salama, MA. (2014). Morpho-anatomical variations of leaves and seeds among three *Moringa*

species. *Life Science Journal*, 11(10): 827-832. (ISSN:1097-8135). http://www.lifesciencesite.com.

Sati, D., Pande, V., Chandra-Oandey, S. y Samant, M. (2021). Recent advances in PGPR and molecular mechanisms involved in drought stress tolerance Diksha. *Preprint*, : 1-26. doi: 10.20944/preprints202105.0331.v1

Shabaev, VP., Olyunina, LN. y Smolin, VY. (1999). Functional activity of maize roots after inoculation with growth-promoting rhizosphere bacteria *Pseudomonas*. *Biology bulletin-Russian Academic of Sicience*, 26: 30-35

Sharry, SE., Adema, M. y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. ISBN: 978-950-34-1254-1

Shilev, S. (2020). Plant-growth-promoting bacteria mitigating soil salinity stress in plants. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(20): 1-20. doi: 10.3390/app10207326

Sies, H. y Reichert, AS. (2019). Selectively Addressing Mitochondrial Glutathione and Thioredoxin Redox Systems. *Cell Chemical Biology*, 26(3): 316-318. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.02.017

Singh, AK., Rana, HK., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhlala, AR. y Pandey, AK. (2019). Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. South African J Bot. doi: 10.1016/j.sajb.2019.06.017

Singh, BN., Singh, BR., Singh, RL., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G. y Singh, HB. (2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6): 1109-1116. doi: 10.1016/j.fct.2009.01.034

Sreelatha, S. y Padma, PR. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4): 303-311. doi: 10.1007/s11130-009-0141-0

Subramanian, S. y Smith, DL. (2015). Bacteriocins from the rhizosphere microbiome – From an agriculture perspective. *Frontiers in Plant Science*, 6(OCTOBER): 1-7. doi: 10.3389/fpls.2015.00909

Stephenson, KK. y Fahey, JW. (2004) Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. *Econ Bot* 58, S116–S124. https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)58[S116:DOTCMF]2.0.CO;2

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal I. , III ed. Sunderland. ISBN: 978-84-8021-600-5

Teixeira, EMB., Carvalho, MRB., Neves, VA., Silva, MA. y Arantes-Pereira, L. (2014). Chemical characteristics and fractionation of proteins from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Food Chemistry*, 147: 51-54. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.135

Tien, TM., Gaskins, MH. y Hubbell, DH. (1979). Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and environmental microbiology*, 37(5): 1016-24. doi:10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979

Timmusk, S. y Wagner, EGH. (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11): 951-959. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.11.951

Torres, V., López, V. y Noda, A. (1993). Example for application o multivariate tecniques in different stages of the evaluation and secreening of pastures speies. Multivariate analysis

of variance. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 27: 247

Torronen R; Hakkinen, S; Karenlampis; Mykkanen-Halink, GM. (Editor); Bueno, DMHB (Editor); VPG (Editor); JWMF (Editor). (1997). Flavonoids and phenolic acids in selected berries. Cancer Lett.

Tounekti, T., Hernández, I. y Munné-Bosch, S. (1995). Salicylic Acid Biosynthesis and Role in Modulating Terpenoid and Flavonoid Metabolism in Plant Responses to Abiotic Stress. En: Shamsul H, Ahmad A, Nasser-Alyemeni M (eds) Salicylic Acid. Plant growth and development, Edition. NewYork, USA, pp 1040-1042

Vaishnak, A. y Kumar-Coudhary, D. (2021). Microbial Polymers. Applications and Ecological perspectives. , 1rs ed. India. ISBN: 9789811600456. doi: 10.1007/978-981-16-0045-6

Valdés-Rodríguez, OA., Muñoz-Gamboa, C., Pérez-Vázquez, A. y Martínez-Pacheco, LE. (2014). Análisis y ajuste de curvas de crecimiento de *Moringa oleifera* Lam. en diferentes ustratos. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 2(2): 66-70. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

Valdés-Rodríguez, OA., Pérez-Vázquez, A. y Muñoz-Gamboa, C. (2018). Efecto de peso y talla de semilla sobre plántulas de *Moringa* y *Ricinus*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(7): 1411-1422. doi: 10.29312/remexca.v9i7.734

Valdés Rodríguez, OA., Palacios Wassenaar, OM., Ruíz Hernández, R. y Pérez Vásquez, A. (2018). Potencial de la asociación *Moringa* y *Ricinus* en el subtrópico veracruzano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (9): 1673-1686. doi: 10.29312/remexca.v0i9.1056

Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 446: 88-96. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.014

Van Wees, SCM., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, LC. y Pieterse, CMJ. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but. *Plant Molecular Biology*, 41: 537-549. Disponible en: http://link.springer.com/article/10.1023/A:1006319216982

Vardharajula, S., Ali, SZ., Grover, M., Reddy, G. y Bandi, V. (2011). Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp*.: Effect on growth,osmol ytes,and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(1): 1-14. doi: 10.1080/17429145.2010.535178

Verma, N., Singh, H., Khanna, D., Rana, PS. y Bhadada, SK. (2019). Classification of drug molecules for oxidative stress signalling pathway. *IET Systems Biology*, 13(5): 243-250. doi: 10.1049/iet-syb.2018.5078

Vicent-Gil, J. y Fernandez-Espinar, M. (2016). Los antioxidantes de la dieta y su relación con la salud. I. Universidad Miguel Hernández de Elche (Video de Yotube). Disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=npq7MybiZbA. [Consulta: 10 de octubre de 2020].

Vidussi, F., Claustre, H., Bustillos-Guzmàn, J., Cailliau, C. y Marty, JC. (1996). Short communication: Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: Separation of chlorophyll a from divinylchlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research*, 18(12): 2377-2382. doi: 10.1093/plankt/18.12.2377

Villalón, H., Ramos, JC., Vega, BM. y Muños, MA. (2016). Indicadores de calidad de la planta de *Quercus canby* Trel . (encino) en vivero forestal. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 12(1): 46-52

Villar, R., Ruiz-Robleto, J., Quero, JL., Poorter, H., Valladares, F. y Marañón, T. (2004). Tasas de

crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Valadares F (ed) Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, 2°. Organi ed. AGRAF, S.A, pp 191-227

Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y. y Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44: 566-571. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.09.021

Xiao, J. (2016). Phytochemicals in Food and Nutrition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(November): S1-S3. doi: 10.1080/10408398.2015.1111074

Yamaner, O. y Erdag, B. (2013). Effects of sucrose and polyethylene glycol on hypericins content in *Hypericum adenotrichum*. *EurAsian Journal of BioSciences*, 7(December): 101-110. doi: 10.5053/ejobios.2013.7.0.12

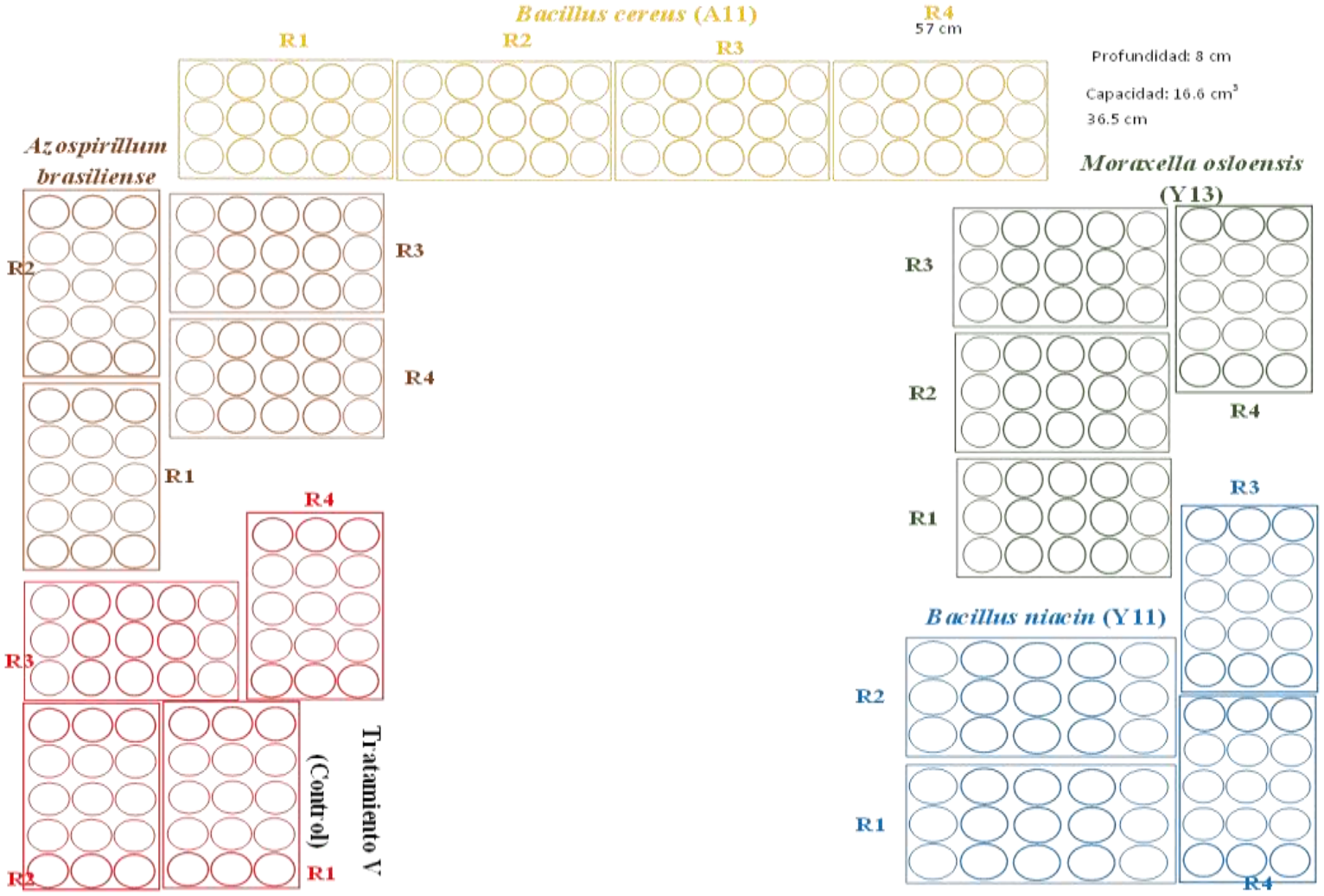
Yue, W., Ming, QL., Lin, B., Rahman, K., Zheng, CJ., Han, T. y Qin, LP. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2): 215-232. doi: 10.3109/07388551.2014.923986

Zayed, MS. (2012). Improvement of growth and nutritional quality of *Moringa oleifera* using different biofertilizers. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(1): 53-62. doi: 10.1016/j.aoas.2012.03.004

Zhang, C., Fu, S., Tang, G., Hu, X. y Guo, J. (2013). Factors influencing direct shoot regeneration from mature leaves of *Jatropha curcas*, an important biofuel plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(5): 529-540. doi: 10.1007/s11627-013-9530-z

Zhang, J., van Aartsen, JJ., Jiang, X., Shao, Y., Tai, C., He, X., Tan, Z., Deng, Z., Jia, S., Rajakumar, K. y Ou, H. (2011). Expansion of the known *Klebsiella pneumoniae* species gene pool by characterization of novel alien DNA islands integrated into tmRNA gene sites. *Journal of Microbiological Methods*, 84(2): 283-289. doi: 10.1016/j.mimet.2010.12.016

Zheng, Y., Zhang, Y. y Wu, J. (2016). Yield and quality of *Moringa oleifera* under different planting densities and cutting heights in southwest China. *Industrial Crops and Products*, 91: 88-96. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.06.032

11. ANEXOS

Anexo A. Croquis del experimento de 45 días con bacterias promotoras del crecimiento. (Diseño completamente aleatorizado).