



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE  
MAÍZ Y ASOCIADAS A *Melipona  
beecheii***

**ÁNGEL MENA GARCÍA**

**T E S I S**  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2020**

La presente tesis titulada: **Potencial biotecnológico de bacterias de la rizósfera de maíz y asociadas a *Melipona beecheii***, realizada por el alumno ÁNGEL MENA GARCÍA bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR (A)



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR (A)



DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2020

La presente Tesis: **“POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE MAÍZ Y ASOCIADAS A *Melipona beecheii* ”**, fue financiada por el proyecto CONACYT 257847 **“DIVERSIDAD DE MELIPONINOS, ESTUDIO DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS Y ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE SUS PRODUCTOS”**.

# POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE MAÍZ Y ASOCIADAS A *Melipona beecheii*

Ángel Mena García, MC.  
Colegio de Postgraduados, 2020

## RESUMEN

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son un grupo de microorganismos benéficos que favorecen el desarrollo de las plantas y que, en los últimos años, se han utilizado en la agricultura para la producción más amigable con el ambiente. La fuente de obtención de estas bacterias es el suelo y, específicamente, la rizosfera; pero pueden tener otros orígenes. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el potencial biotecnológico de bacterias de la rizosfera de maíz y asociadas a la abeja sin aguijón, *Melipona beecheii*. Se aislaron bacterias y se determinó la capacidad de fijar N atmosférico, solubilizar fosfatos y producir indoles y sideróforos. Las cepas seleccionadas aisladas de maíz y de *M. beecheii* se inocularon en maíz y lechuga cv. Parris island en condiciones de invernadero. Además, se determinó la inducción de la germinación in vitro en semillas de lechuga. Por último, se comparó el efecto de tres cepas y sus filtrados en la promoción del crecimiento de maíz cultivado in vitro. En total, se aislaron 21 cepas de la rizosfera de maíz y 26 de la abeja *M. beecheii*. En invernadero, con maíz hubo un incremento en el desarrollo radical de las plantas que se inocularon con la cepa NF4, PM9, AI2 y AI8. Las bacterias asociadas a *M. beecheii* resultaron más eficientes en el crecimiento de lechuga que las provenientes de la rizosfera de maíz. El peso fresco, peso seco aéreo y área foliar de plantas de lechuga mejoró por la inoculación bacteriana, ya que incrementó el peso fresco hasta 61% y el área foliar hasta 58%, mientras que en la germinación no hubo efectos. Los filtrados de cultivos bacterianos promovieron más el peso seco radical en comparación con las bacterias inoculadas a maíz in vitro. Por lo anterior, se concluyó que las bacterias presentes en abejas sin aguijón, *M. beecheii*, tienen un uso biotecnológico agrícola potencial que debe ser considerado en la generación de biofertilizantes.

**Palabras clave:** Filtrados bacterianos, ácido indol acético, fijación de nitrógeno, lechuga, maíz.

**BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF CORN-RHIZOSPHERE AND *Melipona  
beecheii*-ASSOCIATED BACTERIA**

**Ángel Mena García, MC.  
Colegio de Postgraduados, 2020**

**ABSTRACT**

Plant growth promoting bacteria are a group of beneficial microorganisms which help plant development and that, in last years, have been used in agriculture for more environmentally friendly production. The origin of these, is the soil and in specific, the rhizosphere, but they may be obtained from another places. Objective of this investigation was to evaluate the biotechnological potential of corn rhizosphere bacteria and bacteria associated with the stingless bee, *Melipona beecheii*. Bacteria were isolated from corn rhizosphere and the ability to fix atmospheric nitrogen, solubilize inorganic phosphate and produce indol acetic acid and siderophore were determined. Selected isolates strains from corn and *M. beecheii* were inoculated on Corn and Lettuce cv. Parris Island under Greenhouse conditions. Furthermore, induction of Lettuce germination *in vitro* was tested. Finally, the effect of three strains and their filtrates were compared on the growth promotion of corn *in vitro*. In total, 21 strains from corn rhizosphere and 26 from *M. beecheii* were isolated. Under Greenhouse, corn plants increased the root development when were inoculated with the NF4, PM9, AI2 and AI8 strains. Bacteria associated with *M. beecheii* were more effective than corn rhizosphere bacteria on Lettuce growth. Fresh weight, shoot dry weight and leaf area of lettuce plants were enhanced by bacterial inoculation, inasmuch as fresh weight was increased up to 61% and leaf area up to 58% when the lettuce plants were inoculated, while there were no effects on seed germination. *In vitro* corn plants inoculated with bacterial culture filtrates showed a maximum increase in root dry weight compared to cell inoculated plants. Therefore, it was concluded that the bacteria present in stingless bee, *M. beecheii*, have agricultural biotechnological potential that must be considered on biofertilizers production.

**Keywords:** Bacterial culture filtrates, indole acetic acid, nitrogen fixation, lettuce, corn.

## **DEDICATORIA**

Con dedicatoria especial y todo el cariño a mamá, por ser la persona más importante en mi vida y el pilar principal de cada uno de mis logros, por el apoyo incondicional, por contagiarme de fortaleza y compartir su amor y grado de responsabilidad para formarme como alguien persistente en el cumplimiento de mis objetivos; gracias por tus abrazos, por tus palabras y por tu cariño, gracias por todo lo indescriptible.

A mi hermana Janet por la comunicación constante conmigo, por motivarme, visitarme durante esta etapa y por sus consejos que me forman en mi vida académica y profesional; gracias por la complicidad constante y el cariño mutuo.

A mi papá por el apoyo y los consejos brindados en los momentos difíciles.

A mi familia en general, a mis hermanos, por hacerme sentir como en casa aun estando lejos de ellos.

## AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por aprobar la recepción de mí persona en Licenciatura y en Maestría.

Al área de Microbiología de Suelos por el ambiente laboral, la convivencia y la armonía dentro de la zona de trabajo.

A mis amigos y amigas del Laboratorio de Microbiología por hacer más ameno el tiempo del curso de la Maestría.

Agradezco a los miembros de mi comité en general, por las facilidades, el apoyo, el tiempo, la disposición y cada una de las atenciones prestadas para lograr el trabajo de investigación y por aportar con sus consejos en el ámbito personal y profesional.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por el tiempo brindado desde mi estancia de Licenciatura; por fungir como mi consejero durante la maestría y por guiarme y apoyarme en la investigación y en los procesos administrativos.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por su amistad, su tiempo, su preocupación por quienes formamos parte de su plantilla, pero sobre todo, por sus consejos incondicionales hacia mí.

A mi Mamá y a mi Hermana por la preocupación y comunicación constante conmigo; gracias por mostrarme apoyo durante los momentos difíciles, por su comprensión, motivación y en específico por sus palabras, consejos y amor incondicional.

Al CONACYT por el financiamiento de mi beca y para la realización de este trabajo de investigación.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>4</b>
2.1 Objetivo General.....	4
2.1.1 Objetivos Específicos.....	4
2.2 Hipótesis General.....	5
2.2.1 Hipótesis Específicas.....	5
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
3.1 La población mundial y la creciente demanda de alimentos .....	6
3.2 Revolución verde .....	7
3.3 Biofertilizantes.....	8
3.4 Rizósfera .....	9
3.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).....	11
3.5.1 Bacterias productoras de ACC desaminasa.....	13
3.5.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico .....	14
3.5.3 Bacterias productoras de índoles.....	16

3.5.4 Bacterias productoras de sideróforos .....	18
3.5.5 Bacterias solubilizadoras de fosfatos .....	20
3.6 Generalidades del género <i>Melipona</i> .....	23
3.6.1 La convivencia de <i>M. beecheii</i> con microorganismos.....	24
3.7 El cultivo de maíz ( <i>Zea mays</i> L.): Generalidades e importancia .....	26
3.8 Generalidades del cultivo de lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> L.).....	27
3.8.1 Importancia del cultivo de lechuga .....	28
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Muestreo .....	30
4.2 Aislamiento de bacterias con rasgos promotores del crecimiento vegetal .....	30
4.2.1 Bacterias con ACC desaminasa.....	30
4.2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico .....	31
4.2.3 Bacterias productoras de indoles (ensayo cualitativo) .....	31
4.2.4 Bacterias solubilizadoras de fosfatos .....	32
4.3 Ensayo cualitativo de producción de sideróforos .....	32
4.4 Ensayos cuantitativos.....	32
4.4.1 Cuantificación de ácido indol acético .....	32
4.4.2 Cuantificación de fosfatos solubilizados.....	33
4.5 Efecto de la inoculación de BPCV en el crecimiento de maíz .....	35
4.5.1 Diseño experimental.....	35
4.5.2 Preparación de sustrato y germinación de semillas.....	35

4.5.3 Inoculación.....	35
4.6 Inoculación de BPCV y sus filtrados en el desarrollo radical <i>in vitro</i> .....	36
4.6.1 Obtención de plántulas.....	36
4.6.2 Inoculación de plántulas.....	37
4.7. Potencial biotecnológico de BPCV asociadas a <i>M. becheei</i> y rizosfera de maíz en lechuga ( <i>L. sativa</i> ).....	37
4.7.1 Ensayo de inducción de la germinación en lechuga.....	38
4.7.2 Inoculación de cepas y su efecto en el crecimiento de lechuga.....	38
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
5.1 Aislamiento de bacterias con atributos de promoción del crecimiento vegetal.....	40
5.2 Pruebas bioquímicas de promoción del crecimiento vegetal.....	40
5.2.1 Ensayo cualitativo detección de sideróforos.....	40
5.2.2 Ensayo cuantitativo de solubilización de fosfato.....	43
5.2.3 Cuantificación de AIA de bacterias.....	47
5.3. Clave cepa e identificación molecular de bacterias aisladas de <i>M. becheei</i> . .....	49
5.4 Efecto de la inoculación de bacterias en el crecimiento de maíz.....	49
5.4.1 Inoculación con cepas de la rizosfera de maíz y de <i>M. becheei</i> . .....	49
5.5 Ensayo <i>in vitro</i> de filtrados bacterianos en maíz.....	52
5.6 Efecto de la inoculación de bacterias en lechuga.....	54
5.6.1 Influencia de la inoculación bacteriana en el peso fresco.....	54
5.6.2 Influencia de la inoculación bacteriana en el área foliar.....	55

5.6.3 Influencia de la inoculación bacteriana en el peso seco .....	58
5.7 Ensayo de germinación.....	59
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>70</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
Curva patrón fosfato .....	96
Curva patrón indol .....	96

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Clave de cepas aisladas y pruebas bioquímicas de atributos de promoción del crecimiento <i>in vitro</i> .....	41
<b>Cuadro 2.</b> Bacterias asociadas a <i>M. becheii</i> de la colección del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados y su capacidad de producir AIA. ....	50
<b>Cuadro 3.</b> Efecto de la inoculación de las cepas rizosféricas en la altura y peso seco de maíz. ....	66
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la inoculación de las cepas aisladas de <i>M. becheii</i> en la altura y peso seco de maíz. ....	67
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de la inoculación de las cepas rizosféricas y aisladas de <i>M. becheii</i> en el peso fresco, área foliar y peso seco de lechuga. ....	68
<b>Cuadro 6.</b> Requerimientos de medio de cultivo pikovskaya líquido y solución stock para preparar curva estándar de fosfato.....	97
<b>Cuadro 7.</b> Requerimientos de medio de cultivo LB líquido y solución stock para preparar curva estándar de indol. ....	97

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Ecuación de la recta obtenida a partir de las concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (curva patrón ácido indol acético). .....	33
<b>Figura 2.</b> Ecuación de la recta obtenida a partir de la concentración de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de $\text{PO}_4$ soluble (curva patrón fosfato). .....	34
<b>Figura 3.</b> Producción de sideróforos por las diferentes cepas. ....	42
<b>Figura 4.</b> Solubilización de fosfato tricálcico por cepas aisladas de la rizosfera de maíz. ....	44
<b>Figura 5.</b> Ensayo en placa-viraje amarillo por la solubilización de fosfato tricálcico. ....	44
<b>Figura 6.</b> Bacterias aisladas de rizosfera de maíz en medio de cultivo Pikovskaya con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. Etiquetadas de PM1 A PM7. P: Pikovskaya, M: Maíz. ....	45
<b>Figura 7.</b> Bacterias aisladas de la rizosfera de maíz, con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico en medio de cultivo Pikovskaya. ....	46
<b>Figura 8.</b> Producción de ácido indol acético (AIA) a las 48 h por bacterias aisladas de rizosfera de maíz. ....	48
<b>Figura 9.</b> Ensayo colorimétrico de producción de AIA de algunas cepas aisladas de rizosfera de maíz. 1) Blanco (medio de cultivo LB), 2) AI15, 3) AI8, 4) 2AR1B, 5) NF4, 6) AI2, 7) ACC2. ....	49
<b>Figura 10.</b> Efecto de bacterias aisladas de la rizosfera en la altura de maíz. Tratamientos nombrados por la clave cepa. T: Testigo. ....	51

<b>Figura 11.</b> Efecto de bacterias asociadas a <i>M.beecheii</i> en la altura de maíz. Tratamientos nombrados por la clave cepa. T: Testigo.....	51
<b>Figura 12.</b> Peso seco radical de plantas de maíz sin inoculación e inoculadas <i>in vitro</i> con células de las cepas AI8, NF4 y PM9 o sus filtrados AI8F, NF4F y PM9F. Letras diferentes sobre el tratamiento indican diferencias significativas (Tukey $\alpha=0.05$ ).....	53
<b>Figura 13.</b> Efectos negativos de la inoculación en semillas de lechuga. Vista es caja Petri PM3 (A), AI15 (B), testigo (C), vista en estereoscopio PM3 (A1), AI15 (B1) y testigo (C1).....	62
<b>Figura 14.</b> Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en maíz de las cepas aisladas de la rizosfera de Maíz.....	63
<b>Figura 15.</b> Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en maíz por las cepas aisladas de <i>M. beeecheii</i> .....	64
<b>Figura 16.</b> Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en lechuga provocado por las cepas aisladas de la rizosfera de maíz y <i>M.beecheii</i> .....	65

## I. INTRODUCCIÓN

La población humana no cesa en su crecimiento y, por lo tanto, tampoco deja crecer la demanda mundial de alimentos. Por esto, existe una necesidad imperiosa por generar tecnologías agrícolas que aumenten la producción de cultivos de todo tipo. Claro está, no a cualquier precio. Esto implica no causar degradación del suelo, contaminación del agua y, en general, producir alimentos de manera amigable con el medio ambiente. Una de las biotecnologías agrícolas de mayor potencial a nivel mundial, se basa en el uso de microorganismos benéficos del suelo o sus metabolitos secundarios, para elaborar productos de valor agregado para el hombre, en formulaciones conocidas como biofertilizantes (Rashid y Hakeem, 2016).

En México, la agricultura ha avanzado de manera lenta, lo que ha generado la necesidad de “una agricultura basada en el conocimiento” para potencializar el desarrollo agrícola en un país en el que la población crece a tasas aceleradas. Después de que la revolución verde apoyada por el uso de cultivares mejorados, el monocultivo y la aplicación de gran cantidad de insumos (maquinaria agrícola sofisticada, sistemas de riego, diversos pesticidas y fertilizantes químicos) se consideró como la solución para la aumentar la productividad agrícola, los productores se hicieron cada vez más dependientes de los agroquímicos; especialmente en los países pobres. La revolución verde provocó grandes aumentos en la producción de alimentos y contrarrestó a las hambrunas en muchos países; pero también provocó efectos negativos en el medio ambiente (Mahdi *et al.*, 2010); como contaminación del suelo, las lagunas y los mantos acuíferos subterráneos con plaguicidas y fertilizantes químicos. Además, estos fertilizantes son cada vez más caros y poco accesibles para los agricultores. La biotecnología agrícola es una de las múltiples herramientas con las que se

cuenta para producir alimentos a menores costos y las posibilidades que ofrece son muy amplias. Sobre todo respecto al cuidado y preservación del ambiente y la biodiversidad, lo que hace que las actividades agrícolas puedan ser rentables y sostenibles (Carcaño-Montiel y López-Reyes, 2015).

El desarrollo de biotecnologías para incrementar la producción agrícola está aumentando en todas partes del mundo y, dentro de ellas, la producción de inoculantes bacterianos o biofertilizantes puede ser una mejor opción que los fertilizantes químicos, tanto para aumentar la producción agrícola como para procurar la sostenibilidad ambiental (Bashan y De Bashan, 2015). Un biofertilizante o inoculante bacteriano es un concentrado de bacterias benéficas para las plantas, constituido de uno, dos o más organismos (de una sola cepa, especie o multiespecífico), con facilidad de uso, indicado para aplicar durante la siembra o el trasplante, dosificado en un soporte económico (orgánico, inorgánico o sintético), que se aplica directamente al suelo o a la semilla, y mejora el desarrollo del cultivo (Pandit, 2016). Los microorganismos que componen los biofertilizantes o inoculantes, colonizan la rizosfera o el interior de la planta promoviendo su crecimiento, ya sea por incrementar el suministro o la disponibilidad de los nutrimentos esenciales o por otros mecanismos que favorecen el crecimiento vegetal (Rashid y Hakeem, 2016).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV o PGPR, por sus siglas en inglés) son componentes comunes en los biofertilizantes. Las plantas exudan diversos compuestos en sus raíces (azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, etc.), los cuales son útiles en el desarrollo de una enorme comunidad de microorganismos. Las BPCV aprovechan estos exudados radicales y se desarrollan con éxito en la rizosfera y rizoplano de las plantas. Las BPCV establecen relaciones benéficas con las plantas y de esta manera evitan

la competencia con la microbiota total del suelo (Camelo-Rusinque *et al.*, 2011). Las BPCV son habitantes del suelo y su función está directa o indirectamente relacionada con el crecimiento de las plantas; ya sea por la producción y secreción de compuestos químicos en la cercanía de la raíz, fijación de N atmosférico, solubilización de formas insolubles de P, disminución de los efectos negativos de fitopatógenos, entre otra más (Fererra-Cerrato *et al.*, 2016). Con base en lo anterior, es precisamente el suelo, y el suelo rizosférico, la fuente primaria de aquellos microorganismos que pueden ser útiles en los procesos de producción de biofertilizantes. Sin embargo, es posible buscar en otros ambientes a los microorganismos con potencial biotecnológico encaminados a mejorar la productividad agrícola. Por ejemplo, Pineda-Mendoza *et al.* (2019) encontraron las BPCV para chile Serrano (*Capsicum annuum* L.), en esporomas del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor*.

Por otro lado, las abejas sin aguijón del género *Melipona* se componen de al menos 50 especies con una talla de 8 a 15 cm en su etapa adulta, en su mayoría con cuerpo hirsuto y que habitan en las selvas tropicales de América, desde Argentina hasta México. Este tipo de insectos sociales exhiben una fuerte diferenciación sexual en cuanto a su función en la colmena. Del mismo modo que en las abejas europeas, las meliponas tienen la habilidad de indicar, a los otros integrantes de su comunidad, los sitios de mayor oferta de alimentos (Ramírez *et al.*, 2010). Debido a este comportamiento, las meliponas son consideradas como dispersoras de microorganismos; pero no hay registros de su capacidad de diseminar BPCV. Por lo anterior, se planteó el presente estudio con los objetivos centrales de aislar BPCV de suelo rizosférico de maíz; identificar sus características benéficas en la promoción de crecimiento a través de pruebas *in vitro* y comprobar el efecto de los aislamientos y de bacterias asociadas a *M. beecheii* en el crecimiento de maíz y de lechuga en invernadero.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo General

- Evaluar el potencial biotecnológico de bacterias de la rizósfera de maíz (*Zea mays* L.) y asociadas al cuerpo de *Melipona beecheii* como promotoras del crecimiento vegetal en lechuga y maíz.

#### 2.1.1 Objetivos Específicos

- Aislar bacterias que promueven el crecimiento vegetal a partir de la rizósfera de maíz (*Zea mays* L.).
- Determinar los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal que poseen las bacterias aisladas de la rizósfera de maíz.
- Evaluar el efecto de las cepas aisladas de la rizósfera de maíz y asociadas a *M. beecheii* en el crecimiento de maíz y lechuga cultivados en invernadero.
- Evaluar la promoción del crecimiento radical de maíz en cultivo *in vitro* por algunas cepas aisladas de la rizósfera de maíz y filtrados del cultivo de estas.
- Identificar el efecto de las cepas asociadas a maíz y aisladas de *M. beecheii*, en la germinación *in vitro* de semillas de lechuga.

## 2.2 Hipótesis General

- Las bacterias de la rizósfera de maíz y asociadas a *M. becheii* tienen potencial biotecnológico como promotoras del crecimiento de lechuga y maíz.

### 2.2.1 Hipótesis Específicas

- Bacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal se encuentran en la rizósfera de maíz.
- Las bacterias de la rizósfera de maíz poseen mecanismos por los cuales se promueve el crecimiento vegetal en plantas.
- Las bacterias aisladas de la rizósfera de maíz y asociadas a *M. becheii* promueven el crecimiento de maíz y lechuga en invernadero.
- La promoción del crecimiento radical de maíz en cultivo *in vitro* es mayor debido a los filtrados de las cepas aisladas de la rizósfera de maíz que debido a las bacterias.
- Las bacterias no inducen la germinación de lechuga *in vitro*.

### **III. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1 La población mundial y la creciente demanda de alimentos**

Pocos son los países que tiene control de la natalidad en el mundo, debido a esto la población humana sigue creciendo. Se estima que para el año 2100 seremos más de 11 mil millones de personas las que habitemos el planeta. El aumento demográfico se va a presentar principalmente en países poco desarrollados, incluyendo el sur y oeste de Asia y África. Caso contrario sucederá en los países desarrollados (Bongaarts, 2016).

La elevada tasa de natalidad conlleva a enfrentar diversas problemáticas, sociales, políticas, económicas y ambientales. A medida que existe expansión de la población, también lo hace la pobreza, la carencia de empleos y sobre todo, la necesidad de explotar los recursos naturales, y con ello la reducción de la biodiversidad. La escases de recursos vitales, como el agua, será cada vez más notoria, al igual que la contaminación del ambiente y el deterioro de la calidad de vida (Bongaarts, 2016). Una de las preocupaciones más destacadas que causará la urbanización en algunos países es la degradación de los suelos por la demanda alimentaria, la competencia por tierras y la necesidad de cumplir con las expectativas de vida en el mundo. La agricultura se enfrentará a retos casi imposible de cumplir (ya vividos en el presente), por el exceso en demanda de alimentos. La disponibilidad de tierras fértiles será cada vez menor debido al aumento de los asentamientos humanos. Incluso, se estima que la deforestación de bosques va a incrementarse a causa del establecimiento de tierras agrícolas; las cuales, ocuparán para el 2030 un aproximado de 141 millones de hectáreas más a las actuales (Gomiero, 2016).

### 3.2 Revolución verde

El crecimiento demográfico sucedido en la década de los 40's del siglo XX, urgió la generación de alternativas agrícolas que evitaran una crisis alimentaria. Fue así que desde 1940, y con su consolidación en los 60's, surgió la denominada Revolución Verde, que generó la producción intensiva, principalmente de granos básicos y monocultivos, como maíz y trigo (Pazos-Rojas *et al.*, 2016). Fue notorio el incremento de la producción de estos cereales a partir de 1960 sin cesar hasta la actualidad. La sobreproducción (2 billones de toneladas de granos) ocasionó que los costos de los granos se redujeran a medida que pasaban los años. En gran parte, estos incrementos se deben a la creación de variedades mejoradas por el CIMMYT en México y el Instituto Internacional de Mejoramiento del Arroz en Filipinas, las cuales tenían como única meta, aumentar el rendimiento de los cultivos (Khush, 2001). En México, por ejemplo, tan solo de 1950 a 1970 los rendimientos de trigo  $\text{ha}^{-1}$  se triplicaron, llegando a más de 3 ton (Ceccon, 2008).

Las variedades logradas para esos años fueron el punto de partida, no obstante su cultivo estuvo acompañado de la liberación constante y desmedida de insumos agrícolas, tales como plaguicidas y fertilizantes nitrogenados y fosfatados, principalmente. A pesar de que fue una medida eficiente en el combate del hambre, los daños ambientales sobresalieron, sobre todo en la degradación del suelo (Gomiero, 2016). Los daños del uso excesivo de estos fertilizantes, no es específico del suelo, la planta absorbe lo que requiere, mientras que el resto se lixivia a los mantos acuíferos, en una cadena que termina con la eutrofización de los lagos o ríos. A su vez, la pérdida de oxígeno en los ambientes acuáticos recae en la muerte de peces. En esta ruta, los compuestos nitrogenados volatilizables que llegan a la atmósfera son los causantes de la lluvia ácida (Pazos-Rojas *et al.*, 2016).

### 3.3 Biofertilizantes

En el siglo XIX se descubrió la fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y después se identificaron géneros bacterianos de vida libre que realizaban la misma función (*Azotobacter*). Fue a principios del Siglo XX, que con el conocimiento adquirido de bacterias benéficas del suelo que se asociaban con plantas en la rizosfera, rizoplano o tejidos internos y el descubrimiento de otros microorganismos, como los hongos micorrízicos, surgió una ola de investigaciones para corroborar los efectos en los cultivos a partir de los mecanismos benéficos para el crecimiento de las plantas, en la mejora de la nutrición o en el control de organismos patógenos.

Muchos de los microorganismos benéficos pueden tener más de un mecanismo para favorecer el crecimiento vegetal, ya sea el actuar directamente sobre la planta o afectar a otro organismo perjudicial. El término biofertilizante, de acuerdo con la definición propuesta por Vessey (2003), es una sustancia que contiene microorganismos vivos que se aplican a la semilla, suelo o planta y que tiene la capacidad de colonizar la raíz o el interior del vegetal hospedero y mejorar el estado nutrimental de este, a través del incremento de la disponibilidad de nutrientes y de la fertilidad en el suelo. Es decir, no todas las bacterias que promueven el desarrollo de las plantas entran bajo este término, ni los abonos orgánicos o verdes.

Durante la creciente demanda alimentaria en el siglo pasado, se logró solventar las necesidades; sin embargo, el uso desmedido de pesticidas y fertilizantes tuvo consecuencias ambientales alarmantes tales como: pérdida de fertilidad de suelos, generación de resistencia por las plagas, contaminación del agua e incremento de la dureza; por las concentraciones de

minerales provenientes de los insumos inorgánicos agrícolas (Raja, 2013). Debido a la identificación de la causa de la problemática, los gobiernos se vieron forzados a implementar alternativas eficientes y más amigables con el ambiente en la producción agrícola. Por esto es que se propone utilizar a los biofertilizantes, un producto compuesto por células vivas. Basado en la definición de Vesser (2003), se incluyen a muchas especies de bacterias o géneros (denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal) que mejoran el contenido micro o macronutricional. Algunas de estas son: *Pseudomonas citronellis* (PC), *Pseudomonas* sp. RA6, *Serratia marcescens* CDP13, *Frateuria aurantia* (Simbionte-K), *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. mucilaginosus*, *Azotobacter chroococcum* A-41, *P. chlororaphis* y *B. megaterium* (Basak *et al.*, 2010; Dogra *et al.*, 2019; Jamal *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2012). Muchas de estas aisladas de la rizosfera de los cultivos.

### **3.4 Rizósfera**

La rizosfera es la zona del suelo que está influenciada por la raíz de la planta, donde existe un complejo de interacciones entre los microorganismos y la misma (Pétriacq *et al.*, 2017). En ella, hay mayor abundancia de microorganismos en relación a otras parte del suelo (Bakker *et al.*, 2013); debido a esto, se favorece la acción de la microbiota sobre la materia orgánica para transformar compuestos con carbono y nitrógeno, entre otros elementos (Finzi *et al.*, 2015; Philippot *et al.*, 2013).

El tamaño de las poblaciones microbianas que habitan en la rizosfera está fuertemente relacionado con la síntesis de compuestos orgánicos durante las distintas etapas fenológicas de la planta (Chaparro *et al.*, 2014), el genotipo vegetal y los exudados radicales, conformados por metabolitos primarios y secundarios. Los microorganismos detectan los

nutrientes (azúcares y otros compuestos carbonados) u otras moléculas, a través de receptores de compuestos químicos o de condiciones ambientales favorables (Van Dam y Bouwmeester, 2016).

El sistema complejo de comunicación se realiza por medio de compuestos o metabolitos secretados por las plantas, para seleccionar a los microorganismos asociados (Venturi y Keel, 2016). Durante este proceso, la planta hace uso de sus sistema de reconocimiento de inductores que son secretados por los microorganismos, en un protocolo que puede dar como resultado la asociación con bacterias de vida libre benéficas o simbióticas, simbiosis con micorrizas, microorganismos auxiliares en la respuesta al estrés, modificación de la síntesis de promotores del crecimiento vegetal y metabolismo y expresión de genes de defensa (Venturi y Keel, 2016).

Los compuestos carbonados de la rizosfera no son específicos, por lo que existe competencia entre los organismos benéficos y patógenos, por ellos. Sin embargo, en el transcurso de la colonización por patógenos, se suscitan cambios en la composición de la población de microorganismos del suelo, por competencia por residuos que pueden servir como sustrato para otros miembros de la microbiota (Chapelle *et al.*, 2016). De esa manera, pueden predominar los microorganismos que poseen características de biocontrol (Dudenhöffer *et al.*, 2016).

### **3.5 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)**

Las bacterias promotoras del crecimiento en plantas (BPCV) o rizobacterias (RPCV), son términos que se adjudicaron al grupo diverso de bacterias que colonizan la raíz o que se encuentran en la rizosfera, intercambiando compuestos nutrimentales con la planta o estimulando aquellos microorganismos que favorecen el crecimiento vegetal. Este término hace referencia a bacterias de vida libre que pueden encontrarse en las zonas rizosféricas o en otros órganos. También se le denomina así a los rizobios que establecen simbiosis con leguminosas y desarrollan órganos específicos, los nódulos radicales. El modo de acción en que actúan las BPCV, divide a los mecanismos en directos e indirectos. El primer grupo lo conforman:

- 1) Reducción del impacto del estrés abiótico en la fisiología de la planta.
- 2) Estimulación de la elongación celular por la exposición a reguladores del crecimiento vegetal (ácido indol acético, citocininas y giberelinas).
- 3) Procesos en los que el microorganismo es parte activa de la nutrición de la planta (solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de sideróforos).

Mientras que el segundo grupo de mecanismos incluye:

- 1) Control de fitopatógenos a través de la secreción de sustancias antimicrobianas.
- 2) Disminución de las formas elementales del nutriente del que se alimentan los patógenos.
- 3) Activación del sistema de defensa en el vegetal para atacar a organismos perjudiciales (resistencia sistémica inducida) (Vejan *et al.*, 2016).

Algunas bacterias de vida libre que se adhieren a la raíz pueden llegar a penetrarla y considerarse endófitos bacterianos (Brusamarello-Santos *et al.*, 2016). La colonización interna de tejidos se genera a través de grietas en las raíces primarias y laterales e incluso por rupturas ocasionadas por el crecimiento radical (Glick, 2015). En el proceso de colonización, los exudados radicales (carbohidratos, aminoácidos, enzimas, ligninas, indoles y ácidos orgánicos), juegan un rol importante debido a que son una fuente de energía y alimento para los microorganismos (Allard-Massicotte *et al.*, 2016). Estos compuestos permiten la proliferación de la vida microbiana y con ello se desencadena una serie de señales a través de activación de quimiorreceptores para establecerse sobre la raíz o dentro de los tejidos de la misma (Kierul *et al.*, 2015), a la par, para que se logre la asociación existe un proceso de control de genes que tienen funciones específicas en la interacción planta-microorganismo, de movilidad, quimiotaxis y útiles para la formación de biopelículas (Kierul *et al.*, 2015). En varias bacterias Gram negativas existe el sistema de detección de *quorum* (*quorum sensing*); el cual es una maquinaria controlada por la molécula autoinductora N-acil homoserina-lactona (Fukami *et al.*, 2018).

La regulación de genes por los nutrientes y carbohidratos de la exudación radical son diferentes dependiendo de las especies bacterianas que participan en la interacción. Se expresan algunos genes que activan funciones de replicación de ADN, división celular, síntesis de proteínas, reguladores del proceso de traducción y postraducción (Mwita *et al.*, 2016), y otras propiedades relacionadas con el biocontrol de fitopatógenos como síntesis de quelantes y de quitinasas (Zhou *et al.*, 2016).

### 3.5.1 Bacterias productoras de ACC desaminasa

El etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) es una fitohormona sintetizada a partir de la metionina en varios tejidos, su función está en la diferenciación celular, maduración del fruto, apertura de flores, abscisión de hojas, capacidad de anclaje al suelo por las raíces y de respuesta de defensa (Davies, 2010). En leguminosas se ha identificado como primordial en el establecimiento de la simbiosis para formar el nódulo y encapsular a las bacterias, para posteriormente, fijar nitrógeno (Reid *et al.*, 2018). De acuerdo con Saleem *et al.* (2018) la ruta que sigue la metionina es la siguiente: 1. Metionina, 2. S-adenosilmetionina, 3. Ácido 1-aminocilopropano-1 carboxílico y 4. Etileno.

En su hábitat natural, como parte del desarrollo las plantas, estas fabrican la cantidad de etileno y especies reactivas de oxígeno (ERO) necesarias durante las diversas etapas, desde la germinación hasta completar su ciclo de vida. En situaciones no óptimas, los tejidos se sobresaturan de etileno (Sarkar *et al.*, 2018; Bal *et al.*, 2013) y ERO (Oukarroum *et al.*, 2015), lo que provoca efectos secundarios como atrofia del tallo y del sistema radical (Chen *et al.*, 2017a; Airaki *et al.*, 2015), incitar a la muerte celular programada (Poór *et al.*, 2013) y disminuir las células vivas en el tejido vegetal por el estrés oxidativo de los órganos (Garg *et al.*, 2015). A todos los procesos fisiológicos de la planta surgidos por la incapacidad de regular la concentración interna de etileno y de señalización por sobrepasar los umbrales normales, se le conoce como estrés por etileno.

La ACC desaminasa es una enzima que poseen algunas BPCV, la función principal por la cual es útil para las plantas se debe a la capacidad de reducir los niveles de etileno en situaciones de estrés biótico y abiótico. El procariota posee mecanismos de reducción de

estrés, incluida la producción de ACC desaminasa, para facilitar la supervivencia. Algunas bacterias también poseen diversos mecanismos a la vez, como síntesis de sideróforos, reguladores del crecimiento vegetal y actividad nitrogenasa (Sarkar *et al.*, 2018; Heydarian *et al.*, 2016; Orhan *et al.*, 2016), mientras que otras tienen características únicas, como ser halotolerantes (Barra *et al.*, 2017; Fukami *et al.*, 2017). Lo anterior conlleva a que un sólo microorganismo pueda provocar elongación del tallo o crecimiento en general, aun cuando la planta sufra por un estrés nutrimental y/o de otro tipo (Bal *et al.*, 2013).

La acción principal de la ACC desaminasa es reducir el etileno en el tejido vegetal, la bacteria actúa sobre el ácido 1-aminociclopropano 1- carboxílico, intermediario de la síntesis del etileno, utiliza ácidos orgánicos como fuente de carbono o nitrógeno y desvía la ruta del etileno para obtener amoníaco (Esquivel-Cote *et al.*, 2010; Heydarian *et al.*, 2016). Además, en escenarios de exposición a salinidad, los beneficios de las bacterias se atribuyen a regular los procesos fisiológicos que son afectados, las bacterias alivian el estrés y aumentan la absorción de agua y nutrientes como el fósforo y potasio (Nadeem *et al.*, 2013) para facilitar la producción de energía a través de la fotosíntesis (Jha *et al.*, 2016), aunado a la regulación del sistema antioxidante que poseen las plantas para combatir la autodestrucción por ERO (Karthikeyan *et al.*, 2012). Los resultados se traducen en el incremento de la biomasa y mayor rendimiento en cultivos de interés (Nadeem *et al.*, 2013).

### **3.5.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico**

El nitrógeno es un elemento esencial que la planta incorpora a moléculas orgánicas después de obtenerlos en sus dos formas inorgánicas preferibles, amonio ( $\text{NH}_4$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3$ ). Tiene funciones estructurales, se encuentra en aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y enzimas,

así como también es parte fundamental en la elaboración de compuestos carbonatados durante la fotosíntesis y energía (ATP), pues es necesario para el transportador citocromo en la cadena transportadora de electrones de fotosíntesis y respiración que se realizan en la membrana tilacoidal y mitocondria, respectivamente (Alcántar-González *et al.*, 2016).

En el ciclo del N en el medio natural, las transformaciones del elemento están controladas por la actividad microbiana que existe en el suelo. Dentro de los procesos que lo conforman, la fijación biológica es la más importante, por su aportación de formas aprovechables de N al suelo. Entrada de N realizada en exclusiva por las bacterias diazotróficas de vida libre o simbióticas (Stein y Klotz, 2016). Las bacterias poseen nitrogenasa, un complejo enzimático metálico (Fe-Mo-nitrogenasa) que utiliza de sustrato el N<sub>2</sub> de la atmósfera y lo convierte en amoníaco (Stein y Klotz, 2016), mientras que algunas bacterias tienen mecanismos enzimáticos alternativos para fijar el N<sub>2</sub>, en donde entra en acción la V- nitrogenasa y Fe-nitrogenasa en suelos deficientes en molibdeno (Zhang *et al.*, 2016). La conversión N<sub>2</sub>-amoníaco es mediado por las concentraciones de O<sub>2</sub> en el ambiente. Las bacterias aeróbicas o microaerófilas recurren al uso de sus sistemas especializados de protección de la nitrogenasa. Pero, en el caso de la simbiosis leguminosa-rizobios, la leghemoglobina es la responsable de captar el O<sub>2</sub> dentro del nódulo, donde prevalece un ambiente favorable para la infección por rizobios y para la fijación de N por la nitrogenasa (de Bruijin, 2014).

En medios *in vitro* la presencia de la proteína vegetal, ha demostrado hacer más eficiente la utilización de O<sub>2</sub> para mantener las condiciones óptimas e incrementar la eficiencia de la nitrogenasa (Marino *et al.*, 2013; Wittenberg *et al.*, 1974). Por otra parte, en la bacterias fijadoras de N atmosférico de vida libre, *Azotobacter vinelandii*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas stutzeri*, la acción sobre el O<sub>2</sub> está regulada por la secreción de

exopolisacáridos que sintetizan a partir de carbono disponible para formar biopelículas y mediar la exposición de la enzima nitrogenasa al O<sub>2</sub>, dejando a las células bacterianas en entornos poco aeróbicos (Natzke *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017).

### **3.5.3 Bacterias productoras de índoles**

Las plantas fabrican reguladores del crecimiento para controlar diversas etapas de su fenología, desde la germinación, la producción de frutos y el término de su ciclo de vida. Las auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, brasinoesteroides, jasmonatos, ácido abscísico y ácido salicílico son algunos de los reguladores que sintetizan las plantas.

En conjunto o por separado, desempeñan funciones de regulación de la división, diferenciación o elongación celular, elongación del tallo, el control del cierre y apertura de estomas, la dormancia axilar o la inducción sobre yemas axilares, germinación o expresión de enzimas necesarias durante la elaboración de energía a partir del almidón, desarrollo del fruto, maduración y floración (Davies, 2010).

Las auxinas son las hormonas vegetales que se descubrieron primero. A pesar de que los estudios surgieron en plantas, algunas algas también son capaces biosintetizar miembros que conforman esta familia, como el ácido indol acético (AIA); compuesto exógeno en *Chlorella vulgaris* para la acumulación del ácido palmítico y esteárico (Jusoh *et al.*, 2015).

El AIA se considera la auxina más importante y estudiada, sin embargo, se ha puesto interés en el conocer la función del ácido fenilacético y las enzimas participes en la obtención de ambos reguladores (Cook *et al.*, 2016). El AIA se elabora a partir del triptófano y otras ruta independiente que en la actualidad no se ha descrito con exactitud y que se considera poco importante en las respuestas de las plantas en etapas diferentes de desarrollo (Zhao, 2012).

El triptófano es convertido a indol-3-piruvato (IPA) y después a AIA por enzimas pertenecientes a la familia TAA (aminotransferasas) y YUC (flavin monooxigenasas) respectivamente, de las cuales se ha demostrado su protagonismo y esencialidad principal en ensayos al relacionar la carencia de AIA con la inactivación de genes que codifican esta actividad enzimática (Zhao, 2012). El AIA se ha identificado desde el crecimiento inicial hasta en la maduración del fruto y en el desarrollo de las flores (Bernal *et al.*, 2019).

Bacterias de la rizosfera utilizan el aminoácido triptófano como fuente de energía y producen la auxina AIA. A través del estudio de la expresión de genes o en filtrados de cultivos bacterianos, se han descrito tres vías que usan al triptófano como precursor (ácido indol-3-pirúvico, indol-3-acetamida e indol-3-acetaldoxima o indol-3-acetonitrilo), en las cuales difieren de las enzimas participes en cada una y de los intermediarios formados. Algunas bacterias no dependen del triptófano para producir indoles (Duca *et al.*, 2014), es decir, elaboran pequeñas cantidades de AIA en ambientes sintéticos o de manera natural, pero su maquinaria de síntesis funciona mejor por la presencia del aminoácido lo cual lleva a incrementar las concentraciones del regulador (Ahmad *et al.*, 2005).

Las bacterias de vida libre endófitas mutantes que sobre expresan la síntesis de AIA, tienen efectos positivos en la fijación de nitrógeno al ser inoculadas en arroz e inducen el incremento de la actividad nitrogenasa; enzima responsable de la conversión del N<sub>2</sub> a formas nitrogenadas aprovechables por las plantas (Defez *et al.*, 2017).

Algunos géneros o especies de bacterias simbióticas, endófitas o de vida libre, benéficas o patógenas aisladas y estudiadas por la capacidad de sintetizar AIA son *Herbaspirillum seropedicae* (Yin *et al.*, 2015), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella aerogenes*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Gluconacetobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, entre otras (Duca *et al.*, 2014).

### **3.5.4 Bacterias productoras de sideróforos**

El hierro (Fe) esencial para el desarrollo óptimo de las plantas, participa en el metabolismo y adaptación en circunstancias de estrés oxidativo, en la síntesis de proteínas y mantiene la estabilidad de la pared celular primaria (Bocchini *et al.*, 2015; Ceballos-Laita *et al.*, 2018).

En el suelo es un nutriente susceptible a cambios drásticos por la actividad química, biológica y las condiciones ambientales edáficas. Las bacterias desempeñan un papel importante para el vegetal, pues se involucran en la reducción y oxidación del Fe (Colombo *et al.*, 2013). En presencia de oxígeno y con pH neutro el Fe puede quedar capturado en hidróxidos de hierro u oxihidróxidos por las reacciones químicas y la acción de bacterias neutrofílicas (Colombo *et al.*, 2013).

Las plantas absorben el Fe reducido (Férrico  $Fe^{2+}$ ) y oxidado (Ferroso  $Fe^{3+}$ ). La nutrición del primer grupo se denomina estrategia I y el segundo estrategia II. Las que pertenecen a la estrategia I requieren de la enzima hierro quelato reductasa de la superficie de la raíz para reducir el  $Fe^{3+}$  y después traslocarlo (Martín-Fernández *et al.*, 2017; Wulandari *et al.*, 2014).

La estrategia II es propia de las gramíneas, se caracterizan por poseer un sistema especializado de exudación de ligandos de la familia de los ácidos muginéicos de la raíz a la rizosfera, denominadas fitosideróforos (Colombo *et al.*, 2013;). Los sideróforos son compuestos de unión que tienen afinidad por capturar el hierro y formar complejos muy estables, las moléculas también pueden capturar otros metales: Mg, Cu, Zn y Ni pero su compatibilidad es menor y el transporte o captura insignificante respecto al Fe (Walter *et al.*, 2017).

La metionina es el aminoácido del cual parten las reacciones para crear fitosideróforos. Las tres enzimas que participan en orden son: nicotiniamina sintasa, nicotiniamina aminotransferasa y la ácido desoximugínico sintasa (Beasley *et al.*, 2017). Los transportadores de la familia YSL están presentes en todas las plantas (estrategias I y II); en gramíneas se encargan de absorber el complejo Fe- fitosideróforo al interior. Los estudios en trigo y arroz demuestran regulación positiva de miembros de los YSL (Kumar *et al.*, 2019; Senoura *et al.*, 2017) y de la enzima nicotiniamina aminotransferasa en la raíz, en medios deficientes en Fe (Beasley *et al.*, 2017).

Algunas bacterias promotoras del crecimiento en plantas de la rizosfera y endófitas sintetizan sideróforos y alivian el estrés nutrimental (Rana *et al.*, 2012; Rashid *et al.*, 2012), a través de los complejos protectores que actúan sobre minerales como la geotita, por el mecanismo de solubilización encaminado a tener formas inorgánicas disponibles (Liu *et al.*, 2017). Al igual que en las plantas, el estado nutrimental del Fe del medio en el que crecen las bacterias influyen en su secreción (Sah *et al.*, 2017). Su efecto se ha consolidado como una maquinaria de control de microorganismos perjudiciales para la salud vegetal (Solanki *et al.*, 2013) y permitir el desarrollo en pH elevado y en suelos contaminados por elementos potencialmente

tóxicos, tras mejorar la capacidad de fitorremediación (Grobelaq y Hiller, 2017). Algunos de los sideróforos bacterianos se estimulan en suelos contaminados con metales y metaloides y tienen compatibilidad con el cadmio, al inmovilizarlo en la rizosfera (Chen *et al.*, 2017b), con el níquel, cobre o aluminio (Dimkpa *et al.*, 2008).

### **3.5.5 Bacterias solubilizadoras de fosfatos**

El fósforo es el segundo macroelemento más importante por detrás del nitrógeno; ocupa hasta el 0.5% del peso total de la materia seca de la planta (Naeem *et al.*, 2017) y es necesario para completar su desarrollo y su ciclo de vida de manera exitosa (Shabnam e Iqbal, 2016; Fernandes *et al.*, 2016). Es útil para diversos procesos fisiológicos tales como: el transporte de agua (Mahdiah *et al.*, 2016), la permeabilidad y composición de la membrana (Barea y Richardson, 2015; Mahdiah *et al.*, 2016), reducción de azúcares en la zona de demanda aérea por la acumulación de aminoácidos en el tejido radical, regular intermediarios en la respiración por las plantas (Sung *et al.*, 2015), mediar el metabolismo de proteínas de captación de luz y de enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin durante la fotosíntesis, producción de ATP (Zhang *et al.*, 2014) y sintetizar ácidos orgánicos y metabolitos secundarios (Ding *et al.*, 2017).

En el suelo, el fósforo es limitante, proviene de la descomposición de la materia orgánica o la transformación de los minerales que lo contienen adsorbido o precipitado. Las concentraciones van de 200 a 300 mg kg<sup>-1</sup> de suelo. De este, el 1% lo ocupan los ortofosfatos monovalente (HPO<sub>4</sub>) y divalente (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), los cuales son las formas solubles en que la planta lo adquiere de la solución del suelo, para su nutrición (Naeem *et al.*, 2017). Los iones ortofosfato son susceptibles a rápidas transformaciones que hace disminuir su presencia y

por ende la disponibilidad debido a que son incorporados a moléculas orgánicas sintetizadas por organismos o se precipitan en fosfatos de calcio ( $\text{CaPO}_4$ ) en suelos alcalinos (calcáreos) o en fosfatos de hierro ( $\text{FePO}_4$ ) y aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ) en entornos de acidez cuando el pH disminuye por debajo de 5.5 y hay presencia de estos elementos en sus formas oxidadas (Naeem *et al.*, 2017).

Para la obtención de fósforo en suelos con deficiencias, las plantas desarrollaron diversos mecanismos para adaptarse o actuar sobre los fosfatos inmovilizados. Los procesos de obtención incluyen: exudar ácidos orgánicos, acidificar el medio (Valentinuzzi *et al.*, 2015), desarrollo radical para explorar a profundidad, en el área subsuperficial o de manera lateral (Wen *et al.*, 2017), actividad fosfatasa que actúa sobre grupos fosfatos adheridos a compuestos orgánicos (Erel *et al.*, 2017) y liberar protones a través de la raíz (Valentinuzzi *et al.*, 2015), entre otros. Además, contienen transportadores específicos que se encuentran en la membrana plasmática, los cuales se encargan de absorber por la raíz y movilizar en el sistema vascular hasta la zona de demanda en los organelos de las células, para la síntesis de compuestos orgánicos (Naeem *et al.*, 2017).

Los microorganismos del suelo participan en el ciclo del fósforo en las transformaciones de solubilización, mineralización e inmovilización. Las bacterias rizosféricas tienen mayor número en comparación con aquellas en la edafósfera, esto hace que las reacciones como la catalizada por la enzima fosfatasa (vegetal o microbiana) se favorezcan en conjunto con la absorción por el tejido radical. Esto produce un incremento del fósforo en la parte aérea y favorece el desarrollo de las plantas (Fraser *et al.*, 2017; Spohn *et al.*, 2015).

En el suelo la mayor parte del fósforo orgánico se encuentra en fosfato inositol, el cual no es soluble y, por tanto, las plantas no pueden usarlo. Las bacterias mineralizan (P orgánico → P inorgánico soluble) el fósforo orgánico por la actividad fosfatasa, alcalina o ácida dependiendo de las condiciones del suelo, en donde se libera el grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) de la materia orgánica y fosfato de inositol a la solución del suelo. Este último es sustrato de la enzima fitasa (Alori *et al.*, 2017).

Por otra parte, los complejos minerales como el fosfato de calcio,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , son solubilizados por diversos mecanismos de acción, entre los cuales se encuentra la liberación de protones  $\text{H}^+$  durante la asimilación del amonio (Illmer *et al.*, 1995) y la secreción de ácidos orgánicos (AO): glucónico, fumárico, succínico, acético (Rashid *et al.*, 2004) e incluso por ácidos inorgánicos (AI) como el ácido sulfúrico que solubiliza roca fosfórica. Esto a través de la oxidación del azufre realizado por bacterias mesófilas o termófilas (Xiao *et al.*, 2011). La liberación del ácido sulfúrico no depende de la ausencia de fósforo soluble en el medio, el proceso de conversión es afectado por la temperatura, el crecimiento de las bacterias y el incremento de la cantidad de roca fosfórica o fuente insoluble de fósforo (Babana *et al.*, 2011). A pesar de la importancia de las bacterias termófilas y algunas mesófilas que oxidan el azufre, se ha considerado al ácido glucónico al mecanismo más frecuente de acción sobre el fosfato tricálcico en la correlación de ácido glucónico- $\text{PO}_4$  (Stella y Halimi 2015), y de carbonato de cadmio (Yang *et al.*, 2018). Los ácidos orgánicos secretados por bacterias son sintetizados por el metabolismo propio por las rutas de la glicólisis, ciclo de Krebs o la ruta de la pentosa fosfato, donde los compuestos orgánicos producidos se van utilizando como sustrato para formar otros, incluso diferentes entre cepas por la capacidad diferente que poseen. El ácido glucónico se elabora por la ruta de la pentosa fosfato, donde la enzima

glucosa deshidrogenasa utiliza de sustrato a la glucosa entre la membrana interna y externa periplasmática de la célula, mientras que la siguiente enzima (glucono-lactonasa) trabaja dentro de la célula donde consigue el producto final (ácido glucónico, Yang *et al.*, 2018).

Los microorganismos rizosféricos son aislados y manejados para la formulación de biofertilizantes; sin embargo, la rizosfera no es la única fuente de BPCV; ya que este tipo de bacterias pueden encontrarse en otros ambientes como esporomas de hongos ectomicorrízicos (Pineda-Mendoza *et al.*, 2019) tracto digestivo de lombrices (Hussain *et al.*, 2016) o en la parte externa del cuerpo de insectos polinizadores (Chauhan *et al.*, 2015), de tripas de larvas de polillas (Indiragandhi *et al.*, 2008), del estiércol de vaca (Swain y Ray, 2009) y de leche humana y de vaca (Singh *et al.*, 2006).

### **3.6 Generalidades del género *Melipona***

La clasificación descrita por Michener (2007) divide al orden Hymenoptera en siete familias: Stenotritidae, Colletinae, Andrenidae, Halictidae, Melittida, Megachilinae y Apidae. El género *Melipona* se agrupa de la siguiente manera: Familia: Apidae, Subfamilia: Apinae, Tribu: Meliponini.

Las características las distingue de otras abejas que no se encuentran incluidas en la Tribu Meliponini, debido a que las Meliponas no poseen aguijón, tienen un tamaño que va de los 8 a 15 mm, alas que apenas y pasan el ápice del metostoma (Michener, 1990), con ausencia o a penas distinguibles las venas cruzadas submarginales y la segunda vena recurrente del ala anterior (Michener, 2013). Se menciona que la longitud puede ser uno de los rasgos por la cual se puede identificar a una *Melipona*, sin embargo, existen miembros que pueden diferir de los 8 o 15 mm que describe Mechener, 1990, y llegar a medir apenas 1.8 mm (Michener,

2013). La capacidad de carga y transporte de néctar por individuo es menor en comparación a *A. melífera*, puede variar de 4 veces menos o solo 1/5 parte (Roubik y Buchmann, 1984), incluso entre las especies del genero *Melipona*, la carga de néctar cambia con edad de las abejas, en *M. quadrifasciata* existe correlación negativa del peso del cuerpo y la eficiencia de recolección y transporte de alimento por la reducción de la estructura almacenamiento (corbícula, Ramalho *et al.*, 1998).

El material de construcción del nido en meliponinos está conformado por la mezcla de cera producida por las abejas y resina que colectan de los árboles. La entrada del nido es diferente entre las especies que conforman el género. En *M. yucatanica* y *M. beecheii* la apertura está hecha de barro. La primera tiene características discretas en el orificio de ingreso, mientras que la segunda establece una cubierta de material al alrededor de la superficie, con un diámetro que solo permite la entrada de una sola abeja a la vez (8.5-12 mm). Además, forman un túnel que conecta al exterior con la cámara donde se encuentran las crías, de tal manera que toda abeja que ingresa realiza ese recorrido (van Veen y Arce, 1999).

### **3.6.1 La convivencia de *M. beecheii* con microorganismos**

La abeja *M. beecheii* es un insecto sin aguijón agrupado en el Orden Hymenoptera y subgénero *Melikerria*. Se distribuye desde México hasta Costa Rica y también en Cuba. En México se condiciona a bosques tropicales y subtropicales, se encuentra en territorios costeros del golfo y del océano pacífico, algunos de los estados son: Guerrero, Yucatán, Oaxaca y Veracruz, los últimos dos incluyen Istmo de Tehuantepec (zona más pequeña que conecta al Golfo-Pacífico) (Quezada-Euán, 2018).

La importancia de los insectos meliponinos está dada en las asociaciones que forman con microorganismos y las propiedades que posee su miel respecto a la producida por la abeja europea (*Apis mellifera*). La especie *M. beecheii* fabrica miel con características particulares que la hacen más rica en flavonoides, ácido ascórbico, aminoácidos, proteínas, capacidad antioxidante y con mejor efecto antimicrobiano en comparación con la de *A. mellifera* (Álvarez-Suaréz *et al.*, 2018). La aplicación de miel de *Melipona* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans* (Hau-Yama *et al.*, 2019) y de bacterias oportunistas resistentes a antibióticos que generan infecciones durante el proceso de sanación de heridas y quemaduras, como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Zamora *et al.*, 2015). Lo anterior puede asociarse con la carga microbiana benéfica que las abejas pueden seleccionar durante los vuelos a las plantas de las que se alimentan.

Las abejas sin aguijón poseen una carga microbiana de bacterias, actinobacterias y hongos (levaduras) que en conjunto o en particular desempeñan funciones que favorecen la supervivencia de la colonia, y que se pueden encontrar en el tracto digestivo, polen, en la estructura del nido u otras partes (Menezes *et al.*, 2013). Esta interacción no solo se realiza en las meliponas, sino que también en otras abejas sin aguijón o insectos. En abejas sin aguijón parece ser una asociación mutualista que se obtiene durante la recolección del polen o néctar en sus visitas a las plantas, aquí los microorganismos que se encuentran en las estructuras vegetales, suelen ser transportados por las abejas (Rosa *et al.*, 2003). Los estudios sobre la asociación de abejas sin aguijón identifican comúnmente a miembros del género *Bacillus* como principales microorganismos constituyentes de las interacciones, estos se caracterizan por poseer como función principal las actividades enzimáticas activas cuando se aíslan de provisiones larvales (Gilliam *et al.*, 1985), polen, miel o lugares de almacenamiento

del polen (Gilliam *et al.*, 1990). La actividad enzimática de *Bacillus* es importante en mantener la supervivencia de la colonia, actúan en la predigestión del polen por las proteasas, amilasas, esterases y establecen una barrera protectora contra otras bacterias patógenas (Gilliam *et al.*, 1985). Gilliam y colaboradores en 1990 determinaron que la prevalencia del género bacteriano al estudiar a *M. fasciata* poseía enzimas lipasas, fosfatasa, glicosidasas y aminopeptidasas. La mayor abundancia de *Bacillus* se atribuye al actuar sobre las larvas, por algún proceso desconocido que los hace más numerosas en este estadio que en miel o polen (Gilliam *et al.*, 1990).

### **3.7 El cultivo de maíz (*Zea mays* L.): Generalidades e importancia**

El maíz (*Zea mays* L.) es una planta gramínea. Las variedades conocidas en la actualidad remontan su origen de la domesticación y dispersión en el sur de México a partir de su ancestro el teocinte hace aproximadamente 9,000 años (*Zea mays* ssp. *parviglumis*), además, de acuerdo con la evidencia genética se plantea que la zona geográfica específica es en la cuenca oeste del Río Balsas, debido a la estrecha relación de las poblaciones de *Zea mays* ssp. *parviglumis* (Matsouka *et al.*, 2002).

Del sur de México, se distribuyó para su cultivo extensivo en varios países. Es considerado el cereal y la planta más distribuida en el mundo, posee la facilidad de encontrarse en varios ambientes por la capacidad de adaptación adquirida durante su evolución y en el proceso de domesticación. La regiones geográficas que abarca su presencia alcanza altitudes de 3800 metros y zonas donde la precipitación anual es de 400 mm hasta 1500 mm (Bedoya *et al.*, 2010).

Posee características nutricionales sobresalientes que ayudan al fortalecimiento del sistema inmunológico, el contenido de grasas y proteínas es superior al de otros cereales, además tienen importancia médica e industrial (Kumar y Jhariya, 2013). En el ámbito agrícola se caracteriza por ser un excelente forraje.

En México, tiene diversos usos y aplicaciones, pues es parte de la gastronomía nacional todos los días al ser la materia prima para elaborar la tortilla y por la utilidad del elote o los granos en la elaboración de platillos, ya sea a partir de granos enteros o molidos. Esto lo convierte en una fuente importante de ingresos económicos en el país.

### **3.8 Generalidades del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.)**

La taxonomía clasifica a la lechuga en la familia de las Asteráceas (Asteraceae) en la clase de las dicotiledóneas (Křístková *et al.*, 2008). Las dicotiledóneas son conocidas también como magnoliopsida, un grupo que pertenece a las angiospermas (Magnoliophyta) (Villaseñor y Ortíz, 2014). Rzedowski clasificó al género *Lactuca* dentro de la Tribu Lactuceae. El género se conforma por plantas herbáceas anuales o perennes dependiendo la especie; tienen látex blanco y flores hermafroditas liguladas con brácteas desiguales y graduadas (Rzedowski *et al.*, 2005).

Las variedades de *Lactuca sativa* L. están clasificadas con base a la morfología de las hojas y la forma que desarrollan en primera instancia en seis grupo: 1) cos (romana), 2) de corte (hojas sueltas), 3) tallo, 4) mantecosa, 5) iceberg, crisphead o cabbage (crujientes) y 6) latín. Después se adicionó la sección que concentra a las plantas que poseen hojas que no son consumidas pero que tienen semillas ricas en aceite aptas para su uso en la cocina y alimentación: 7) oleaginosas (de Vries, 1997).

El origen de la domesticación y del ancestro del cual evolucionó, no se conoce con exactitud, sin embargo, por la evidencia encontrada en tumbas y paredes talladas dando forma al cultivo, se cree que se cultivaba desde 4500 años a.C. en Egipto y de ahí la dispersaron al continente Europeo (Pink y Eavan, 1993). Las relaciones filogenéticas indican que la domesticación se efectuó de la especie progenitora silvestre *L. serriola*, asimismo, el ensayo genético demográfico coincide con las evidencias físicas, las variedades primitivas cultivables de lechuga surgieron por la distribución que se realizó en Europa a partir de su centro de origen en la media luna fértil hace 10, 800 años, mientras que en América se introdujo en conjunto con la conquista hace 500 años, donde después surgió el grupo de las iceberg (crujientes) (Zhang *et al.*, 2017).

### **3.8.1 Importancia del cultivo de lechuga**

Las hortalizas son de los principales grupos vegetales constituyentes en la alimentación humana, de los cuales destacan más de 19 tipos de acuerdo a los diversos censos realizados a nivel mundial, los dos más sobresalientes son el jitomate y la lechuga con los valores más altos de producción a nivel intensivo (Viteri *et al.*, 2013). La lechuga es una planta de importancia a nivel mundial, su producción se puede realizar durante todo el año, esto debido a su gran capacidad de resistencia a diferentes temperaturas lo cual la referencia como una planta de potencial en la agricultura (Lafta y Mou, 2013). En los últimos años el interés por este cultivo ha aumentado, debido a la diversificación de variedades y al incremento de su consumo a nivel nacional y mundial (Suárez y Serrano, 2012).

Gracias al interés económico, su producción se realiza en todo el mundo, los principales países productores son China, Estados Unidos e India (Faostat 2017). Debido a su distribución, el 98% de su producción se realiza en los continentes de Asia, América y Europa principalmente, la superficie de producción de este cultivo se aproxima a 1.100 000 ha con más de 28 millones de toneladas producidas (Faostat, 2017).

La exportación de lechuga en mercados internacionales se realiza principalmente por países como España, EUA y los Países Bajos, por su parte los principales países importadores fueron Alemania, Reino unido, Canadá, , debido a que la cantidad producida es destinada al consumo propio. México ocupó el quinceavo lugar en la lista de exportación siendo EUA su principal importador. La producción de lechuga en México se efectúa en 25 estados, los tres principales productores son Guanajuato, Puebla y Zacatecas (Soto *et al.*, 2010).

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Muestreo**

Se colectaron dos muestras de la rizosfera de maíz de dos parcelas agrícolas en la Región Tierra Caliente de Guerrero. De cada parcela las muestras se compusieron de 3 submuestras. Las cepas definidas como asociadas a *M. becheei* se aislaron de la superficie externa, del tubo digestivo, del nido y del pan de abeja a través de métodos de desinfección estandarizados y el método de dilución y extensión en placa.

### **4.2 Aislamiento de bacterias con rasgos promotores del crecimiento vegetal**

#### **4.2.1 Bacterias con ACC desaminasa**

Se utilizó la metodología descrita por Penrose y Glick (2003), la cual tiene como objetivo aislar bacterias capaces de utilizar el ACC como fuente de nitrógeno. Para el crecimiento de las bacterias se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL. Se agregó 1 g de suelo rizosférico en frascos con 50 mL de medio de cultivo líquido Pseudomonas Agar F (PAF) y se incubaron a 28°C durante 24 h a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 1 mL y se adicionó a 50 mL de medio PAF líquido, se incubó a las mismas condiciones que el primero. Del crecimiento obtenido se transfirió 1 mL a 50 mL de medio de cultivo líquido mínimo y se incubó de la misma forma. Posterior a las 24 h, 1 mL se transfirió a 50 mL de medio mínimo líquido que contenía 3.0 mM de ACC en lugar de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como suministro de nitrógeno y se mantuvo a 28°C durante 24 h a 200 rpm (el ACC se esterilizó por filtración y se adicionó una vez tibio el medio de cultivo). Las cepas crecidas en esta última incubación a medio líquido se consideraron como ACC positivas.

Para conseguir colonias aisladas se realizaron diluciones seriadas y extensión en placa. 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  se sembraron en placas con medio mínimo con 3 mM de ACC solidificado con agar. Se incubaron durante 4 d a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se purificaron las colonias. Las cepas ACC positivas se sometieron a las pruebas de solubilización de fosfatos, producción de indoles y sideróforos.

#### **4.2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico**

El aislamiento se realizó por el método de diluciones seriadas y extensión en placa. La dilución  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  se sembraron por triplicado en medio de cultivo “nitrogen fixing bacteria” (NFB) con rojo congo (Rodríguez-Casares, 1982) y se incubaron durante 4 días a  $28^{\circ}\text{C}$ . Las cepas que absorbieron el colorante se purificaron y se sometieron a la prueba de solubilización de fosfatos, producción de indoles y sideróforos.

#### **4.2.3 Bacterias productoras de indoles (ensayo cualitativo)**

Se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  en placas Petri con medio de cultivo Luria-Bentanni (LB) sólido y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 3 d. Las cepas se purificaron en medio de cultivo LB sólido. Para determinar las bacterias que producían indoles (AIA), las cepas se sembraron en tubos de polipropileno de 15 mL con 10 mL medio de cultivo LB líquido suplementado con  $1\text{ g L}^{-1}$  de triptófano, se incubaron por 48 h a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 160 rpm. Después del periodo de incubación los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 minutos y una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  se colocó en pozos de microplaca y se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Salkowski (2%  $0.5\text{ M FeCl}_3$  en 35% de ácido perclórico). Las muestras con coloración rosa se determinaron como positivas para la producción de AIA y se evaluaron para su cuantificación y para ensayar su capacidad de solubilizar fosfatos y producir sideróforos.

#### **4.2.4 Bacterias solubilizadoras de fosfatos**

Aislamiento por extensión en placa. 100  $\mu$ L de la dilución  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  se sembraron en medio de cultivo Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) e incubaron por 7 d a 28°C. Las bacterias que formaron halo alrededor de la colonia se seleccionaron y purificaron por su capacidad de solubilización de fosfato, además, se sometieron al ensayos de producción de índoles y sideróforos.

#### **4.3 Ensayo cualitativo de producción de sideróforos**

Se utilizó el medio cromo azurol S (CAS) descrito por Louden *et al.* (2011). Las bacterias se sembraron en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL, con 25 mL caldo nutritivo y se incubaron a 28°C por 24 h. Los tubos se centrifugaron a 7,000 rpm durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y se adicionó agua bidestilada estéril, se agitó en vórtex y se centrifugó a 7000 rpm por 15 min. Este procedimiento se repitió 3 veces para eliminar residuos de elementos del medio de cultivo. Ya realizados los lavados, se sembró una alícuota de 6  $\mu$ L en medio CAS. La formación de un halo amarillo alrededor de la colonia indicó la captura de hierro como consecuente de la presencia de los quelantes.

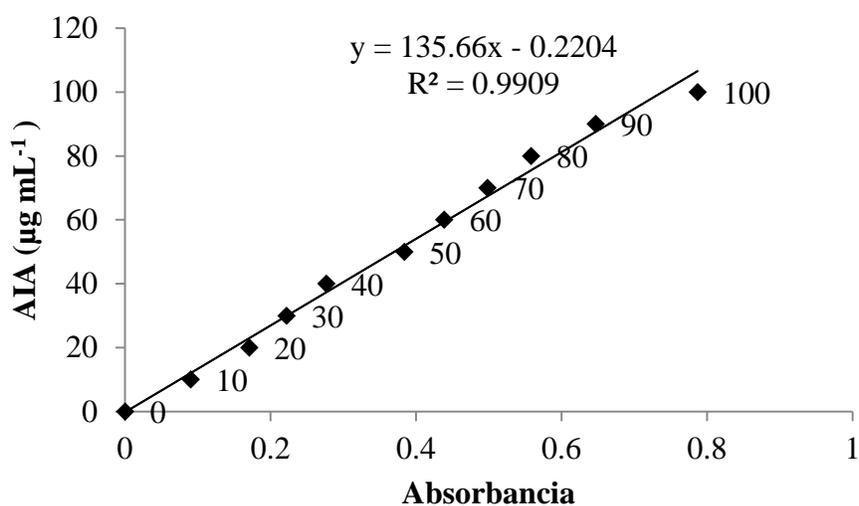
#### **4.4 Ensayos cuantitativos**

##### **4.4.1 Cuantificación de ácido indol acético**

Se utilizó como base la metodología descrita por Gordon y Weber (1951). Las cepas se inocularon en frascos de cristal de 250 mL con 25 mL de medio de cultivo LB líquido suplementado con 1 g L<sup>-1</sup> de triptófano. Los tubos se incubaron a 28°C a 160 rpm durante 72 h. Después se vació el cultivo en tubos de polipropileno de 50 mL, se centrifugaron durante

10 min a 7000 rpm. 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de cada cepa por cuadruplicado cada se colocaron en pozos de microplaca para espectrofotometría y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Salkowski. La placa se leyó en espectrofotómetro a 530 nm con un periodo de incubación de 30 min en la oscuridad. Para determinar la cantidad de AIA producido se utilizó una curva estándar de concentración de 0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA para obtener la ecuación de la recta (Figura 1). (Ver anexo – curva estándar AIA). El ensayo se realizó dos veces para verificar resultados.

#### Ecuación obtenida:



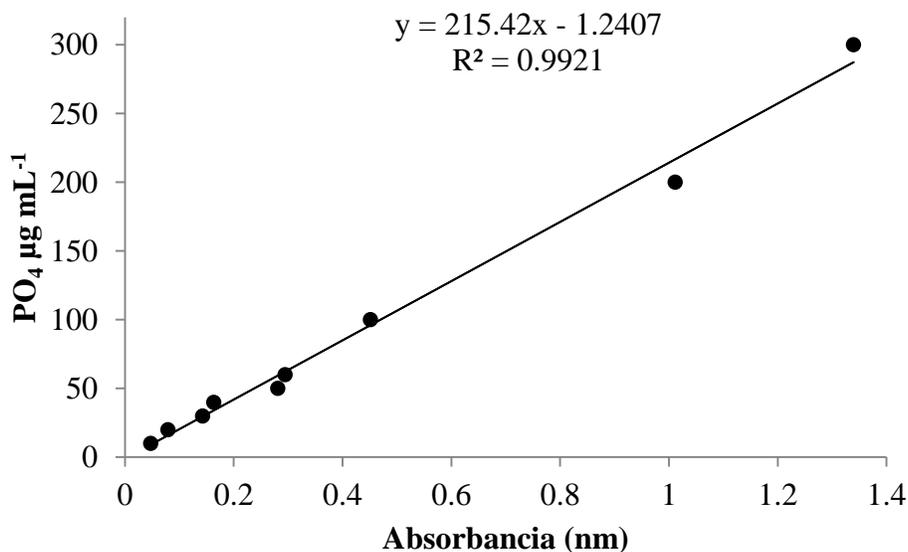
**Figura 1.** Ecuación de la recta obtenida a partir de las concentraciones de 0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (curva patrón ácido indol acético).

#### 4.4.2 Cuantificación de fosfatos solubilizados

Una alícuota de cada una de las cepas se inoculó por triplicado en tubos cónicos de polipropileno de 15 mL que contenían 10 mL de medio de cultivo Pikovskaya. Los tubos se incubaron en agitación a 180 rpm durante 1 semana. Después de la incubación, los tubos se

centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min y se colectaron los sobrenadantes. Se colocó una muestra de 200  $\mu\text{L}$  por cuadruplicado en pozos de microplaca para espectrofotometría y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de vanadato ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$  al 0.25% en una solución de  $\text{HNO}_3$  al 35% y 1 mL de solución molibdato ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  al 5%), se dejó reaccionar durante 5 min. A continuación se realizó la lectura en espectrofotómetro a una absorbancia de 420 nm (Dias *et al.*, 2009). La cantidad de fosfato soluble se determinó a partir de una curva estándar elaborada de concentración de 10 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2). (Ver anexo para curva patrón fosfato) con la cual se realizó una de regresión simple y se obtuvo la ecuación de la recta.

**Ecuación y gráfica obtenida:**



**Figura 2.** Ecuación de la recta obtenida a partir de la concentración de 0 a 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{PO}_4$  soluble (curva patrón fosfato).

## **4.5 Efecto de la inoculación de BPCV en el crecimiento de maíz**

### **4.5.1 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar. El experimento se realizó en agosto de 2019 y estuvo conformado por 23 tratamientos con tres replicas cada uno. 21 representaban a los tratamientos inoculados con las cepas asiladas de la rizosfera y un testigo sin inoculación. Un experimento más se realizó en septiembre de 2019 el cual se conformó de 27 tratamientos, 26 cepas asociadas a *M. becheei*, previamente identificadas molecularmente y caracterizadas por atributos enzimáticos y mecanismos directos e indirectos en la promoción del crecimiento vegetal (cuadro 2), más un testigo sin inoculación. En ambos estudios se utilizó el mismo procedimiento en el montaje del experimento y en la obtención de plántulas a inocular como se describe en el punto 4.5.2 y 4.5.3.

### **4.5.2 Preparación de sustrato y germinación de semillas**

Las semillas de maíz se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1% durante 10 min, se sembraron en vasos de 500 mL desinfectados con alcohol que contenían sustrato compuesto por 30% de vermiculita y 70% de tezontle (v/v), previamente esterilizado durante 3 h a 125°C y 18.5 libras  $\text{plg}^2$  y dos días después se volvió a esterilizar de la misma manera.

### **4.5.3 Inoculación**

Una alícuota de cada una de las cepas se sembró en 20 mL de caldo nutritivo contenido en tubos de 50 mL. Se incubaron por 4 d a 28°C a 180 rpm. Una vez pasado el tiempo se determinó la cantidad de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo por diluciones seriadas y extensión en placa. Los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min para formar el

pellet. El medio de cultivo (sobrenadante) se sustituyó por la misma porción de agua destilada estéril (20 mL). Una vez realizado la sustitución por agua, los tubos se agitaron en vórtex durante 1 min para homogeneizar el inóculo.

Las plantas homogeneizadas por tratamientos de 7 d postgerminación se inocularon con 5 mL de inóculo. A los 30 d después de inoculación (DDI), se evaluaron las variables agronómicas (altura de la planta, peso seco aéreo y peso seco radical). Los datos se analizaron con el programa SAS, aplicando la prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Para fines comparativos entre los 2 experimentos y determinar las cepas que más promovieron el crecimiento vegetal, se calculó el porcentaje de aumento o reducción del peso seco (aéreo o radical) en comparación con los valores del testigo de cada experimento.

#### **4.6 Inoculación de BPCV y sus filtrados en el desarrollo radical *in vitro***

##### **4.6.1 Obtención de plántulas**

Para este ensayo se seleccionaron las cepas que promovieron mayor el peso seco radical en el experimento en invernadero.

Semillas de maíz se lavaron con jabón 5 min y se enjuagaron con agua corriente. Después se lavaron con una solución de 2 g L<sup>-1</sup> de Promyl (Marca Registrada) y 1 g L<sup>-1</sup> de Benlate (Marca Registrada) durante 15 min y se enjuagó con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron durante 15 min en hipoclorito de sodio 5% por 10 min y se eliminó con agua destilada estéril. Por último se sumergieron en Agrovit (Marca Registrada) por 30 min y posterior al tiempo solo se desechó el Agrovit, sin enjuagar. Se sembraron en frascos de 250 mL con 40 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog preparado al 50% (Murashige y Skoog, 1962).

Las semillas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 24 °C durante 10 d para posterior inoculación.

#### **4.6.2 Inoculación de plántulas**

Las plántulas se homogeneizaron para tener plantas con el mismo crecimiento radical. El experimento se conformó con siete tratamientos. Seis tratamientos representaron la inoculación con cepas o sus filtrados y uno al testigo sin inoculación.

Se preparó el inóculo, tubos con 25 mL de medio de cultivo se inocularon con las cepas seleccionadas y se incubaron durante 4 d a 28°C y 180 rpm hasta alcanzar concentración aproximada de  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>. De cada cultivo se realizó el filtrado, para esto, los tubos se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante con jeringa estéril y se filtró a través de una membrana de 2.2 µm. El cultivo restante se agitó en vórtex para homogeneizarlo. Los tratamientos se inocularon con 100 µL de inóculo o 200 µL de filtrado. Se mantuvieron durante 9 d a 24 °C en cámara de crecimiento y después de transcurrir el tiempo se evaluó el crecimiento radical inducido. La raíz se secó a 70 °C por 3 d y se pesó. Estos datos se analizaron con el programa SAS y se aplicó la prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### **4.7. Potencial biotecnológico de BPCV asociadas a *M. beeecheii* y rizosfera de maíz en lechuga (*L. sativa*)**

Bacterias aisladas del exterior, del tubo digestivo y nido de *M. beeecheii* y del pan de abeja, se utilizaron para ensayar su efecto en maíz y lechuga. Las cepas se distinguen por el rasgo in vitro de síntesis de AIA. La clave cepa, identificación molecular y capacidad de síntesis de AIA se muestran en el cuadro 2.

#### **4.7.1 Ensayo de inducción de la germinación en lechuga**

La germinación de las semillas se realizó *in vitro* en placas Petri, algodón y papel filtro. 10 mL de agua destilada estéril se adicionaron en la placa Petri, encima se colocó una almohadilla de algodón redonda seguida por el papel filtro. Las semillas se pusieron encima del papel filtro. Estas se desinfectaron con alcohol 70° durante un minuto, se enjuagaron con agua destilada estéril y se adicionó hipoclorito de sodio al 1 % por un minuto, después se realizaron lavados con agua. Se pusieron 10 semillas por placa. Cada tratamiento se conformó por 3 placas, donde cada una representó una repetición.

Para la inoculación de las semillas, las cepas se cultivaron en tubos cónicos de 50 mL con 25 mL de caldo nutritivo. Se incubaron en agitación a 180 rpm durante 3 d. Las semillas se inocularon con 100  $\mu$ L de cultivo bacteriano a concentración aproximada de  $1.18 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Las cajas se mantuvieron a condiciones ambientales durante 14 días, donde se realizaron observaciones diarias para evaluar la inducción de la emergencia de la radícula.

#### **4.7.2 Inoculación de cepas y su efecto en el crecimiento de lechuga.**

Semillas de lechuga se desinfectaron al igual que en la prueba de germinación (Ver apartado 4.7.1). Las semillas se sembraron semilleros con sustrato compuesto por agrolita (50%) y vermiculita (50%) (V/V), previamente esterilizado durante 3 h a 18 libras. Las plántulas se trasplantaron cuando emergió la primera hoja verdadera a contenedores de 500 mL que contenían como sustrato turba y tezontle 40 % y 60 % respectivamente (v/v), el cual se esterilizó por calor húmedo durante 3 h y 3 veces en días alternados. Las plántulas se regaron con agua destilada y 6 d después de trasplante (DDT) se colocaron 5 mL de inóculo a una concentración de  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada planta. El experimento se compuso de 48

tratamientos con cuatro repeticiones cada uno que representaron a 26 cepas aisladas de *Melipona beecheii*, 21 de la rizosfera de maíz y un testigo sin inoculación. Las plántulas se regaron con 50 mL solución Steiner cada semana y agua destilada según necesidades. Se evaluó el peso fresco, peso seco aéreo y radical y el área foliar a los 30 d después de trasplante y se aplicó la prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Aislamiento de bacterias con atributos de promoción del crecimiento vegetal

Se aislaron en total 36 cepas, de las cuales se seleccionaron 19 por sus rasgos con potencial biotecnológico y se utilizaron la cepa 1R1B y 2AR1B aisladas en un trabajo previo de la rizosfera de maíz (Mena-García *et al.*, 2018). Para pruebas adicionales solo se consideró a las cepas que tenían más de un atributo y aquellas que crecían en medio libre de nitrógeno. Se aislaron dos cepas consideradas positivas a la actividad enzimática de la ACC (Cuadro 1). En varios estudios a partir de la rizosfera de maíz se han conseguido aislamientos de bacterias con el potencial de sintetizar AIA, sideróforos, fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos (Castellano-Hinojosa *et al.*, 2018; Pande *et al.*, 2019; Tahmasbi *et al.*, 2014).

### 5.2 Pruebas bioquímicas de promoción del crecimiento vegetal

#### 5.2.1 Ensayo cualitativo detección de sideróforos

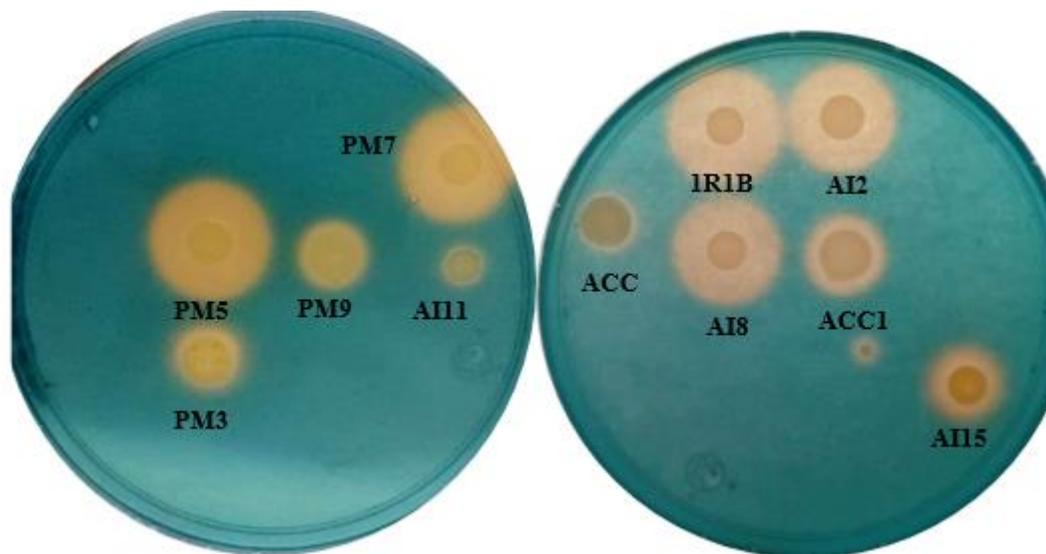
Los resultados en placa mostraron que 11 cepas sintetizaron sideróforos (Cuadro 1 y Figura 3). El indicativo de la formación de complejos entre las moléculas orgánicas secretadas por las bacterias y el  $\text{Fe}^{+3}$  que contiene el medio de cultivo es el cambio de viraje del color azul a amarillo, rojo o naranja (Bertrand *et al.*, 2009). El índice de sideróforos se calculó y mostró que las cepas con mayor potencial en la quelatación es la 1R1B con un índice de 2.8, seguida de la AI8 con 2.78, PM7 y PM5 con 2.6. La que tuvo menor eficiencia fue la PM9 y ACC2 con el índice más bajo (1.2). Los niveles reportados a las 48 h en este trabajo son similares a los encontrados por Goes *et al.* (2012) al aislar bacterias del suelo y ensayar sus habilidades de promoción. Encontraron niveles de producción de sideróforos a las 72 h en el rango de 1.15 y 5.25 (Goes *et al.*, 2012). El tamaño del halo indica la zona en la que hay hierro libre

soluble, la capacidad de liberar el metal se relaciona con la cantidad de sideróforo sintetizado y el tipo del mismo, lo anterior porque existe una medida de constante de estabilidad que cada ligando posee con respecto al metal o complejo insoluble sobre el cual actuará, es decir, cantidades iguales de sideróforos están presentes, pero la afinidad por el complejo es diferente (Kraemer, 2004).

**Cuadro 1.** Clave de cepas aisladas y pruebas bioquímicas de atributos de promoción del crecimiento *in vitro*.

Clave cepa	Solubilización de fosfato	Producción de Sideróforos	Síntesis de AIA	Fijación de N <sub>2</sub>
AI2	+	+	+	
AI8	+	+	+	
AI15	+	+	+	
PM3	+	+		
PM5	+	+		
PM7	+	+	+	
PM8	+		+	
PM9	+	+	+	
NF1				+
NF2				+
NF3				+
NF4				+
NF5				+
NF6				+
NF7	+			+
NF8	+			+
NF9	+			+
ACC1	+	+		
ACC2		+	+	
1R1B	+	+	+	+
2AR1B	+	+	+	+

Las bacterias que produjeron mayor índice de sideróforos no tuvieron la misma respuesta respecto a la detección de fosfato soluble (Figura 3 y 4), a pesar de que los sideróforos tienen capacidad de atrapar iones  $\text{Ca}^{2+}$  su afinidad por este metal no es la misma. La liberación del fosfato por actividad quelante no es la misma para fuentes de fósforo insoluble como la roca fosfórica que al aplicar fosfato de hierro (Ghosh *et al.*, 2015). La preferencia de los sideróforos por ciertos metales puede explicarse por el tipo de sideróforo y su capacidad de retener el hierro, del mismo modo que la constante de estabilidad es distinta para cada metal. El estudio de la constante de estabilidad del sideróforo rizoferrina sintetizado por *Rhizopus arrhizus* mostró mayor compatibilidad de ligando con el Fe (III) ( $10^{19.1}$ ), posteriormente con el hierro reducido ( $10^{7.5}$ ), mientras que con el  $\text{Ca}^{2+}$  fue de  $10^6$  (Shenker *et al.*, 1996).



**Figura 3.** Producción de sideróforos por las diferentes cepas.

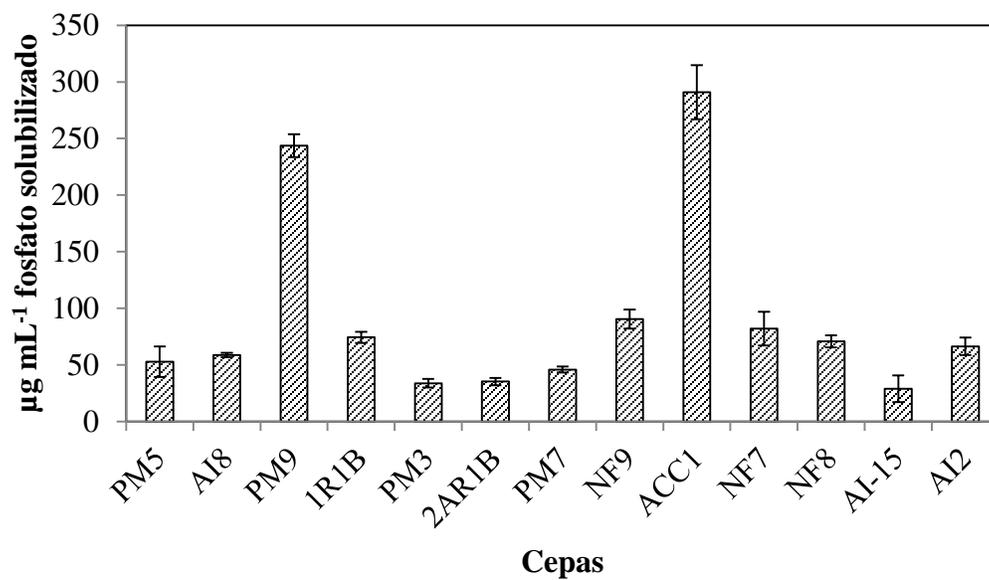
### 5.2.2 Ensayo cuantitativo de solubilización de fosfato

Las 13 cepas seleccionadas por la solubilización cualitativa *in vitro* en medio de cultivo sólido (Figura 6 y 7), difirieron en su capacidad de solubilizar fosfato tricálcico en medio de cultivo líquido (Figura 5). Es importante que la selección de las cepas con esta capacidad cualitativa deba de corroborarse en medio líquido, debido a que cepas que forman el halo de solubilización alrededor de la colonia en cultivo sólido; además, es necesario identificar el tipo de fosfato insoluble sobre el cual actúan (Liu *et al.*, 2015).

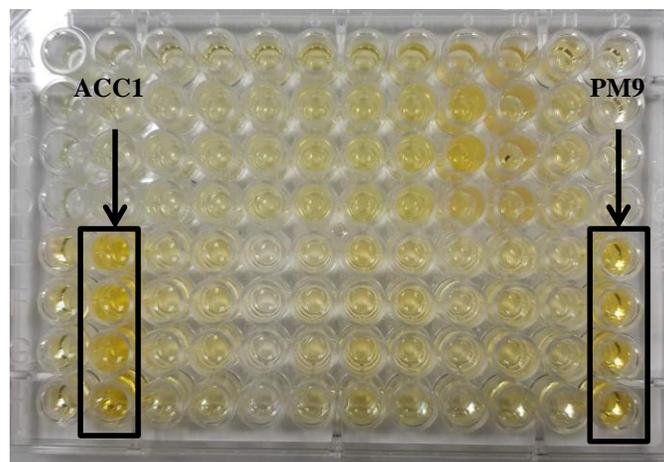
La producción de PO<sub>4</sub> soluble los 7 d de incubación fluctuó entre 28.74 µg mL<sup>-1</sup> por la cepa AI15 a 290.85 en la cepa ACC1, seguida por la PM9 con 243.54 µg mL<sup>-1</sup>; lo que puede apreciarse en la Figura 4. Solo la ACC1 y PM9 solubilizaron más de 100 µg mL<sup>-1</sup> de Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, el resto (84.6%) tuvieron menor eficacia con menos de 91 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 4). En otros estudios se han identificado bacterias del género *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* aisladas de la rizosfera de maíz con mayor eficiencia de acción con hasta 7900 µg mL<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub> a los 14 d de incubación (Castellano-Hinojosa *et al.*, 2018). Si bien, el mecanismo principal que utilizan las bacterias es la secreción de ácidos orgánicos, se plantea que el fosfato liberado por el ácido glucónico (principal molécula orgánica encargada de la solubilización), es utilizado para sintetizar otros ácidos, debido a esto la acidez del medio de cultivo puede disminuir y posteriormente elevarse, al igual que el PO<sub>4</sub>, al envejecer el cultivo bacteriano (Chen *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, las cepas con este mecanismo de promoción del crecimiento mostraron potencial para aplicaciones futuras; pero, cuando se desea realizar un biofertilizante para un suelo con características específicas, lo prioritario es evaluar el efecto en la translocación de

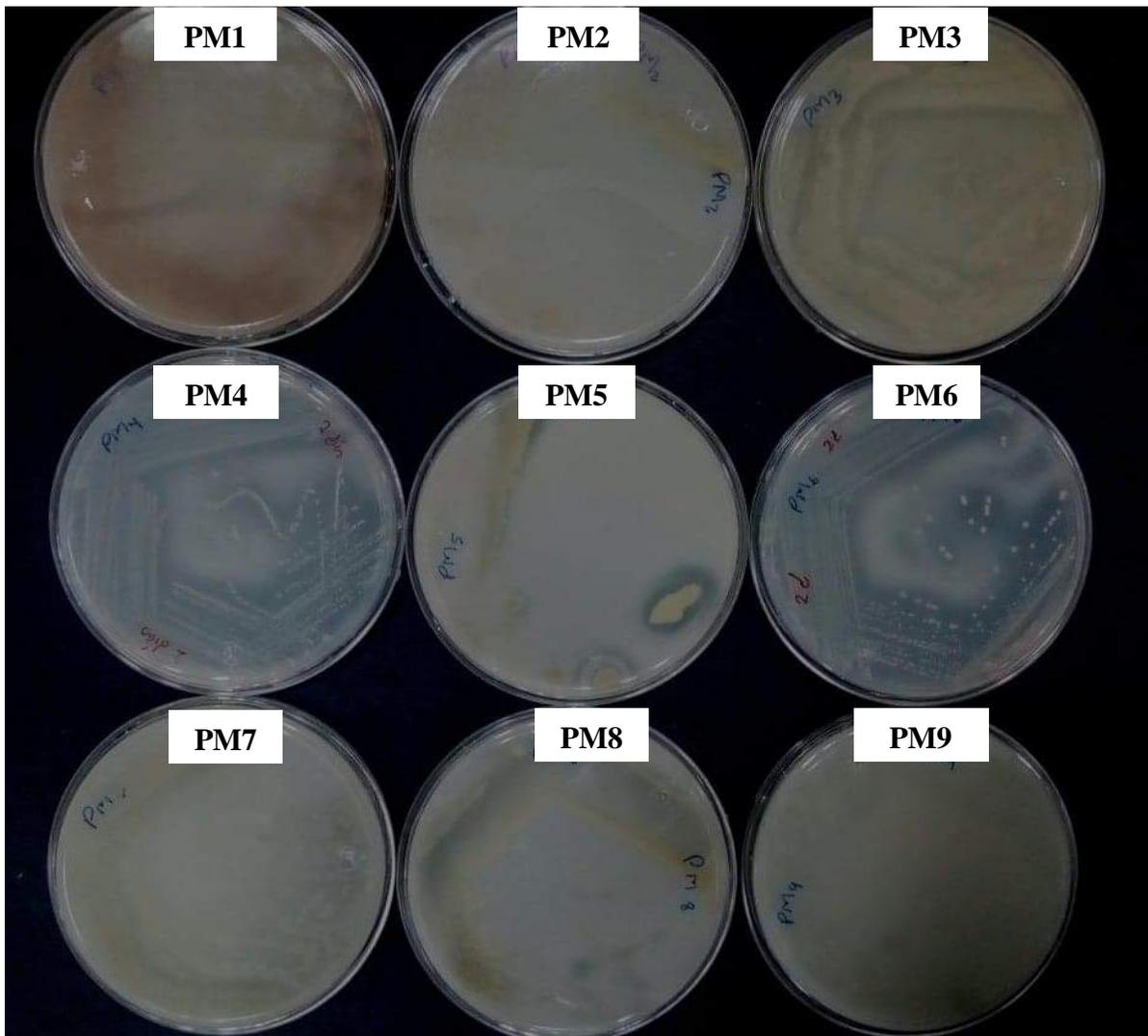
fósforo al tejido de la planta, posterior a las pruebas in vitro con diversas fuentes de fosfato insoluble (tricálcico, de hierro y aluminio). Aunado a esto, debe de hacerse la identificación de los ácidos orgánicos que son los responsables de la solubilización (Bashan *et al.*, 2013). En la actualidad se siguen realizando investigaciones con el fosfato tricálcico como método seguro cualitativo en placa para elegir bacterias solubilizadoras (Batista *et al.*, 2018; Thomas *et al.*, 2018) y comprobación con inoculación a los cultivos de interés.



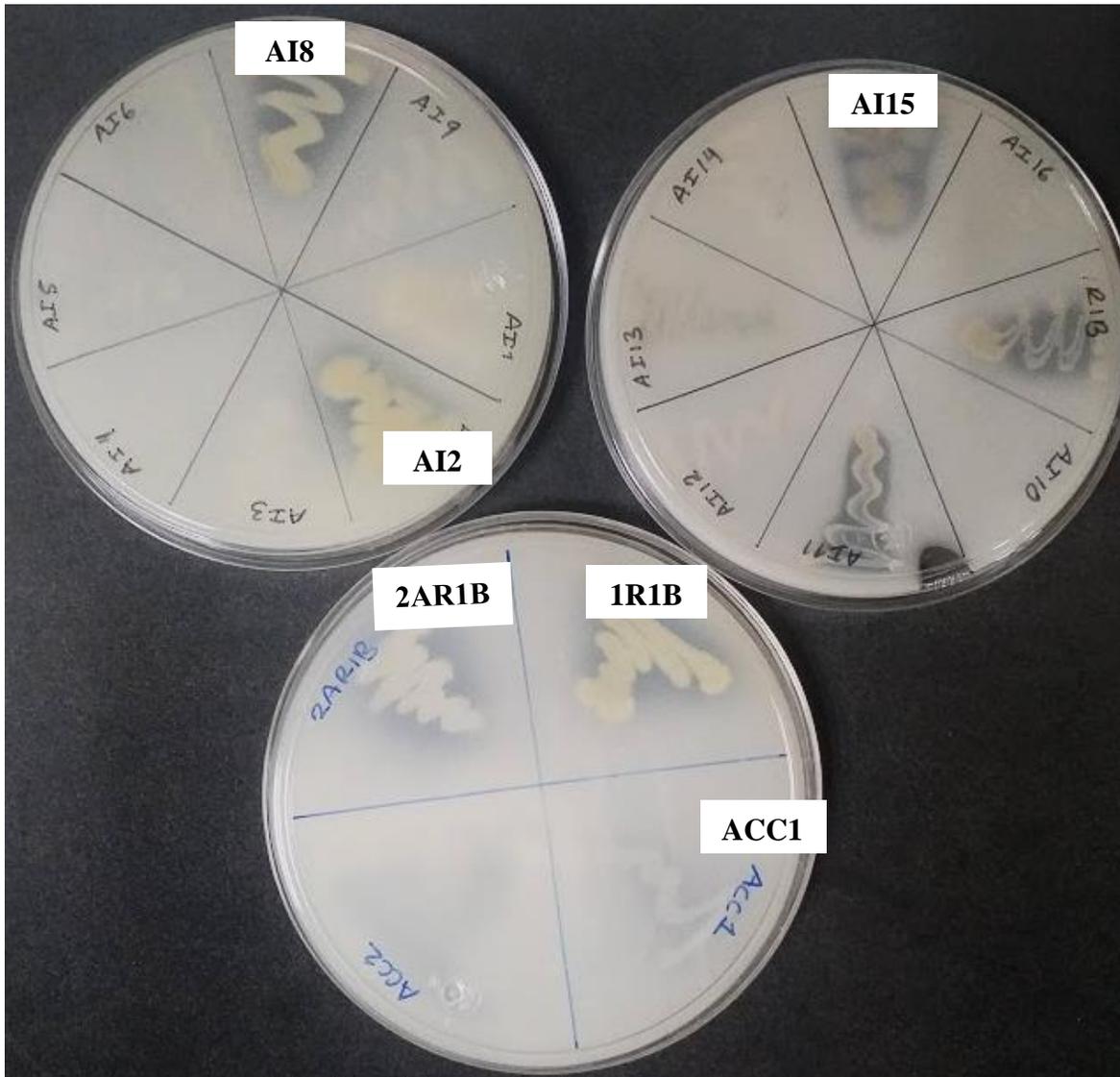
**Figura 4.** Solubilización de fosfato tricálcico por cepas aisladas de la rizosfera de maíz.



**Figura 5.** Ensayo en placa-viraje amarillo por la solubilización de fosfato tricálcico.



**Figura 6.** Bacterias aisladas de rizosfera de maíz en medio de cultivo Pikovskaya con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico. Etiquetadas de PM1 A PM7. P: Pikovskaya, M: Maíz.



**Figura 7.** Bacterias aisladas de la rizosfera de maíz, con capacidad de solubilizar fosfato tricálcico en medio de cultivo Pikovskaya.

### 5.2.3 Cuantificación de AIA de bacterias

Las auxinas son hormonas que desempeñan funciones celulares importantes en la planta. Alteraciones de las concentraciones en las mismas, pueden tener efectos benéficos o perjudiciales de acuerdo con la etapa en la que el contenido cambie. En plantas y bacterias, hay rutas similares en su síntesis, la cual se da a partir de triptófano, el aminoácido es metabolizado hasta AIA por bacterias. Este aminoácido que también es segregado por las raíces al suelo, es adicionado al medio de cultivo para optimizar la detección de la molécula.

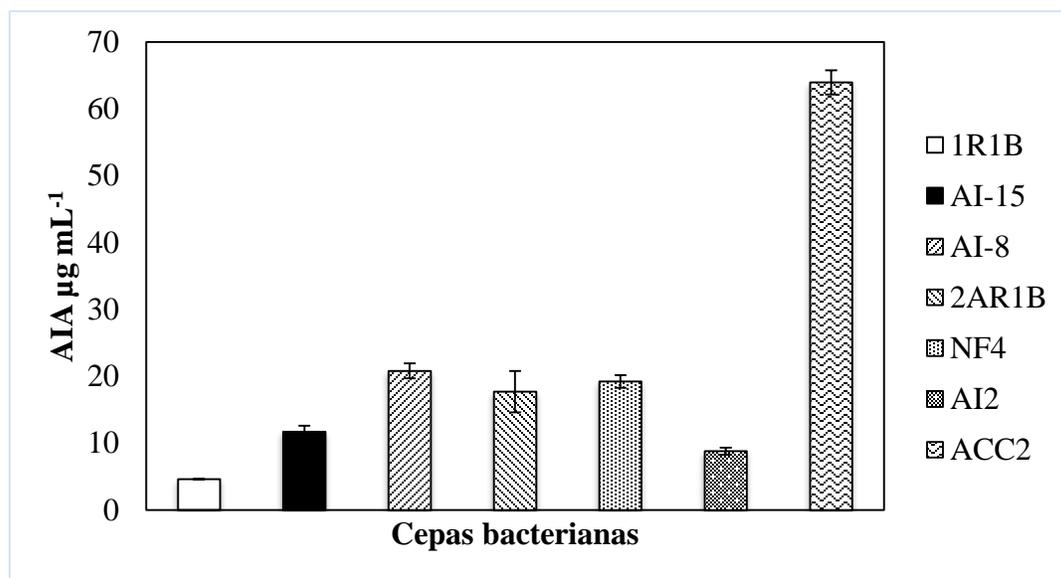
El ensayo realizado, consta de la adición de reactivo de Salkowski, el cual permite revelar el contenido de AIA a través de una coloración de rosa claro a intenso. No obstante, el color arrojado, es una estimación aproximada del AIA en el sobrenadante, en particular porque el reactivo de Salkowski, no solo forma complejos con el AIA, sino que también reacciona con otros compuestos indólicos (ácido indol pirúvico e indol acetamida, Glickmann y Dessaux, 1995).

Las bacterias positivas en la prueba de AIA cualitativa (ensayo colorimétrico se muestra en la Figura 9), siete se ensayaron para la cuantificación. Las cepas tuvieron una capacidad moderada a muy alta de producción de la hormona a las 48 h. La cepa 1R1B reveló la menor cantidad de AIA ( $4.59 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguida por la AI-2 con  $8.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  y AI15 ( $11.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La fluctuación intermedia fue de  $17.6$  a  $20.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  para la cepa 2AR1B y AI-8 respectivamente. Por último, el valor más alto lo arrojó el sobrenadante de la cepa ACC2 con  $63.9 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 8).

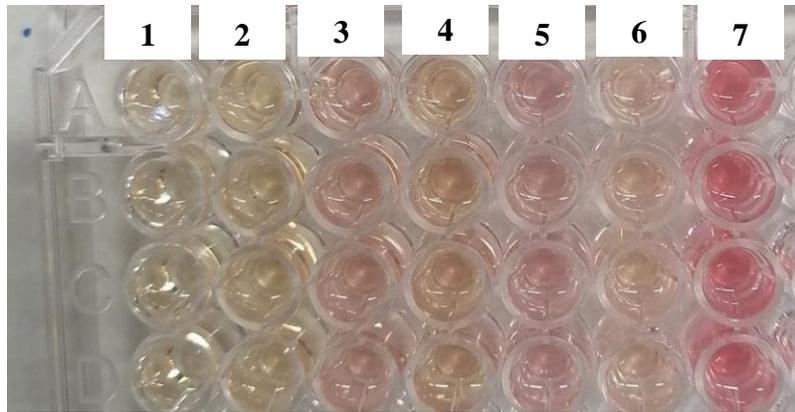
Las BPCV con atributos de síntesis de AIA provenientes de la rizosfera de maíz están bien documentados (Karnwal, 2017; Khambani *et al.*, 2019), incluso de la zona de influencia de la raíz de otras plantas (Chandra *et al.*, 2018). Lo informado en este trabajo es similar a lo reportado por Khambani *et al.* (2019) de bacterias aisladas de la rizosfera de maíz, ahí consiguieron dos cepas que destacan por este mecanismo capaces de sintetizar a los 3 d de incubación  $54.72 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $97.20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , de las cuales se identificó la segunda como perteneciente a al género *Pseudomonas*.

Cabe resaltar que la medición la realizaron a partir de sobrenadantes de medio de cultivo líquido LB suplementado con  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de triptófano, menor a la adicionada en este trabajo. Por su parte, Singh *et al.* (2015) con las mismas características del medio de cultivo utilizadas en esta investigación, reporto que *P. saponiphila* BHU8 sintetizó  $13.29 \mu\text{g mL}^{-1}$  a las 24 h de incubación. En medio libre de nitrógeno con  $0.5 \text{ g}$  de triptófano y 48 h de incubación, *Azotobacter* sp. sintetizó un aproximado de  $37 \mu\text{g mL}^{-1}$  y *Bacillus* sp.  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Bjelić *et al.*, 2018).

Son muchas condiciones que pueden afectar la cantidad de AIA acético en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos. El contenido de triptófano es una de estas, por ejemplo, Karnwal (2017), informo que las cepas AK18 (*P. fluorescens*), AK20 (*P. aeruginosa*), AK31 (*P. aeruginosa*), AK38 (*B. subtilis*) y AK45 (*P. fluorescens*) se volvieron más eficientes en la síntesis de AIA cuando había más triptófano, por ejemplo *P. fluorescens* AK45 indujo ocho veces más ( $4.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) la fabricación de la hormona cuando se duplicó el triptofano de  $50$  a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Lo anterior se ha corroborado con *Azotobacter* y *Bacillus*, aunado a el tiempo de incubación (Bjelić *et al.*, 2018). Otros aspectos que inducen la eficiencia es la temperatura, el pH o la fuente de carbono (Chandra *et al.*, 2018).



**Figura 8.** Producción de ácido indol acético (AIA) a las 48 h por bacterias aisladas de rizosfera de maíz.



**Figura 9.** Ensayo colorimétrico de producción de AIA de algunas cepas aisladas de rizosfera de maíz. 1) Blanco (medio de cultivo LB), 2) AI15, 3) AI8, 4) 2AR1B, 5) NF4, 6) AI2, 7) ACC2.

### **5.3. Clave cepa e identificación molecular de bacterias aisladas de *M. beecheii*.**

Del total de las cepas provenientes de *M. beecheii*, cinco tuvieron la capacidad de producir AIA acético de manera cualitativa en medio de cultivo LB líquido. El nombre, la clave de las cepas y el origen se muestran en el Cuadro 2.

### **5.4 Efecto de la inoculación de bacterias en el crecimiento de maíz**

#### **5.4.1 Inoculación con cepas de la rizosfera de maíz y de *M. beecheii*.**

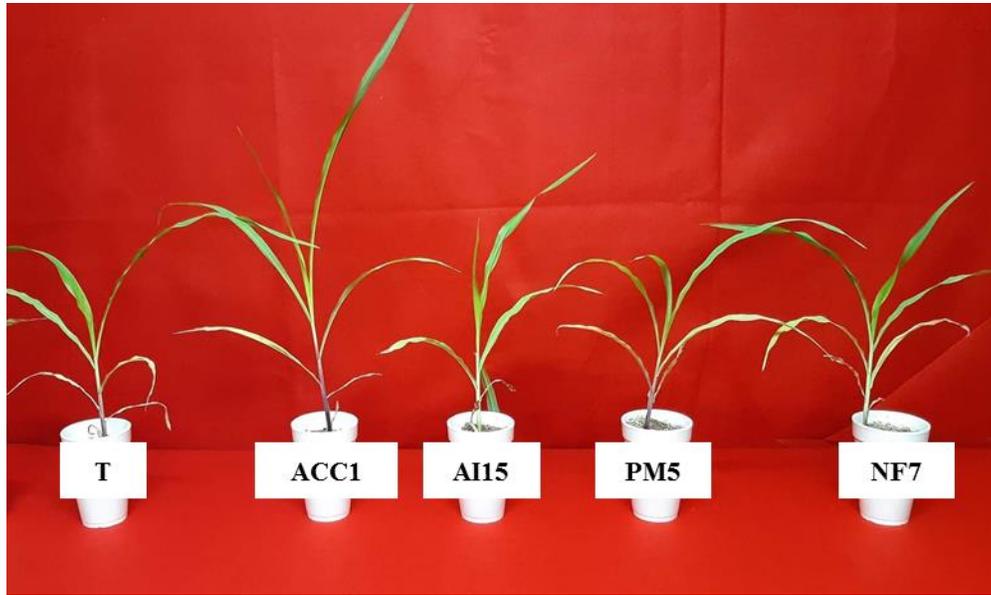
Las plantas inoculadas con la cepa ACC1 mostraron la mayor altura con 58 cm en comparación con las plantas testigo (51 cm), sin haber diferencias significativas (Figura 10 y 11), al igual que en el peso seco aéreo de las plantas inoculadas a pesar de incrementar 144 mg. El peso seco radical tuvo una respuesta diferente a los anteriores, hubo diferencia estadística en 4 tratamientos (NF4, PM9, AI2 y AI8), los cuales aumentaron 66, 65, 68 y 61% respectivamente al comparar los datos obtenidos con el testigo (400 mg) (Cuadro 3 y Figura 14). Cuando las plantas se inocularon con las cepas que se aislaron de *M. beecheii*, no

mostraron diferencia significativa en ninguna variable (Cuadro 4 y figura 15). Los incrementos porcentuales del peso seco aéreo y radical se muestran en la Figura 13 y 14.

**Cuadro 2.** Bacterias asociadas a *M. beecheii* de la colección del Laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados y su capacidad de producir AIA.

Clave cepa	Nombre cepa	AIA síntesis	Clave cepa	Nombre cepa	AIA síntesis
Mb1E	<i>Bacillus altitudinis</i>	-	Mb19N	<i>Corynebacterium nuruki</i>	-
Mb2E	<i>Enterobacter ludwigii</i>	+	Mb20N	<i>Bacillus panaciterrae</i>	+
Mb6E	<i>Pseudomonas geniculata</i>	+	Mb21N	<i>Bacillus cereus</i>	-
Mb7E	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	-	Mb23N	<i>Corynebacterium nuruki</i>	-
Mb8E	<i>Bacillus pacificus</i>	-	Mb24N	<i>Staphylococcus kloosii</i>	-
Mb11E	<i>Bacillus pacificus</i>	-	Mb25N	<i>Staphylococcus kloosii</i>	-
Mb12Tb	-	-	Mb26N	<i>PIZP_s</i>	+
Mb13Tb	-	+	Mb27N	<i>Staphylococcus kloosii</i>	-
Mb14Tb	-	-	Mb28P	<i>LGUF_s</i>	+
Mb15Tb	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i>	-	Mb29P	<i>CP018758_s</i>	+
Mb16Tb	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	-	Mb30P	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	+
Mb17Tb	<i>Pseudomonas geniculata</i>	-	Mb31P	-	-
Mb18N	<i>Staphylococcus arlettae</i>	-	Mb32P	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	-

Clave: Mb (*Melipona beecheii*); E (exterior), Tb (tubo digestivo), N (nido) y P (pan de abeja).



**Figura 10.** Efecto de bacterias aisladas de la rizosfera en la altura de maíz. Tratamientos nombrados por la clave cepa. T: Testigo.



**Figura 11.** Efecto de bacterias asociadas a *M.beecheii* en la altura de maíz. Tratamientos nombrados por la clave cepa. T: Testigo.

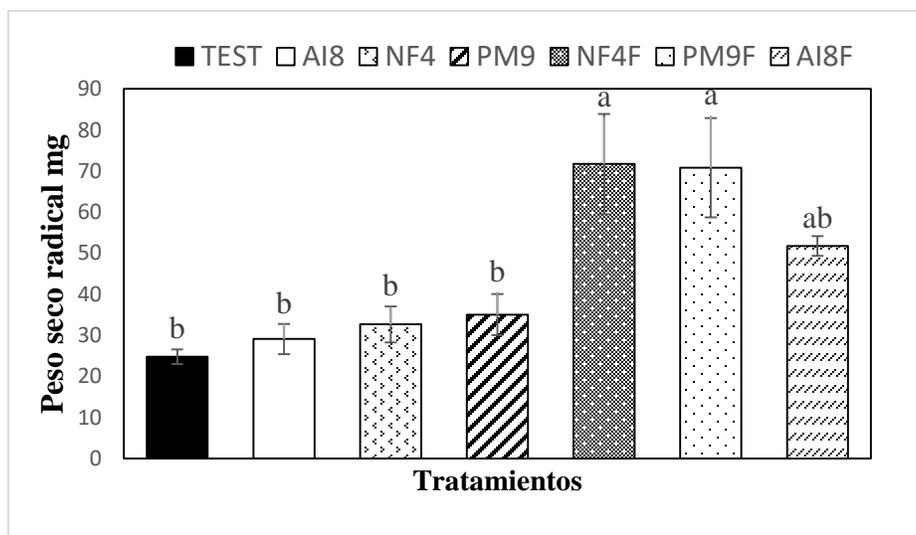
### 5.5 Ensayo *in vitro* de filtrados bacterianos en maíz

Para verificar el efectos de las cepas que desarrollaron mayor crecimiento radical. Plantas de maíz *in vitro* de 10 d después de siembra en medio MS se inocularon con células bacterias o filtrados de las cepas NF4, PM9 y AI8 por ser de las cepas que promovieron mayor el desarrollo radical en maíz. No se utilizaron bacterias provenientes de *M. becheei* porque no mostraron diferencia significativa en la raíz cuando se inocularon. El peso seco radical de las plantas fue contrastante en ambos experimentos y notorio en uno. Cuando las plantas se expusieron a cualquier cepa, no hubo diferencia estadística en comparación con el peso radical de las plantas sin inocular, no obstante, cuando se adicionaron los filtrados de cultivo dos tratamiento mostraron diferencia significativa. El peso seco radical incremento 46.9 mg en plantas a las que se le adicionó filtrado de la cepa NF4 (NF4F), 46 mg en los que provenían de PM9, mientras que en el tratamiento AI8F no hubo diferencias significativa (Figura 12).

Los filtrados bacterianos son libres de células y contienen metabolitos que los microorganismos sintetizan durante su crecimiento, enzimas, péptidos, ácidos orgánicos, hormonas (AIA, giberelinas), entre otros (Aldesuquy *et al.*, 1998; Fukami *et al.*, 2017; Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001). Los filtrados han sido utilizados por su capacidad de poseer propiedades antifúngicas para el control de enfermedades (Bach *et al.*, 2016; Pineda-Mendoza *et al.*, 2019), inducir la germinación (Sorty *et al.*, 2016) o estimular el desarrollo de las plantas (Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001). Es probable que la inducción del desarrollo se deba a una hormona bacteriana activa en el medio de cultivo, las cuales tienen las mismas funciones que las sintetizadas por plantas, como se demostró con las giberelinas de *Bacillus pumilus* y *Bacillus licheniformis* (Gutierrez-Mañero *et al.*, 2001), a su vez los extractos de cultivos de *Azospirillum brasilense* tuvieron efectos similares al AIA exógeno

en el desarrollo de pelos laterales en trigo, así mismo se ha atribuido al AIA de *Paenibacillus* el responsable de incitar el crecimiento de raíces adventicias en *Eustoma grandiflorum* al adicionar 2 mg L<sup>-1</sup> de la hormona bacteriana en medio de cultivo MS (Fuentes-Escobar *et al.*, 2019).

Las células o filtrados de las plantas cambiaron la expresión génica en la raíz y hojas de maíz, se determinó que los metabolitos en el cultivo eran los responsables de la respuesta vegetal, debido a que el contenido de células disminuyó rápidamente en los tejidos (Fukami *et al.*, 2017). En otro estudio se ha evaluado la acción de los metabolitos a ensayos en sustrato, Calvo *et al.* (2017) encontraron que la implementación de células bacterianas en maíz igualó el efecto de los cultivo sin bacterias, alcanzando el nivel de promoción en el cambio de la morfología de la raíz que generan las células bacterianas al inocularse en suelo.



**Figura 12.** Peso seco radical de plantas de maíz sin inoculación e inoculadas *in vitro* con células de las cepas AI8, NF4 y PM9 o sus filtrados AI8F, NF4F y PM9F. Letras diferentes sobre el tratamiento indican diferencias significativas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## 5.6 Efecto de la inoculación de bacterias en lechuga

### 5.6.1 Influencia de la inoculación bacteriana en el peso fresco

El peso fresco se considera una variable imprecisa para evaluar las plantas tras ser inoculadas por bacterias con potencial para la agricultura. Es una variable versátil a cambios en el manejo de los tejidos vegetales, se perturba fácil al incremento de temperatura (perdida de agua en tejidos), y provoca errores en el registro de datos cuando el procesamiento de las muestras no se realiza en áreas óptimas para el pesaje; sobreestimado los valores (Huang *et al.*, 2017).

A pesar de lo anterior, el peso fresco se tomó en cuenta en esta evaluación, pues el valor comercial de las lechugas depende del contenido total de agua en el tejido, además, investigaciones recientes sobre microorganismos promotores del crecimiento vegetal lo han registrado (Lee *et al.*, 2020; Sahin *et al.*, 2015).

El peso fresco de las lechugas evaluado a los 30 d post inoculación se favoreció en 26 tratamientos inoculados. Los 10 tratamientos con mejor rendimiento en peso fresco correspondieron a la cepas Mb6E (*P. geniculata*), Mb8E (*Bacillus pacificus*), Mb11E (*B. pacificus*), Mb13Tb, Mb14Tb, Mb20N (*B. panaciterrae*), Mb26N (PIZP\_s), Mb30P (*B. zhangzhouensis*) Mb32P (*B. zhangzhouensis*) y ACC2, de las cuales solo la última pertenece a los aislamientos realizados de la rizosfera de maíz. El incremento del peso fresco fue de 50% (Mb13Tb y *B. panaciterrae* Mb20N) hasta 60% (ACC2 y *B. zhangzhouensis* Mb32P) y 61 % por la bacteria *B. zhangzhouensis* Mb30P. El aumento por las cepas restantes mencionadas fluctuó en porcentajes intermedios, mientras que las no mencionadas favorecieron de 38% (*Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* Mb7E) a 49 % por *Staphylococcus kloosii* Mb24N (Cuadro 5).

Se ha demostrado que el contenido total de agua en varios cultivos se mejora al ser expuestos a BPCP (Alguacil *et al.*, 2009; Armada *et al.*, 2015; Sahin *et al.*, 2015). Es probable que el cambio en el peso fresco influenciado por el agua en las lechugas se deba a la capacidad de las bacterias de cambiar la expresión génica de la planta y ayudar a la absorción y transporte de la misma. De acuerdo con del Mar *et al* (2009) las acuaporinas, proteínas encargadas de aumentar el estado de agua en la planta a través del ajuste de la conductividad hidráulica se regularon a la alza en lechuga por *Pseudomonas mendocina*. Por otra parte Sahin *et al* (2015), determino que especies del genero *Bacillus* incrementan el peso fresco de la lechuga al inducir la acumulación de agua y el contenido de esta en las hojas, mejoran la eficiencia de la conductancia estomática y en situaciones de déficit hídrico en el suelo, se reduce la fuga de electrolitos.

### **5.6.2 Influencia de la inoculación bacteriana en el área foliar**

El tamaño de las hojas de la lechuga es una característica importante en su comercio porque agrega valor en masa vegetal por planta. 11 cepas mostraron diferencia significativa en el desarrollo foliar respecto al área de las hojas del tratamiento sin inoculación. Las once (*P. geniculata* Mb6E, *B. pacificus* Mb8E, *B. pacificus* Mb11, Mb12Tb, Mb13Tb, *C. nuruki* Mb19N, *Staphylococcus kloosii* Mb24N, *Staphylococcus kloosii* Mb27N, *B. zhangzhouensis* Mb30P, *B. zhangzhouensis* Mb32P y ACC2), se encuentran el grupo que incidieron en la absorción de agua, reflejado en el peso fresco de la planta. Las cepas ACC2 y *P. geniculata* Mb6E, ejercieron mayor desarrollo foliar. El área de las hojas incremento en 58% (128 cm<sup>2</sup>) cuando las plantas se inocularon con ACC2 y 57% (125 cm<sup>2</sup>) con las cepa Mb6E *P. geniculata*, estos datos en contraste a las plantas testigo sin bacterias que tuvieron área de 213.3 cm<sup>2</sup>. Los tratamientos restantes también tuvieron valores sobresalientes, los

porcentajes de área por encima de plantas testigo oscilaron entre 49 % (Mb12Tb) y 53% (*B. zhangzhouensis* Mb32P) (Cuadro 5).

En las plantas, procesos fisiológicos como senescencia de hojas, maduración del fruto, elongación de entrenudos, cierre y apertura de estomas, dormancia, diferenciación, entre otros, están controlados por reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas (GA), ácido abscísico, etileno y citocininas (Davies *et al.*, 2010). El desarrollo de más hojas o la expansión de las mismas en las plantas son las dos características que explican el aumento del área foliar. Las auxinas, familia de fitohormonas donde se incluye al AIA, participan en el desarrollo de las hojas al igual que las GA. En lo que considera al AIA, en frijol esta variable es afectada por la inhibición del transportador de la auxina y la exposición prolongada a alfa naftaleno acético, lo cual redujo la expansión foliar, caso contrario a lo que la adición constante de AIA causó (Keller *et al.*, 2004). En *Arabidopsis* y tabaco, se demostró que el AIA es útil para la división celular durante el desarrollo temprano de las hojas, al iniciar el proceso el contenido en tejido se eleva y una vez finalizado e iniciada la elongación celular su contenido cae drásticamente (Ljung *et al.*, 2002). El control del crecimiento y desarrollo también se corroboró en hojas de té (Wang *et al.*, 2020). Por otra parte, las GA modulan la elongación de los entrenudos del tallo, además, su carencia en las plantas causa cambios en la morfología de la hoja y minimiza su tamaño (Li *et al.*, 2012).

Aún con la información que se sabe a cerca de la función directa o indirecta que tienen las auxinas, en específico el AIA, no se conoce si el procedente de la síntesis bacteriana sea el protagonista del incremento del área foliar en los tratamientos, a razón de que bacterias que produjeron AIA *in vitro* no se expresaron en los resultados conseguidos como es el caso de las cepas AI2, AI8, AI15, PM8, PM9, 1R1B y 2AR1B, aisladas de la rizosfera de maíz y las

cepas *Enterobacter ludwigii* Mb2E, *B. panaciterrae* Mb20N, *PIZP\_s* Mb26N, *LGUF\_s* Mb28P y *CP018758\_s* Mb29. Cabe mencionar también el desconcierto de que cualquiera de las bacterias aquí trabajadas sintetice GA, a la cual se le atribuya la respuesta en la planta, en particular porque algunas rizobacterias tienen la capacidad de producirla (Radhakrishnan *et al.*, 2016), o bien, que ciertos compuestos volátiles bacterianos regulen el estado de la auxina o estimulen la síntesis de enzimas que realizan funciones de degradación de la pared celular y expansión de la hoja (Zhang *et al.*, 2007). No obstante se conoce que bacterias AIA y GA positivas establecen una asociación benéfica cuando son adicionadas a las plantas (Aponte *et al.*, 2017; Radhakrishnan *et al.*, 2016).

Los resultados destacados en el área foliar concuerdan con lo reportado por Aponte *et al.* (2017) en lechuga, al aplicar *Azospirillum sp.* y *P. fluorescens*, ambas productoras de AIA propiciaron beneficio desde germinación hasta cosecha, en particular en el área foliar total de las plantas inoculadas. En el mismo cultivo, Marulanda-Aguirre *et al.* (2007) reportaron que la inoculación con *B. megaterium* promueve el desarrollo total de las hojas hasta en 51%, mientras que en mezcla mixta con hongos micorrízicos difieren los resultados sobre la planta, benéficos o perjudiciales, puesto que la asociación que estos forman con la bacteria depende de la adaptabilidad del ambiente al que se van a estudiar, incluso al ser la misma especie. En cuanto a la giberelina, induce e incita en lechuga la expresión de más hojas con mayor tamaño (Miceli *et al.*, 2019), similar a lo que sucede cuando las GA son de procedencia bacteriana y se encuentran activas (Radhakrishnan *et al.*, 2016).

### 5.6.3 Influencia de la inoculación bacteriana en el peso seco

El peso seco aéreo de las plantas de lechuga se incrementó en todos los tratamientos. El aumento fue de 13% cuando se expuso a la cepa 1R1B y hasta 63% cuando se inocularon con Mb32P. La bacteria Mb19N aumento 60%, la Mb8E 57% y la Mb28P 55%, mientras que la cepa de maíz que consiguió mejores valores fue la ACC2 con 53%. El peso seco radical destacó en cuatro tratamientos en general. La cepa Mb32P, Mb19N, AI2 y Mb15Tb estimularon el peso seco radical 65, 100, 109 y 110% respectivamente (Figura 16).

A pesar de los datos porcentuales que numéricamente indican la promoción de más de la mitad del peso seco aéreo y más del doble del peso seco radical, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas en ninguno de los tratamientos en estas variables (Cuadro 5). Lo anterior sugiere que los mecanismos que influyen el peso seco radical y aéreo pueden ser diferentes a los que indujeron el incremento del área foliar y peso fresco.

Los mecanismos por los cuales las BPCP mejoran el desarrollo de las plantas están bien definidos (solubilización de fosfato, síntesis de sideróforos y hormona vegetales y fijación de nitrógeno) (Durante *et al.*, 2016). Bajo las condiciones que se realizó el experimento solo se puede adjudicar a la fijación de nitrógeno y la síntesis de AIA y otros reguladores bacterianos. Cabe mencionar que la procedencia de las cepas también es un factor que influye en la compatibilidad en la promoción del crecimiento. Por ejemplo, Durante *et al.* (2016) encontraron que la bacteria del género *Burkholderia* y *Bacillus*, procedente de *Paullinia cupana* aumentaban el crecimiento y el peso seco radical y aéreo de maíz más del 130%, mientras que el efecto en soya no fue el mismo, puesto que el peso seco radical no cambio. El efecto incluso puede darse en plantas de la misma especie, otro ejemplo claro es la

inoculación de *Azospirillum* que solo aumentó el peso seco en maíz PR37Y15 pero no del DK315, de acuerdo con la investigación *Azospirillum* sp. ocasiona cambios diferentes en el proceso de síntesis de metabolitos en las dos plantas, los cuales son los responsables del crecimiento (Walker *et al.*, 2010). Esto conlleva a que a pesar de los rasgos bioquímicos importantes de selección de bacterias para la agricultura no sobresalgan en algunos cultivos.

### **5.7 Ensayo de germinación**

El porcentaje de germinación se registró a los 5 días y se tomó en cuenta la emergencia de la radícula, sin embargo, para ver el efecto de las bacterias a largo plazo durante el desarrollo de plántula se realizaron observaciones hasta los 15 días. La inoculación en las semillas tuvo reacciones diferentes. No hubo aumento notorio de la germinación a los 5 días después de inoculación (ddi). Por el contrario la cepa 2AR1B, PM9, ACC2, *Enterobacter ludwigii* Mb2E, *P. geniculata* Mb6E, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* Mb7E redujeron el porcentaje 37, 58, 17, 34, 24 y 27 % respectivamente. 15 ddi, las plántulas vivas y el desarrollo continuo de la radícula lo redujeron algunas bacterias. Se registró la detención de la emergencia de la radícula. Al finalizar germinaron 26 semillas del tratamiento sin inoculación, lo que hace referencia a la viabilidad de las mismas y que el efecto benéfico no sea destacado por las bacterias. Cabe mencionar que 15 ddi dos bacterias (PM3 y AI15) ocasionaron necrosis y detuvieron el desarrollo completo de la plántula y del continuo crecimiento de la radícula, el resto se mantuvo en sintonía con el testigo (Figura 13).

Hay reportes de bacterias que establecen una asociación benéfica con las plantas promoviendo su crecimiento, pero que además de hacerlo, pueden ocasionar necrosis en la punta de la raíz sin inducir daños en el crecimiento (Kloepper y Schroth 1981). Es

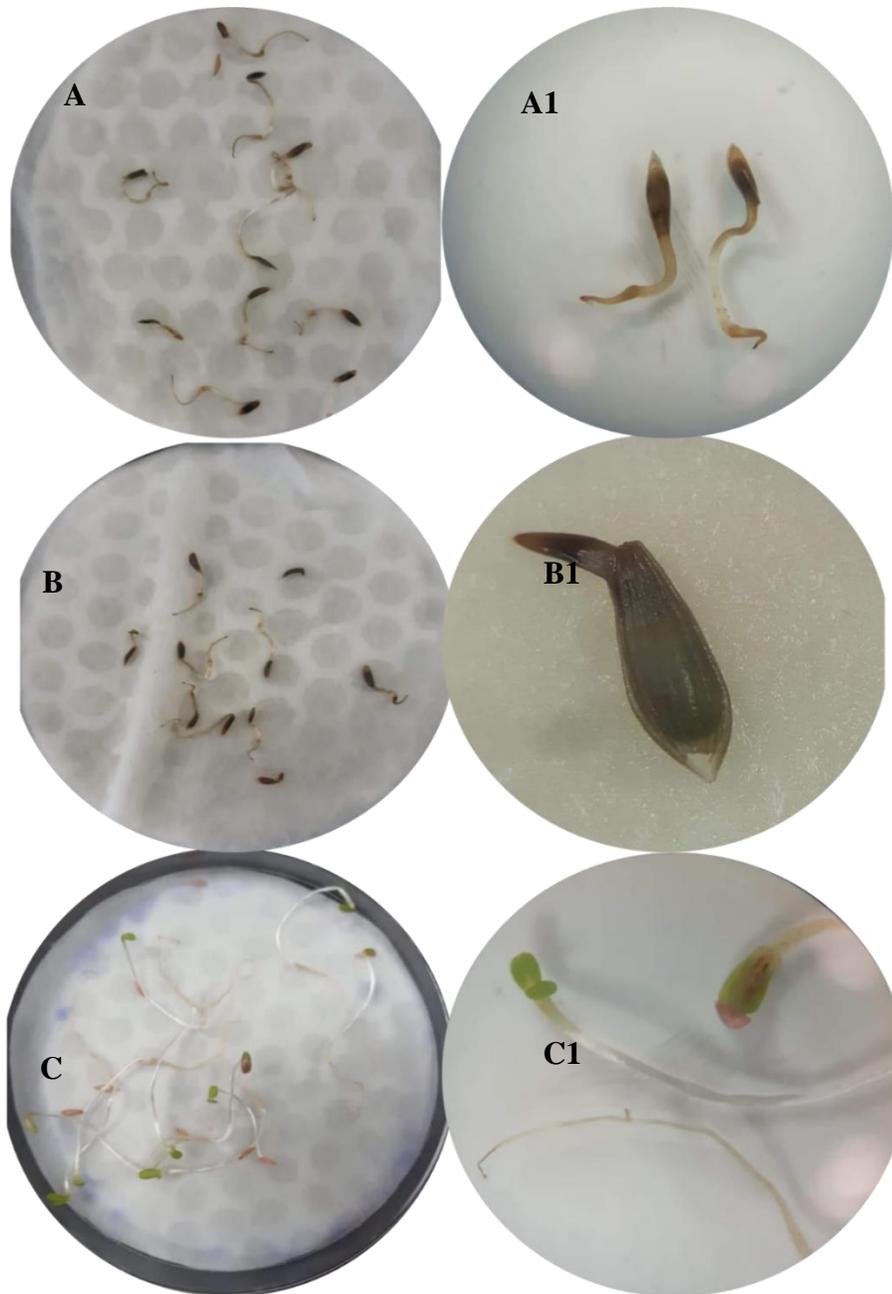
recomendable realizar pruebas de patogenicidad cuando se desea realizar un experimento específico sobre una característica de promoción del crecimiento por microorganismos, ya sea en germinación o en planta, cuando los aislamientos se realizan de un organismo diferente al que se va a trabajar, debido a que las pruebas de hipersensibilidad pueden resultar positivas a los microorganismos promotores (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001; Fatmawati *et al.*, 2019).

La latencia o germinación de las semillas dependen de las condiciones externas. El proceso como tal está regulado por varios factores, entre los que se incluyen la temperatura (Xia *et al.*, 2018) y las hormonas vegetales que son producidas por las plantas y por algunas bacterias del suelo (Miransari *et al.*, 2014). Este también está controlado por especies reactivas de oxígeno, etileno, giberelinas y ácido abscísico. El etileno y las giberelinas se asocian con la estimulación de la germinación (El- Maarouf-Bouteau *et al.*, 2015; Gashi *et al.*, 2012), mientras que el ácido abscísico con la inhibición (El-Maarouf-Bouteau *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2015). Por otra parte, el ácido indol acético a pesar de ser una fitohormona producida por bacterias del suelo no es indispensable en la germinación, pero sí para el crecimiento de las plántulas (Hentrich *et al.*, 2013).

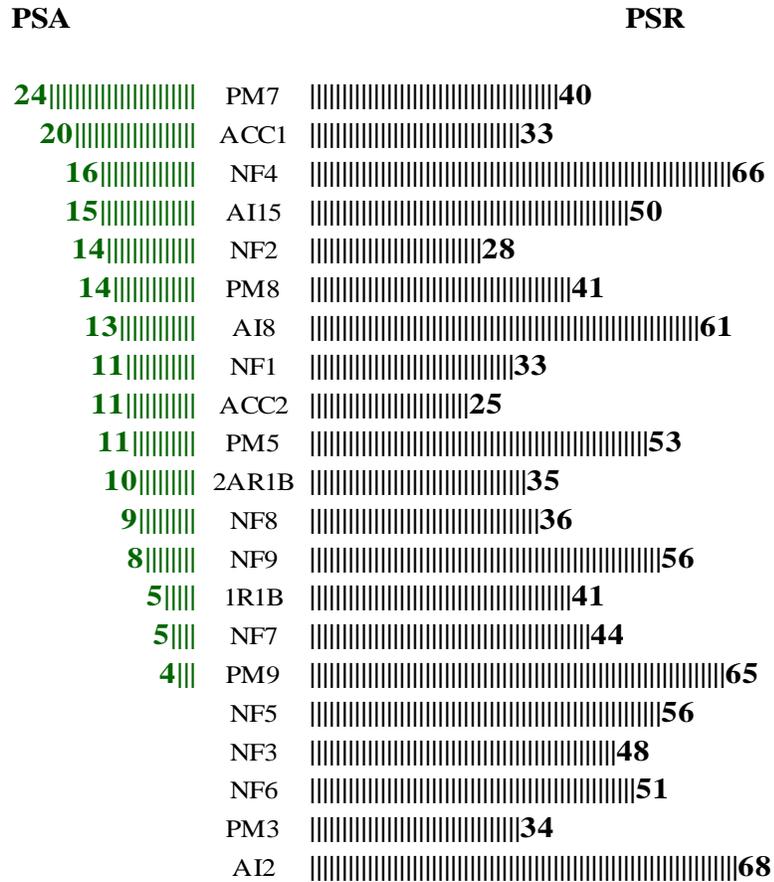
Si bien, diversos estudios han analizado el efecto de las bacterias sobre la germinación, en particular porque se conoce que varias especies la inducen y la mejoran (Mangman *et al.*, 2016; Radhakrishnan *et al.*, 2016; Sorty *et al.*, 2016), también hay resultados contrarios, en donde las bacterias la inhiben (Hoang *et al.*, 2005; Miché *et al.*, 2000). Por ejemplo, en lechuga *B. methylotrophicus* KE2 positivas para AIA y giberelinas, indujeron la promoción de la germinación hasta 400 % (Radhakrishnan *et al.*, 2016), mientras que *Azospirillum* sp. y *P. fluorescens* en condiciones *in vitro* no hubo efecto (Aponte *et al.*, 2016). *Azospirillum*

*brasiliense*, una bacteria estudiada por su potencial en la agricultura, produjo un compuesto orgánico soluble en alcohol que al aplicarlo de forma exógena inhibía la germinación de *Orobancha aegyptica* (Dadon *et al.*, 2004).

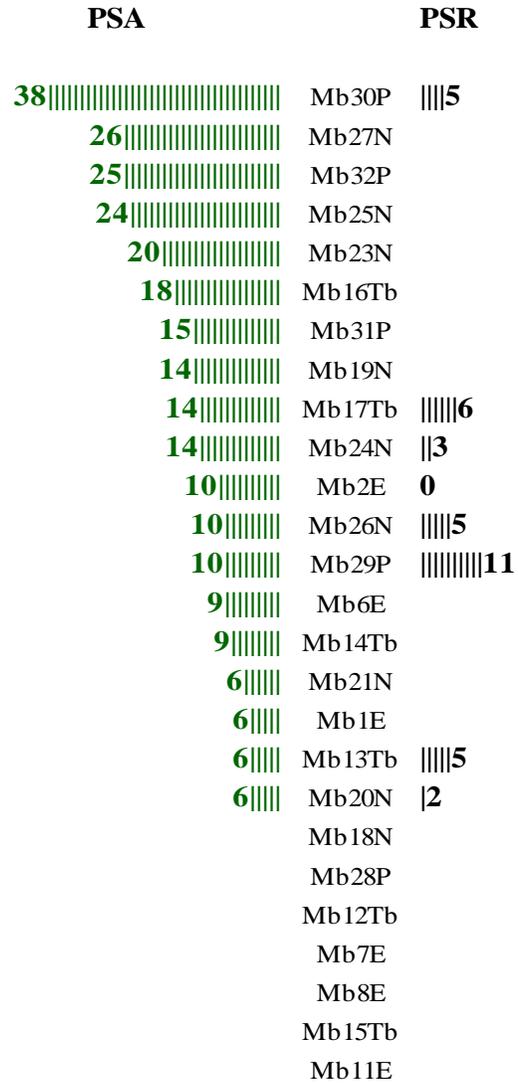
En el ensayo *in vitro* cinco de las seis cepas que afectaron más la germinación producen AIA (2AR1B, PM9, ACC2, *Enterobacter ludwigii* Mb2E, *P. geniculata* Mb6E) y como se mencionó anteriormente, es una hormona que no es requerida en su totalidad para la emergencia de la radícula a lo que se atribuye que parte del proceso pudo ser impedido por el AIA bacteriano. En lechuga es una de las plantas en la que se confirmó esto (Khan *et al.*, 1966). Respecto al AIA bacteriano, Sorty *et al.* (2016), validaron en *Psoralea corylifolia* L., que las cepas que producen mayor AIA provocan la germinación de las semillas con éxito. Otra característica importante es la regulación que las bacterias logran con sus metabolitos. El AIA de *Pseudomonas* sp. redujo la actividad enzimática de la amilasa, la enzima responsable de convertir el almidón en azúcar soluble para el desarrollo del trigo durante la germinación, lo cual se corroboró con la adición exógena de la hormona (Tabatabai *et al.* 2016).



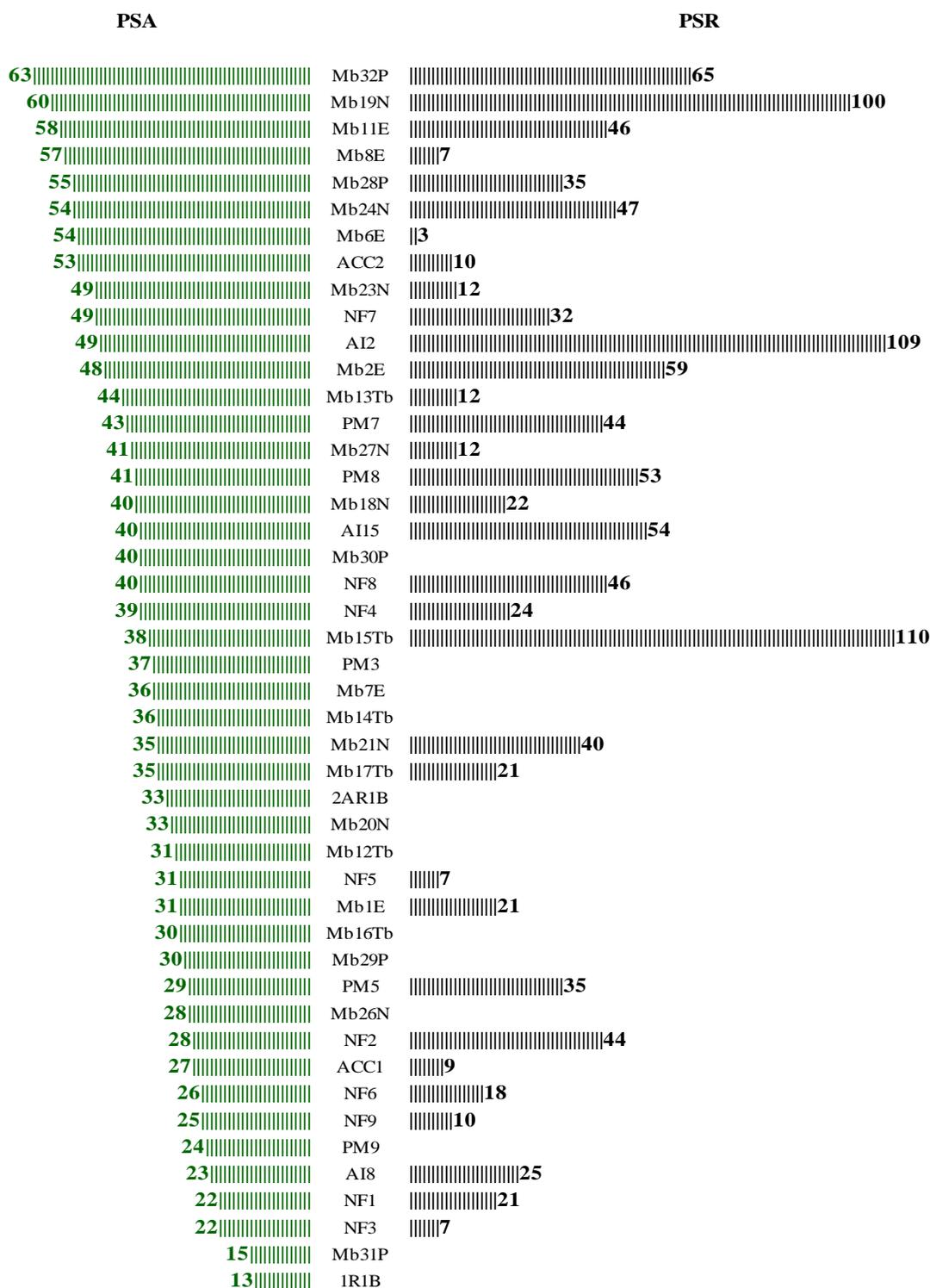
**Figura 13.** Efectos negativos de la inoculación en semillas de lechuga. Vista es caja Petri PM3 (A), AI15 (B), testigo (C), vista en estereoscopio PM3 (A1), AI15 (B1) y testigo (C1).



**Figura 14.** Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en maíz de las cepas aisladas de la rizosfera de Maíz.



**Figura 15.** Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en maíz por las cepas aisladas de *M. becheii*.



**Figura 16.** Incremento porcentual del peso seco aéreo y radical en lechuga provocado por las cepas aisladas de la rizosfera de maíz y *M.beecheii*.

**Cuadro 3.** Efecto de la inoculación de las cepas rizosféricas en la altura y peso seco de maíz.

<b>Tratamiento</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Peso seco aéreo (mg)</b>	<b>Peso seco radical (mg)</b>
ACC1	58±2.5 a	735±27 a	532±44 ab
ACC2	50.9±2 abcde	684±23 a	501±18 ab
1R1B	44.9±1.5 bcde	647±23 a	565±47 ab
2AR1B	52.6±2.2 abc	674±43 a	539±30 ab
NF1	46.1±1 abcde	684±32 a	530±37 ab
NF2	54.6±1.4 ab	702±22 a	510±66 ab
NF3	44.8±1.2 bcde	594±24 a	593±37 ab
NF4	51.7±1.5 abcd	712±7 a	664±42 a
NF5	43.5±2.1 bcde	610±55 a	622±58 ab
NF6	44.6±3.8 bcde	584±4 a	605±52 ab
NF7	47.1±1.9 abcde	643±19 a	577±35 ab
NF8	47.2±2.2 abcde	672±58 a	545±24 ab
NF9	40.2±2.1 cde	665±54 a	622±19 ab
PM3	45.0±3.8 bcde	579±41 a	535±50 ab
PM5	45.6±2.3 abcde	680±98 a	612±34 ab
PM7	51.5±2.6 abcd	759±2 a	559±49 ab
PM8	52.7±3.4 abc	699±33 a	564±34 ab
PM9	38.8±2.6 e	635±89 a	661±53 a
AI2	39.3±3 de	570±34 a	671±12 a
AI8	46.9±0.09 abcde	693±69 a	644±69 a
AI15	43.4±2.1 bcde	706±43 a	600±21 ab
Testigo	51.7±1.4 abcd	614±11 a	400±49 b

Medias con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Medias  $n=3 \pm EE$ .

**Cuadro 4.** Efecto de la inoculación de las cepas aisladas de *M. beecheii* en la altura y peso seco de maíz.

Tratamiento	Altura (cm)	Peso seco aéreo (mg)	Peso seco radical (mg)
Mb1E	64.6±2 a	567±53 a	222±17 a
Mb2E	66.4±1.4 a	590±68 a	221±43 a
Mb6E	70.1±2.2 a	586±44 a	183±20 a
Mb7E	68.7±4.9 a	500±73 a	201±34 a
Mb8E	65.5±5.7 a	485±63 a	217±1 a
Mb11E	64.4±4.5 a	477±69 a	167±12 a
Mb12Tb	70.8±1.2 a	516±11 a	196±13 a
Mb13Tb	69.1±5 a	567±43 a	249±13 a
Mb14Tb	68.7±4.3 a	582±43 a	202±28 a
Mb15Tb	64±3.1 a	484±60 a	201±24 a
Mb16Tb	67.3±4 a	632±41 a	231±24 a
Mb17Tb	68.9±4 a	610±30 a	252±7 a
Mb18N	63.6±2.8 a	534±11 a	212±23 a
Mb19N	68.6±1.7 a	613±31 a	205±29 a
Mb20N	70.6±2.6 a	566±43 a	241±17 a
Mb21N	65.7±1.7 a	569±44 a	229±26 a
Mb23N	73.4±2.2 a	642±26 a	237±35 a
Mb24N	68.2±4.4 a	609±48 a	243±12 a
Mb25N	75.8±1.7 a	667±55 a	209±23 a
Mb26N	64.6±1 a	589±17 a	250±40 a
Mb27N	70.2±0.5 a	675±10 a	222±14 a
Mb28P	70.9±3.2 a	518±71 a	197±23 a
Mb29P	62.2±3.6 a	588±45 a	263±23 a
Mb30P	74.8±5.4 a	738±84 a	248±37 a
Mb31P	64.4±3.4 a	616±59 a	205±18 a
Mb32P	71±3.9 a	672±77 a	222±32 a
Testigo	67.3±2.2 a	536±38 a	237±12 a

Medias con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Medias  $n=3 \pm EE$ .

**Cuadro 5.** Efecto de la inoculación de las cepas rizosféricas y aisladas de *M. becheii* en el peso fresco, área foliar y peso seco de lechuga.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Peso seco aéreo (mg)	Peso seco radical
Mb1E	9.2±0.6 abc	290.8±15.7 ab	589±29 ab	82±15abc
Mb2E	10.2±0.8 ab	291±21.7 ab	668±79 ab	108±5 abc
Mb6E	11.3±0.3 ab	345.2±24 a	695±77 ab	70±18 abc
Mb7E	10.1±0.5 ab	294.7±19 ab	615±57 ab	68±14 abc
Mb8E	11.5±0.5 ab	326.3±31.1 a	707±80 ab	73±16 abc
Mb11E	11.6±0.8 a	327±24.5 a	711±73 ab	99±7 abc
Mb12Tb	10.3±0.3 ab	317.4±22.2 a	592±16 ab	56±3 abc
Mb13Tb	11±0.7 ab	322.6±17.7 a	648±32 ab	76±8 abc
Mb14Tb	116±0.3 ab	303.4±19.5 ab	613±60 ab	48±20 bc
Mb15Tb	9.6±0.7 abc	288.3±30.6 ab	621±109 ab	143±20 a
Mb16Tb	10.1±0.7abc	291.2±25.9 ab	588±52 ab	61±8 abc
Mb17Tb	10.2±1.1 ab	307±34.4 ab	609±71 ab	82±16 abc
Mb18N	10.1±0.3 abc	292±2.1 ab	632±14 ab	83±12 abc
Mb19N	10.5±0.3 ab	322±14.5 a	722±56 ab	136±34 ab
Mb20N	11±0.7 ab	299.8±25.6 ab	599±48 ab	64±21 abc
Mb21N	9.7±0.4 abc	288.3±16.3 ab	611±54 ab	95±11 abc
Mb23N	10±0.3 abc	306.7±21.2 ab	674±102 ab	76±20 abc
Mb24N	10.9±0.3 ab	326.9±12.8 a	697±45 ab	100±10 abc
Mb25N	10±0.8 abc	283±26.5 ab	434±34 b	18±4 c
Mb26N	11.1±0.5 ab	304.4±9 ab	578±27 ab	48±7 abc
Mb27N	10.6±0.6 ab	323.6±23.7 a	636±52 ab	76±13 abc
Mb28P	10.8±0.5 ab	302.8±16.4 ab	698±40 ab	92±15 abc
Mb29P	10.5±0.4 ab	303.2±19.4 ab	586±62 ab	49±13 abc
Mb30P	11.8±0.3 a	337.2±17.8 a	630±66 ab	55±9 abc
Mb31P	10±0.6 abc	289.9±17.9 ab	518±19 ab	49±11 abc
Mb32P	11.7±1 a	336.3±28.6 a	737±57 a	112±19 abc
ACC1	9.2±0.3 abc	269.9±15 ab	574±63 ab	74±22 abc
ACC2	11.7±1 a	348.2±30.4 a	691±103 ab	75±23 abc
1R1B	8.8±0.5 bc	267.6±21.7 ab	512±59 ab	58±18 abc

Medias con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Medias  $n=4 \pm EE$ .

**Cuadro 5.** Continuación.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso fresco (g)</b>	<b>Área foliar (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Peso seco aéreo (mg)</b>	<b>Peso seco radical</b>
2AR1B	10.4±0.3 ab	313.6±20 ab	602±41 ab	66±13 abc
NF1	8.8±0.5 bc	278.2±16.7 ab	549±45 ab	82±20 abc
NF2	9±0.5 abc	277.7±17.1 ab	577±57 ab	98±21 abc
NF3	9.2±0.4 abc	270.5±15.4 ab	548±39 ab	73±14 abc
NF4	10.2±0.6 ab	283.7±23.9 ab	629±44 ab	84±19 abc
NF5	10.1±0.2 abc	293.5±14.5 ab	590±57 ab	73±18 abc
NF6	9.3±0.1 abc	273.4±5.7 ab	567±23 ab	80±12 abc
NF7	11.5±0.3 ab	313±18.3 ab	672±36 ab	90±18 abc
NF8	9.9±0.4 abc	295.8±11.9 ab	629±39 ab	99±8 abc
NF9	10.1±1 ab	283.5±35.1 ab	565±70 ab	75±10 abc
PM3	10.3±0.3 ab	306.9±16.6 ab	617±95 ab	63±20 abc
PM5	9.5±0.5 abc	288.2±25.8 ab	580±53 ab	92±19 abc
PM7	10.1±0.6 abc	285.9±18.7 ab	645±62 ab	98±18 abc
PM8	9.8±0.4 abc	286.7±15.3 ab	635±68 ab	104±18 abc
PM9	9.9±0.8 abc	290.8±22 ab	561±81 ab	64±12 abc
AI2	10.6±0.9 ab	312.1±39.8 ab	672±91 ab	142±27ab
AI8	10.3±0.08 ab	306.4±13.9 ab	556±66 ab	85±10 abc
AI15	9.7±1 abc	280.7±23.4 ab	631±41 ab	105±6 abc
T	7.3±0.2 c	219.3±12 b	451±50 ab	68±14 abc

Medias con la misma letra en la columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Medias  $n=4 \pm EE$ .

## VI. CONCLUSIONES

- Bacterias con rasgos de promoción del crecimiento vegetal se asocian con la rizosfera de maíz.
- Las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera poseen mecanismos diferentes de promover el crecimiento y de sintetizar AIA y solubilizar fosfato a diferentes concentraciones.
- Las cepas asociadas a maíz y *M. becheii* son candidatas para utilizarse en la agricultura sustentable por promover el crecimiento en maíz, aumentar la absorción de agua, el desarrollo radical y foliar en lechuga.
- Las bacterias que provienen de la rizosfera y *M. becheii* no son útiles en la inducción de la germinación de lechuga.

## VII. LITERATURA CITADA

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*. 29: 29-34.
- Airaki, M., Leterrier, M., Valderrama, R., Chaki, M., Begara-Morales, J.C., Borroso, J.B., del Río, L.A., Palma, J.M., Corpas, F.J. 2015. Spatial and temporal regulation of the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species during the early development of pepper (*Capsicum annuum*) seedlings. *Annals of botany*. 116: 679-693. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv023>.
- Aldesuquy, H.S., Mansour, F.A., Abo-Hamed, S.A. 1998. Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. *Folia Microbiologica*. 43: 465-470. <https://doi.org/10.1007/BF02820792>.
- Alguacil, M. del M., Kohler, J., Caravana, F., Roldán, A. 2009. Differential effects of *Pseudomonas mendocina* and *Glomus intraradices* on lettuce plants physiological response and aquaporin PIP2 gene expression under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and drought. *Microbial ecology*. 58: 942. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9544-6>.
- Allard-Massicotte, R., Tessier, L., Lécuyer, F., Lakshmanan, V., Lucier, J.F., Garneau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais. H.P., Beauguard, P.B. 2016. *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors. *American society of microbiology*. 7: e01664-16. [10.1128/mBio.01664-16](https://doi.org/10.1128/mBio.01664-16).
- Alori, E. T., Glick, B.R., Babalola, O.O. 2017. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*. 8: 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Brenciani, A., Mazzoni, L., Gasparrini, M., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Morroni, G., Simoni, S., Forbes-Hernandez, T.Y., Afrin, S., Giovanetti, E. Afrin, S. 2018. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys:

- A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT - Food Science and Technology*. 87: 272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>.
- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., Hernandez, Y. 2017. Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum* sp. association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *Journal of Central European Agriculture*. 18: 424-440. 10.5513/JCEA01/18.2.1916
- Armada, E., Azcón, R., López-Castillo, O.M., Calvo-Polanco, M., Ruiz-Lozano, J.M. 2015. Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*. 90: 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.03.004>.
- Babana, A.H., Samaké, F., Maïga, K. 2011. Characterization of some agricultural soils: presence and activity of Tilemsi rock phosphate-solubilizing thiobacilli. *British Microbiology Research Journal*. 1:1-9.
- Bach, E., dos Santos, S.G.D., de Carvalho, F.G., Lisboa, B.B., Passaglia, L.M.P. 2016. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied soil ecology*. 99: 141-149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., del Valle, M.V., Pérez, A., Zepeda, A., Zenteno, E. 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*. 33: 167-172. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00126-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00126-7).
- Bakker, P.A., Berendsen, R.L., Doornbos, R.F., Wintermans, P.C., Pieterse, C.M. 2013. The rhizosphere revisited: root microbiomics. *Frontiers in plant science*. 4: 165. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00165>.

- Bal, H.B., Das, S., Dangar, T. K., Adhya, T. K. 2013. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of basic microbiology*. 53: 972-984. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200445>.
- Barea, J.M., Richardson, A.E. 2015. Phosphate mobilisation by soil microorganisms. In: B. Lugtenberg, ed. *Principles of plant-microbe interactions*. Springer, Cham. pp. 225-234.
- Barra, P.J., N.G. Inostroza, M.L. Mora, D.E. Crowley y M.A. Jorquera. 2017. Bacterial consortia inoculation mitigates the water shortage and salt stress in an avocado (*Persea americana* Mill.) nursery. *Applied Soil Ecology*. 111: 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.012>
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E. 2015. Inoculant preparation and formulations for *Azospirillum* spp. In: F. Cassán, eds. *Handbook for Azospirillum Technical issues and protocols*. Springer, Cham. pp. 469-488.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A., de-Bashan, L. E. 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 49:1-2. [10.1007/s00374-012-0756-4](https://doi.org/10.1007/s00374-012-0756-4).
- Batista, B.D., Lacava, P.T., Ferrani, A., Teixeira-Silva, N.S., Bonatelli, M.L., Tsui, S., Mondin, M., Kitajima, E.W., Pereira, J.O., Azevedo, J.L., Quecine, M.C. 2018. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological research*. 206:33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>.
- Beasley, J.T., Bonneau, J.P., Johnson, A.A. 2017. Characterisation of the nicotianamine aminotransferase and deoxymugineic acid synthase genes essential to Strategy II iron uptake in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS one*. 12: e0177061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177061>.

- Bedoya, C., Warburton, M., Mir, C., Charcosset, A. 2010. Migración del Maíz a partir de su centro de origen, evidencias históricas, genéticas y paleobotánicas. In: Carlos de L., eds. El cultivo de maíz TEMAS SELECTOS. Vol. 2. México, México: Mundi prensa. pp.15.
- Bernales, M., Monsalve, L., Ayala-Raso, A., Valdenegro, M., Martínez, J.P., Travisany, D., Defilippi, B., González-Agüero, M., Cherian, Sam., Fuentes, L. 2019. Expression of two indole-3-acetic acid (IAA)-amido synthetase (GH3) genes during fruit development of raspberry (*Rubus idaeus* Heritage). *Scientia horticulturae*. 246: 168-175. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.077>.
- Bertrand, S., Larcher, G., Landreau, A., Richomme, P., Duval, O., Bouchara, J.P. 2009. Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals*. 22:1019-1029. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9253-0>.
- Bjelić, D., Marinković, J., Tintor, B., Mrkovački, N. 2018. Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 49: 88-98. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1421650>.
- Bocchini, M., Bartucca, M.L., Ciancaleoni, S., Mimmo, T., Cesco, S., Pii, Y., Albertini, E., Del Buono, D. 2015. Iron deficiency in barley plants: phytosiderophore release, iron translocation, and DNA methylation. *Frontiers in plant science*. 6: 514. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00514>.
- Bric, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 535-538.
- Brusamarello-Santos, L.C Gilard, F., Brulé, L., Quillere, I., Gourion, B., Ratet, P., de Sousa., E.M., Lea, P.J., Hirel, B. 2017. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and

*Azospirillum brasilense*. PLoS one. 12: e0174576.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>

Calvo, P., Watts, D.B., Kloepper, J.W., Torbert, H.A. 2017. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 180: 6-70. <https://doi.org/10.1002/jpln.201500616>.

Camelo-Rusinque M., Vera-Monroy S.P., Bonilla-Buitrago R.R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Revista Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 12: 159-166.

Carcaño-Montiel M.G., López-Reyes L. 2015. Enseñanza de la biotecnología agrícola mediante el uso de inoculantes bacterianos. Educación como política pública clave de PRESERVACIÓN del recurso Suelo. Encuentro Nacional de Docentes e Investigadores de la Ciencia del Suelo. SLCS FAO: Alianza Regional por el Suelo Centroamérica, México y El Caribe. pp. 1-5.

Castellano-Hinojosa, A., Pérez-Tapia, V., Bedmar, E.J., Santillana, N. 2018. Purple corn-associated rhizobacteria with potential for plant growth promotion. Journal of applied microbiology. 124: 1254-1264. <https://doi.org/10.1111/jam.13708>.

Ceballos-Laita, L., Gutierrez-Carbonell, E., Imai, H., Abadía, A., Uemura, M., Abadía, J., López-Millán, A.F. 2018. Effects of manganese toxicity on the protein profile of tomato (*Solanum lycopersicum*) roots as revealed by two complementary proteomic approaches, two-dimensional electrophoresis and shotgun analysis. Journal of proteomics. 185: 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.016>.

Chandra, S., Askari, K., Kumari, M. 2018. Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 16: 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>

- Chaparro, J.M., Badri, D.V., Vivanco, J. M. 2014. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME journal*. 8: 790-803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>.
- Chapelle, E., Mnedes, R., Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M. 2016. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. *The ISME journal*. 10: 265-268. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.82>.
- Chauhan, H., D.J. Bagyaraj, G. Selvakumar y S.P. Sundaram. (2015) Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Applied Soil Ecology* 95: 38-53.
- Chen, W., Yang, F., Zhang, L., Wang, J. 2016. Organic acid secretion and phosphate solubilizing efficiency of *Pseudomonas* sp. PSB12: effects of phosphorus forms and carbon sources. *Geomicrobiology journal*. 33: 870-877. <https://doi.org/10.1080/01490451.2015.1123329>.
- Chen, Y., Yang, W., Chao, Y., Wang, S., Tang, Y.T., Qiu, R.L. 2017b. Metal-tolerant *Enterobacter* sp. strain EG16 enhanced phytoremediation using *Hibiscus cannabinus* via siderophore-mediated plant growth promotion under metal contamination. *Plant and soil*. 413: 203-216. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3091-y>.
- Chen, Z., Chen, M., Jiang, M. 2017a. Hydrogen sulfide alleviates mercury toxicity by sequestering it in roots or regulating reactive oxygen species productions in rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 111: 179-192. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.11.027>.
- Colombo, C., Palumbo, G., He, J.Z., Pinton, R., Cesco, S. 2013. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *Journal of soils and sediments*. 14: 538-548. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0814-z>.
- Cook, S.D., Nichols, D.S., Smith, J., Chourey, P.S., McAdam, E.L., Quittenden, L., Ross, J.J. 2016. Auxin biosynthesis: are the indole-3-acetic acid and phenylacetic acid biosynthesis pathways mirror images?. *Plant physiology*. 171: 1230-1241. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00454>.

- Dadon, T., Nun, N.B., Mayer, A.M. 2004. A factor from *Azospirillum brasilense* inhibits germination and radicle growth of *Orobanche aegyptiaca*. Israel Journal of Plant Sciences. 52: 83-86. <https://doi.org/10.1560/Q3BA-8BJW-W7GH-XHPX>.
- Davies, P. J. 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* 3ra. Edición. Springer, Dordrecht. pp. 1-15.
- de Bruijn F. 2015. Biological Nitrogen Fixation. In: Lugtenberg B. (eds). Principles of Plant-Microbe Interactions. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_23).
- de Vries, I. M. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. Genetic Resources and Crop Evolution. 44: 165-174. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1008611200727>.
- Defez, R., Andreozzi, A., Bianco, C. 2017. The overproduction of indole-3-acetic acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. Microbial ecology. 74: 441-452. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0948-4>.
- Dimkpa, C.O., Svatoš, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W., Kothe, E. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. Chemosphere. 74: 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.079>.
- Ding, Z., Jia, S., Wang, Y., Xiao, J., Zhang, Y. 2017. Phosphate stresses affect ionome and metabolome in tea plants. Plant Physiology and Biochemistry. 120: 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.007>.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D., Glick, B.R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. Antonie Van Leeuwenhoek. 106: 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>.
- Dudenhöffer, J.H., Scheu, S., Jousset, A. 2016. Systemic enrichment of antifungal traits in the rhizosphere microbiome after pathogen attack. Journal of Ecology. 104: 1566-1575. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12626>.

- El-Maarouf-Bouteau, H., Sajjad, Y., Bazin, J., Langlade, N., Cristescu, S. M., Balzergue, S., Baudouin, E. Bailly, C. 2015. Reactive oxygen species, abscisic acid and ethylene interact to regulate sunflower seed germination. *Plant, cell and environment*. 38: 364-374. <https://doi.org/10.1111/pce.12371>.
- Erel, R., Bérard, A., Capowiez, L., Doussan, C., Arnal, D., Souche, G., Le Marié, C. 2017. Soil type determines how root and rhizosphere traits relate to phosphorus acquisition in field-grown maize genotypes. *Plant and soil*. 412: 115-132. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3127-3>.
- Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., Huante, P. 2013. Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnia mexicana*. 36: 251-258.
- Fatmawati, U., Meryandini, A., Nawangsih, A.A., Wahyudi, A.T. 2019. Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 20: 2970-2977. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201027>.
- Fernandes, A.M., Soratto, R.P. 2016. Response of Potato Cultivars to Phosphate Fertilization in Tropical Soils with Different Phosphorus Availabilities. *Potato Research*. 59: 259-278. <https://doi.org/10.1007/s11540-016-9330-z>.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Delgadillo-Martínez, J., Almaraz, J.J., Pérez-Moreno, J. 2016. Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. In: G. Alcántar-González, eds. *Nutrición de cultivos*. 2da Edición.. Texoco, Estado de México, México: Biblioteca Básica de Agricultura. pp. 423-443.
- Finzi, A.C., Abramoff, R.Z., Spiller, K.S., Brzostek, E.R., Darby, B.A., Kramer, M.A., Phillips, R.P. 2015. Rhizosphere processes are quantitatively important components of terrestrial carbon and nutrient cycles. *Global Change Biology*. 21: 2082-2094. <https://doi.org/10.1111/gcb.12816>.

- Fraser, T.D., Lynch, D.H., Gaiero, J., Khosla, K., Dunfield, K.E. 2017. Quantification of bacterial non-specific acid (phoC) and alkaline (phoD) phosphatase genes in bulk and rhizosphere soil from organically managed soybean fields. *Applied soil ecology*. 111: 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.11.013>.
- Fuentes-Escobar, G.I. 2019. Evaluación *in vitro* del potencial de dos cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento en explantes de *Eustoma grandiflorum* (Raf) Shinn (Tesis de Maestría). Colegio de Postgraduados. Texcoco de Mora, Edo. de México.
- Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M. 2018. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*. 45: 328-339. <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1071/FP17167>.
- Fukami, J., Fernandes, A.J.L., del Cerro, P., Nogueira, M.A., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M. 2018. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. *Archives of microbiology*. 200: 47-56. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>.
- Garg, N., Chandel, S. 2015. Role of arbuscular mycorrhiza in arresting reactive oxygen species (ROS) and strengthening antioxidant defense in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. nodules under salinity (NaCl) and cadmium (Cd) stress. *Plant growth regulation*. 75: 521-534. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-0016-8>.
- Gashi, B., K. Abdullai, V. Mata y E. Kongjika. 2012. Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *African Journal of Biotechnology*. 11: 4537-4542.
- Gilliam, M., Buchmann, S.L., Lorenz, B. J., Roubik, D.W. 1985. Microbiology of the larval provisions of the stingless bee, *Trigona hypogea*, an obligate necrophage. *Biotropica*. 17: 28-31.
- Gilliam, M., Roubik, D.W., Lorenz, B.J. 1990. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*. 21: 89-97. <https://doi.org/10.1051/apido:19900201>.

- Glick, B.R. 2015. Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In: B.R. Glick, ed. 2015. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. Springer, Cham. pp.1-28.
- Glickmann, E., Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 61: 793-796.
- Goes, K.C.G.P., de Castro, F.M.L., Cattelan, A.J., Nogueira, M.A., Portela, de C.C. G., Martinez, de O.A. L. 2012. Biochemical and molecular characterization of high population density bacteria isolated from sunflower. Journal of microbiology and biotechnology. 22: 437-447. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1109.09007>
- Gordon, S. A., Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant physiology. 26: 192-195.
- Grobelak, A., Hiller, J. 2017. Bacterial siderophores promote plant growth: screening of catechol and hydroxamate siderophores. International journal of phytoremediation. 19: 825-833. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1290581>.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A.N., Mehouchi, J., R. Tadeo, F., Talon, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia Plantarum, 111: 206-211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>.
- Hau-Yama, N.E., Magaña-Ortiz, D., Oliva, A.I., Ortiz-Vázquez, E. 2019. Antifungal activity of honey from stingless bee *Melipona beecheii* against *Candida albicans*. Journal of Apicultural Research. 59: 12-18 <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1665247>
- Hentrich, M., Böettcher, C., Düchting, P., Cheng, Y., Zhao, Y., Berkowitz, O., Pollmann, S. 2013. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. The Plant Journal. 74: 626-637. <https://doi.org/10.1111/tpj.12152>.

- Heydarian, Z., Yu, M., Gruber, M., Glick, B.R., Zhou, R., Hegedus, D.D. 2016. Inoculation of soil with plant growth promoting bacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase or expression of the corresponding *acdS* gene in transgenic plants increases salinity tolerance in *Camelina sativa*. *Frontiers in microbiology*. 7: 1966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01966>.
- Hoang, L., Joo, G. J., Kim, W. C., Jeon, S. Y., Choi, S. H., Kim, J. W., Rhee, I.K., Hur, J.M., Song, K. S. 2005. Growth inhibitors of lettuce seedlings from *Bacillus cereus* EJ-121. *Plant growth regulation*. 47:149-154. <http://doi.org/10.1007/s10725-005-3217-3>.
- Huang, P., de-Bashan, L., Crocker, T., Kloepper, J.W., Bashan, Y. 2017. Evidence that fresh weight measurement is imprecise for reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of crop plants. *Biology and Fertility of Soils*. 53: 199-208. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1160-2>.
- Idris, E.E., Bochow, H., Ross, H., Borriss, R. 2004. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 11: 583-597.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., Sa, T. M. 2008. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current microbiology*. 56: 27-333. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4>.
- Jha Y., Subramanian, R.B. 2016. Regulation of Plant Physiology and Antioxidant Enzymes for Alleviating Salinity Stress by Potassium-Mobilizing Bacteria. In: V. Meena, eds. Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture. Nueva Delhi: Springer. pp. 149-162.
- Jusoh, M., Loh, S.H., Chuah, T.S., Aziz, A., San Cha, T. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) induced changes in oil content, fatty acid profiles and expression of four fatty acid biosynthetic genes

- in *Chlorella vulgaris* at early stationary growth phase. *Phytochemistry*. 111: 65-71.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.022>.
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L., Martinoia, E., Lee, Y. 2015. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nature communications*. 6: 8113. <https://doi.org/10.1038/ncomms9113>.
- Karnwal, A. 2017. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Protection Research*. 57: 144-151. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0020>
- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Islam, M.R., Sa, T. 2012. ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*. 56: 77-86. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0162-6>.
- Keller, C.P., Stahlberg, R., Barkawi, L.S., Cohen, J.D. 2004. Long-term inhibition by auxin of leaf blade expansion in bean and *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 134: 1217-1226. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032300>.
- Khambani, L.S., Hassen, A.I., Regnier, T. 2019. Rhizospheric bacteria from pristine grassland have beneficial traits for plant growth promotion in maize (*Zea mays* L.). *Cogent Biology*. 5: 1630972. <https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1630972>.
- Khan, A.A., Tolbert, N.E. 1966. Inhibition of lettuce seed germination and root elongation by derivatives of auxin and reversal by derivatives of cycocel. *Physiologia Plantarum*. 19: 81-86.
- Kierul, K., Voigt, B., Albrecht, D., Chen, X. H., Carvalhais, L.C., Borriss, R. 2015. Influence of root exudates on the extracellular proteome of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Microbiology*. 161: 131-147. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083576-0>.

- Kloepper, J.W., Schroth, M.N. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*. 71: 642-644.
- Kraemer, S.M. 2004. Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic sciences*. 66: 3-18. <https://doi.org/10.1007/s00027-003-0690-5>.
- Křístková, E., Doležalová, I., Lebeda, A., Vinter, V., Novotná, A. 2008. Description of morphological characters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) genetic resources. *Horticultural Science*. 35: 113-129.
- Kumar, A., Kaur, G., Goel, P., Bhati, K.K., Kaur, M., Shukla, V., Pandey, A.K. 2019. Genome-wide analysis of oligopeptide transporters and detailed characterization of yellow stripe transporter genes in hexaploid wheat. *Functional and integrative genomics*. 19: 75-90. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0629-5>.
- Kumar, D., Jhariya, A. N. 2013. Nutritional, medicinal and economical importance of corn: A mini review. *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2: 7-8.
- Lafta, A., Mou, B. 2013. Evaluation of lettuce genotypes for seed thermotolerance. *HortScience*. 48: 708-714. *HortScience*. 48: 708-714 . <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.6.708>.
- Lee, S., Trinh, C.S., Lee, W.J., Jeong, C.Y., Truong, H.A., Chung, N., Chon-Sik, K., Lee, H. 2020. *Bacillus subtilis* strain L1 promotes nitrate reductase activity in *Arabidopsis* and elicits enhanced growth performance in *Arabidopsis*, lettuce, and wheat. *Journal of Plant Research*. 231-244. <https://doi.org/10.1007/s10265-019-01160-4>.
- Li, J., Sima, W., Ouyang, B., Wang, T., Ziaf, K., Luo, Z., Liu, L., Li, H., Chen, M., Huang, Y., Feng, Y., Hao, Y., Ye, Z. 2012. Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *Journal of experimental botany*. 63: 6407-6420. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers295>.

- Liu, X., Fu, J.W., da Silva, E., Shi, X.X., Cao, Y., Rathinasabapathi, B., chen, Y., Ma, L.Q. 2017. Microbial siderophores and root exudates enhanced goethite dissolution and Fe/As uptake by As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental Pollution*. 223: 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.016>
- Liu, Z., Li, Y.C., Zhang, S., Fu, Y., Fan, X., Patel, J.S., Zhang, M. 2015. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils. *Applied Soil Ecology*. 96: 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.003>.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D., Sandberg, G. 2002. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*.in: C. Perrot-Rechenmann, eds. *Auxin Molecular Biology*. Springer, Dordrecht. pp. 229-272.
- Louden, B.C., Haarmann, D., Lynne, A.M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection *JMBE: Journal of microbiology and biology education*. 12: 51-53. [10.1128/jmbe.v12i1.249](https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249).
- Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Samoon, S.A., Rather, H.A., Dar, S.A., Zehra, B. 2010. Bio-fertilizers in organic agriculture. *Journal of Phytology*. 2: 42-54.
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Katsuhara, M. 2016. Phosphorus deprivation effects on water relations of *Nicotiana tabacum* plant via reducing plasma membrane permeability. *Russian journal of plant physiology*. 63: 54-61. <https://doi.org/10.1134/S102144371601012X>.
- Mangmang, J.S., Deaker, R., Rogers, G. 2016. Germination characteristics of cucumber influenced by plant growth-promoting rhizobacteria. *International journal of vegetable science*. 22: 66-75. <https://doi.org/10.1080/19315260.2014.938850>.
- Marino, D., Damiani, I., Gucciardo, S., Mijangos, I., Pauly, N., Puppo, A. 2013. Inhibition of nitrogen fixation in symbiotic *Medicago truncatula* upon Cd exposure is a local process involving leghaemoglobin. *Journal of experimental botany*. 64: 5651-5660. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert334>.

- Martín-Fernández, C., Solti, Á., Czech, V., Kovács, K., Fodor, F., Gárate, A., Hernández-Apaolaza, H., Lucena, J.J. 201). Response of soybean plants to the application of synthetic and biodegradable Fe chelates and Fe complexes. *Plant physiology and biochemistry*. 118: 579-588. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.028>.
- Marulanda-Aguirre, A., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J.M., Aroca, R. 2008. Differential effects of a *Bacillus megaterium* strain on *Lactuca sativa* plant growth depending on the origin of the arbuscular mycorrhizal fungus coinoculated: physiologic and biochemical traits. *Journal of Plant Growth Regulation*. 27: 10-18. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9024-5>.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler, E., Doebley, J. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 6080-6084. <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mena-García, A. 2017. Bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de Coyuca de Catalán, Guerrero y su potencial como promotoras del crecimiento en maíz. (Tesis de licenciatura). Instituto Tecnológico de Ciudad Altamirano. Ciudad Altamirano, Guerrero.
- Menezes C., Vollet-Neto A., León, C.F.A.F., Venturieri G.C., Imperatriz-Fonseca V.L. 2013. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In: P. Vit, eds. *Pot-Honey*. New York, NY: Springer. pp.153-171.
- Miceli, A., Moncada, A., Sabatino, L., Vetrano, F. 2019. Effect of Gibberellic Acid on Growth, Yield, and Quality of Leaf Lettuce and Rocket Grown in a Floating System. *Agronomy*. 9: 382. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070382>.
- Miché, L., Bouillant, M.L., Rohr, R., Sallé, G., Bally, R. 2000. Physiological and cytological studies on the inhibition of *Striga* seed germination by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 347-351. DOI: doi:10.1023/a:1008734609069.
- Michener, C.D. 1990. Classification of the Apidae (hymenoptera). *The University of Kansas Science Bulletin*. 54: 75-164.

- Michener, C.D. 2007. *The Bees of the World*. 2da ed. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Michener, C.D. 2013. The Meliponini. In: P. Vit, eds. *Pot-Honey*. New York, NY: Springer. pp. 3-17.
- Miransari, M., Smith, D.L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*. 99: 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.11.005>.
- Mwita, L., Chan, W.Y., Pretorius, T., Lyantagaye, S.L., Lapa, S.V., Avdeeva, L.V., Reva, O.N. 2016. Gene expression regulation in the plant growth promoting *Bacillus atrophaeus* UCMB-5137 stimulated by maize root exudates. *Gene*. 590: 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.05.045>.
- Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., Nawaz, S. 2013. Mitigation of salinity-induced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. *Annals of Microbiology*. 63: 225-232. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0465-0>.
- Natzke, J., Noar, J., Bruno-Bárcena, J.M. 2018. *Azotobacter vinelandii* nitrogenase activity, hydrogen production, and response to oxygen exposure. *Applied and Environmental Microbiology*. 84: e01208-18. [10.1128/AEM.01208-18](https://doi.org/10.1128/AEM.01208-18).
- Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). *Brazilian journal of microbiology*. 47: 621-627. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.001>
- Oukarroum, A., Bussotti, F., Goltsev, V., Kalaji, H.M. 2015. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 109: 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.08.005>.

- Pande, A., Kaushik, S., Pandey, P., Negi, A. 2019. Isolation, characterization, and identification of phosphate-solubilizing *Burkholderia cepacia* from the sweet corn cv. Golden Bantam rhizosphere soil and effect on growth-promoting activities. International Journal of Vegetable Science. 1-17. <https://doi.org/10.1080/19315260.2019.1692121>.
- Penrose, D.M., Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia plantarum. 118: 10-15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>.
- Pétriacoq, P., Williams, A., Cotton, A., McFarlane, A.E., Rolfe, S.A., Ton, J. 2017. Metabolite profiling of non-sterile rhizosphere soil. The Plant Journal. 92: 147-162. <https://doi.org/10.1111/tpj.13639>.
- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P., Van Der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. Nature Reviews Microbiology. 11: 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya. 17: 362-370.
- Pineda-Mendoza, D.Y., Almaraz, J.J., Lara-Hernandez, M.E., Arteaga-Garibay, R., Silva-Rojas, H.V. 2019. Cepas de bacterias aisladas de esporomas de hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento vegetal. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 115: 4-17. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.027>
- Pineda-Mendoza, D.Y., González-Mancilla, A., Almaraz, J.J., Rodríguez-Guzmán, M.P., García-Barradas, O., Argumedo-Delira, R. 2018. Characterization of the antifungal activity of three rhizobacterial strains against *Rhizoctonia solani*. Spanish journal of agricultural research. 16: e1011. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018164-13334>
- Pink, D.A.C., Keane, E.M. 1993. Lettuce *Lactuca sativa* L. Genetic Improvement of Vegetable Crops. 543-571. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-040826-2.50044-8>.

- Poór, P., Kovács, J., Szopkó, D., Tari, I. 2013. Ethylene signaling in salt stress-and salicylic acid-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Protoplasma*. 250: 273-284. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0408-4>
- Quezada-Euán, J.J.G. 2018. Taxonomy and Diversity of the Stingless Bees. *In: Stingless Bees of Mexico*. Springer, Cham. pp. 1-40.
- Radhakrishnan, R., Lee, I.J. 2016. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*. 109:181-189. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>
- Ramalho, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Giannini, T.C. 1998. Within-colony size variation of foragers and pollen load capacity in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides Lepeletier (Apidae, Hymenoptera). *Apidologie*. 29: 221-228. [10.1051/apido:19980302](https://doi.org/10.1051/apido:19980302).
- Ramírez, S.R., Nieh, J.C., Quental, T.B., Roubik, D.W., Imperatriz-Fonseca, V.L., Pierce, N.E. 2010. A molecular phylogeny of the stingless bee genus *Melipona* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56: 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.026>.
- Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S., Nain, L. 2012. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. *European Journal of Soil Biology*. 50, 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.005>.
- Rashid A., Mir, M.R., Hakeem K.R. 2016. Biofertilizer Use for Sustainable Agricultural Production. *In: K. Hakeem, eds. Plant, Soil and Microbes*. Springer, Cham. Pp. 166-180.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan journal of Biological Sciences*. 7: 187-196.
- Rashid, S., Charles, T.C., Glick, B.R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied soil ecology*. 61: 217-224. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.011>.

- Reid, D., Liu, H., Kelly, S., Kawaharada, Y., Mun, T., Andersen, S.U., Desbrosses, G., Stougaard, J. 2018. Dynamics of ethylene production in response to compatible Nod factor. *Plant physiology*. 176: 1764-1772. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01371>.
- Rodríguez-Cáceres, E.A., 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and environmental Microbiology*. 44: 990–991.
- Rosa, C.A., Lachance, M.A., Silva, J.O.C., Teixeira, A.C.P., Marini, M.M., Antonini, Y., Martins, R.P. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS yeast research*. 4: 271-275. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00173-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00173-9).
- Roubik, D.W., Buchmann, S.L. 1984. Nectar selection by *Melipona* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and the ecology of nectar intake by bee colonies in a tropical forest. *Oecologia*. 61: 1-10. <https://doi.org/10.1007/BF00379082>
- Rzedowski, G.C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2da. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Sah, S., Singh, N., Singh, R. 2017. Iron acquisition in maize (*Zea mays* L.) using *Pseudomonas siderophore*. 3 *Biotech*. 7: 121. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0772-z>.
- Sahin, U., Ekinici, M., Kiziloglu, F. M., Yildirim, E., Turan, M., Kotan, R., Ors, S. 2015. Ameliorative effects of plant growth promoting bacteria on water-yield relationships, growth, and nutrient uptake of lettuce plants under different irrigation levels. *Hortscience*. 50: 1379-1386. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1379>
- Saleem, A.R., Brunetti, C., Khalid, A., Rocca, G.D., Raio, A., Emiliani, G., de Carlo, A., Mahmood, T., Centritto, M. 2018. Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. *PloS one*. 13: e0191218. [10.1371/journal.pone.0191218](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191218).
- Sarkar, A., Ghosh, P.K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M.H., Maiti, T.K. 2018. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice

- seedling growth under salt stress. *Research in microbiology*. 169: 20-32.  
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.005>.
- Senoura, T., Sakaashita, E., Kobayashi, T., Takahashi, M., Aung, M.S., Masuda, H., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K. 2017. The iron-chelate transporter OsYSL9 plays a role in iron distribution in developing rice grains. *Plant molecular biology*. 95: 375-387.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-017-0656-y>.
- Shabnam, R., Iqbal, M.T. 2016. Understanding phosphorus dynamics on wheat plant under split-root system in alkaline soil. *Brazilian Journal of Science and Technology*. 3:19.  
<https://doi.org/10.1186/s40552-016-0031-6>
- Shenker, M., Chen, Y., Hadar, Y. 1996. Stability constants of the fungal siderophore rhizoferrin with various microelements and calcium. *Soil Science Society of America Journal*. 60:1140-1144.
- Singh, H. B., Shekhar, C., Mehta, S. 2006. Biological control and plant-growth promotion by *Bacillus strains* from milk. *Journal of microbiology and biotechnology*. 16: 184-192.
- Singh, N.P., Singh, R.K., Meena, V.S., Meena, R.K. 2015. Can we use maize (*Zea mays*) rhizobacteria as plant growth promoter. *Vegetos*. 28: 86-99. <https://doi.org/10.5958/2229-4473.2015.00012.9>.
- Solanki, M.K., Singh, R.K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., Arora, D.K. 2013. Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of basic microbiology*. 54: 585-597.
- Sorty, A.M., Meena, K.K., Choudhary, K., Bitla, U.M., Minhas, P., Krishnani, K.K. 2016. Effect of plant growth promoting bacteria associated with halophytic weed (*Psoralea corylifolia* L) on germination and seedling growth of wheat under saline conditions. *Applied biochemistry and biotechnology*. 180: 872-882. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2139-z>.
- Soto, E.E.B., Herrejón, G.R., Barrera, L.E.D.M. 2010. Factores de competitividad del cultivo de lechuga en Santa María Jajalpa, Estado de México. *Análisis Económico*. 25: 143-154.

- Spohn, M., Treichel, N.S., Cormann, M., Schloter, M., Fischer, D. 2015. Distribution of phosphatase activity and various bacterial phyla in the rhizosphere of *Hordeum vulgare* L. depending on P availability. *Soil Biology and Biochemistry*. 89: 44-51.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.018>.
- Stein, L.Y., Klotz, M.G. 2016. The nitrogen cycle. *Current Biology*. 26: R94-R98.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>.
- Stella, M., Halimi, M.S. 2015. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of tropical agriculture and food science*. 43: 41-53.
- Sung, J., Lee, S., Lee, Y., Ha, S., Song, B., Kim, T., Waters, B.M., Krishnan, H.B. 2015. Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant science*. 241: 55-64.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.09.027>.
- Swain, M.R., Ray, R.C. 2009. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological research*. 164: 121-130.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.009>.
- Tabatabaei, S., Ehsanzadeh, P., Etesami, H., H.A. Alikhani, H.A., Glick, B.R. 2016. Indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* isolates inhibit seed germination and  $\alpha$ -amylase activity in durum wheat (*Triticum turgidum* L.). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 14: 0802.  
<http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2016141-8859>.
- Tahmasbi, F., Lakzian, A., Khavazi, K., Pakdin, P.A. 2014. Isolation, identification and evaluation of siderophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn. *Journal of Molecular and Cellular Research*. 27: 75-87
- Thomas, S., Mathew, L., Rishad, K.S. 2018. Isolation and molecular identification of phosphate solubilizing bacteria, *Bacillus licheniformis* UBPSB-07 capable of enhancing seed germination in *Vigna radiata* L. *Phytomorphology*. 68: 13-18.

- Valentinuzzi, F., Pii, Y., Vigani, G., Lehmann, M., Cesco, S., Mimmo, T. 2015. Phosphorus and iron deficiencies induce a metabolic reprogramming and affect the exudation traits of the woody plant *Fragaria* × *ananassa*. *Journal of experimental botany*. 66: 483-6495. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv364>.
- Van Dam, N.M., Bouwmeester, H.J. 2016. Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends in plant science*. 21: 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>.
- Van Veen, J.W., Arce, H.G.A. 1999. Nest and colony characteristics of log-hived *Melipona beecheii* (Apidae: Meliponinae). *Journal of apicultural research*. 38: 43-48. <https://doi.org/10.1080/00218839.1999.11100994>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, A.N. 2016. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*. 21: 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Venturi, V., Keel, C. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends in plant science*. 21:187-198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>.
- Villaseñor, J.L., Ortiz, E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 85: 134-142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>.
- Viteri, M.L., García, M. 2013. Tomate y lechuga: importancia productiva y comercial. *Estudios Socioeconómicos de los Sistemas Agroalimentarios y Agroindustriales*. (INTA). ISSN1852-4605
- Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Moënné-Loccoz, Y., Bally, R., Comte, G. 2011. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *New Phytologist*. 189: 494-506. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03484.x>.

- Walter, M., Kraemer, S.M., Schenkeveld, W.D.C. 2017. The effect of pH, electrolytes and temperature on the rhizosphere geochemistry of phytosiderophores. *Plant and soil*. 418: 5-23. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3226-9>.
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., Ma, L.Z. 2017. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *The ISME journal*. 11: 1602-1613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>.
- Wang, Y., Liu, H., Li, H., Teng, R., Zhuang, J. 2020. Genome-based identification and analysis of the genes involved in auxin biosynthesis and signal transduction during tea plant leaf development. *Scientia Horticulturae*. 261:109030. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109030>.
- Wen, Z., Li, H., She, J., Rengel, Z. 2017. Maize responds to low shoot P concentration by altering root morphology rather than increasing root exudation. *Plant and soil*. 416: 377-389. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3214-0>.
- Wittenberg, J.B., Bergersen, F.J., Appleby, C.A., Turner, G.L. 1974. Facilitated oxygen diffusion the role of leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules. *Journal of Biological Chemistry*. 249:4057-4066.
- Wulandari, C., Muraki, S., Hisamura, A., Ono, H., Honda, K., Kashima, T., Subandiyah, S.Masaoka, Y. 2014. Effect of Iron deficiency on root ferric chelate reductase, proton extrusion, biomass production and mineral absorption of citrus root stock orange jasmine (*Murraya exotica* L.). *Journal of Plant Nutrition*. 37: 50-64. <https://doi.org/10.1080/01904167.2013.837178>.
- Xiao, C.Q., Chi, R.A., Li, W.S., Zheng, Y. 2011. Biosolubilization of phosphorus from rock phosphate by moderately thermophilic and mesophilic bacteria. *Minerals Engineering*. 24: 956-958. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.01.008>.

- Yang, P., Zhou, X.F., Wang, L.L., Li, Q.S., Zhou, T., Chen, Y.K., Zhao, Z.Y. He, B.Y.. 2018. Effect of phosphate-solubilizing bacteria on the mobility of insoluble cadmium and metabolic analysis. *International journal of environmental research and public health*. 15: 1330. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071330>.
- Yin, T.T., Pin, U.L., Ghazali, A.H.A. 2015. Influence of external nitrogen on nitrogenase enzyme activity and auxin production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). *Tropical life sciences research*. 26: 101-110.
- Zamora, G., Beukerlman, K., Van den, B.B., Arias, M.L., Umaña, E., Aguilar, I., Fallas, N. 2015. Stingless bee honeys from Costa Rica exhibit antimicrobial activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. 5: 144-149. <https://doi.org/10.1080/22311866.2015.1053099>.
- Zhang, H., Kim, M.S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., Paré, P.W 2007. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. 226: 839–851. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>.
- Zhang, K., Liu, H., Tao, P., Chen, H. 2014. Comparative proteomic analyses provide new insights into low phosphorus stress responses in maize leaves. *PLoS One*. 9: e98215. [0.1371/journal.pone.0098215](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098215)
- Zhang, L., Su, W., Tao, R., Zhang, W., Chen, J., Wu, P., Yan, C., Jia, Y., Larkin, R.M., Lavelle, D., Truco, M.J., Chin-Wo, S.R., Wichelmore, R.W., Kuang, H. 2017. RNA sequencing provides insights into the evolution of lettuce and the regulation of flavonoid biosynthesis. *Nature communications*. 8: 2264. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02445-9>.
- Zhang, X., McRose, D.L., Darnajoux, R., Bellenger, J.P., Morel, F.M.M., Kraepiel, A.M.L. 2016. Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. *Biogeochemistry*. 127: 189-198.

- Zhao, Y. 2012. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular plant*. 5: 334-338. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp104>.
- Zhou, D., X.F. Huang, J.M. Chaparro, D.V. Badri, D.K. Manter, J.M. Vivanco, y J. Guo. 2016. Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant and soil*. 401: 259-272.

## ANEXOS

### **Curva patrón fosfato**

Se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para las la curva de concentraciones conocidas. Se tomó en cuenta el peso molecular del compuesto y del % que representa el  $\text{PO}_4$  del compuesto.

Se diluyeron 0.1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 6.978 mL de agua bidestilada. Después se elaboraron las concentraciones en medio de cultivo pikovskaya aforado a 10 mL a partir de la cantidad de solución stock tomada para cada tubo, de tal forma que se obtuvieron las siguientes relaciones que se muestran en el cuadro 6.

### **Curva patrón indol**

La solución stock de AIA se realiza a partir de la adición de 0.1 g de AIA en 5 ml de etanol al 95%, se disuelve y se afora a 100 ml para obtener una concentración inicial de 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Apartir de esta se procede a elaborar los estándares que tengan una concentración de 0 a 100  $\mu\text{g/ml}$  en 10 mL de medio de cultivo LB. Para obtener las concentraciones mencionadas se utilizó la cantidad indiada en el cuadro 7.

Una vez que se tienen los estandares se toman 100  $\mu\text{L}$  de cada concentración y se colocan en pozos de placa para espectrofotometría por triplicado. A las muestras se le adiciona 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de salkowski. La placa se incuba por 30 min en la oscuridad. Pasado este tiempo se procede a la lectura de las muestras en el espectrofotómetro a 530 nm (las lecturas se inician a partir de la menor concentración, como el ejemplo de la Figura 1).

**Cuadro 6.** Requerimientos de medio de cultivo pikovskaya líquido y solución stock para preparar curva estándar de fosfato.

<b>Concentración (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Cantidad de Stock a agregar (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Cantidad de medio de cultivo pikovskaya (mL)</b>	<b>Total del medio de cultivo</b>
10	10	9.990	
20	20	9.980	
30	30	9.970	
40	40	9.960	
50	50	9.950	
60	60	9.940	<b>10 mL</b>
100	100	9.900	
200	200	9.800	
300	300	9.700	

**Cuadro 7.** Requerimientos de medio de cultivo LB líquido y solución stock para preparar curva estándar de indol.

<b>Cantidad de solución Stock mL</b>	<b>Cantidad de medio de cultivo LB mL</b>	<b>Concentración <math>\mu\text{g/ ml}</math></b>
0.1	9.9	10
0.2	9.8	20
0.3	9.7	30
0.4	9.6	40
0.5	9.5	50
0.6	9.4	6.
0.7	9.3	70
0.8	9.2	80
0.9	9.1	90
1	9.0	100