



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE BIOLOGÍA

TÍTULO DE LA TESIS  
**INTERACCIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE  
CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) CON LECHUGA**  
*(Lactuca sativa L.)*

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

MARÍA MONSERRAT CAPILLA OTERO

DIRECTOR (A): DALIA MOLINA ROMERO  
CO-DIRECTORA: YOLANDA ELIZABETH MORALES  
GARCÍA

ABRIL 2021



## TABLA DE ABREVIATURAS

°C	Centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
dpi	días después de la inoculación
ddg	días después de la germinación
pH	Potencial de hidrógeno
mL	Mililitros
nM	Milimolar
PGPR	Rizobacterias promotoras de crecimiento rizosféricas
UFC	Unidades formadoras de colonias

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Número de hojas presentes en <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi inoculadas con PGPR.</i>	29
2	<i>Longitud foliar en <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi inoculadas con PGPR</i>	30
3	<i>Longitud radicular en <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi inoculadas con PGPR</i>	31
4	<i>Peso fresco de parte área de <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi, inoculadas con PGPR</i>	32
5	<i>Peso fresco de la raíz de <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi inoculadas con PGPR.</i>	32
6	<i>Peso seco de parte área de <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi, inoculadas con PGPR</i>	33
7	<i>Peso seco de raíz de <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi inoculadas con PGPR</i>	34
8	<i>Contenido de Clorofila A (Chl A) evaluada en las hojas de <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi</i>	35
9	<i>Contenido de Clorofila B (Chl B) evaluada en <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi.</i>	35
10	<i>Contenido de Clorofila Total evaluada en <b>Lactuca sativa L.</b> a los 90 ddi.</i>	36

## INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	<i>Capacidad de colonización de PGPR en forma individual del sistema radicular de Lactuca sativa L.</i>	28
2	<i>Capacidad de colonización de (PGPR) en forma de multi-inoculante en el sistema radicular de Lactuca sativa L.</i>	28

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MI PADRE:**

*Norberto por ser mi inspiración de lucha día a día, por darme apoyo incondicional y estar presente en cada momento de mi vida. Te amo Papá*

### **A MI MADRE:**

*Hilda por tener esa paciencia y delicadeza conmigo. Por todas las mañanas que te levantaste para hacerme de desayunar, ayudarme con las tareas y por ser una de mis guías en mi vida.*

### **A MIS HERMANAS:**

*Brenda y Karla por siempre alentarme e inspirarme a seguir mis sueños. Lo logramos hermanas, vamos dos de tres, ahora solo faltas tu karlita.*

### **A MIS ABUELOS:**

*Francisca y Refugio por siempre estar conmigo y ayudarme.*

### **A MIS PRIMOS:**

*Nancy y Franco por siempre estar ahí y a inspirarme a crecer profesionalmente.*

### **A MIS AMIGOS:**

*A Ricardo, Cindy, Naye, Elisa, Ceci, Diana, Edith y Sandy por ayudarme en momentos difíciles, alentarme a no rendirme en la carrera y sobre todo por ser grandes amigos.*

### **A MI DIRECTORA:**

*Doctora Dalía, quien es uno de los pilares de mi superación profesional, gracias por su dedicación, conocimiento, y apoyo porque sin usted no hubiera llegado hasta aquí para concluir con mi carrera.*

33-96-90-00-00

## Contenido

RESUMEN.....	8
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
<b>Mecanismos de acción empleadas por las PGPR .....</b>	<b>10</b>
<b>Mecanismos directos.....</b>	<b>11</b>
<b>Mecanismos indirectos.....</b>	<b>12</b>
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO VEGETAL (<i>Lactuca sativa L.</i>) .....</b>	<b>13</b>
Descripción de la especie.....	13
Información taxonómica.....	14
Aporte nutricional.....	14
Temperatura .....	15
Importancia económica.....	15
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
<b>Descripción y aplicación de bacterias promotores de crecimiento rizosféricas en plantas.....</b>	<b>16</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS GENERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>Microorganismos.....</b>	<b>21</b>
<b>Crecimiento y suspensión celular de inoculación bacteriana .....</b>	<b>21</b>
<b>Desinfección y germinación de semillas .....</b>	<b>22</b>
<b>Inoculación bacteriana .....</b>	<b>22</b>
<b>Solución nutritiva y Condiciones de invernadero .....</b>	<b>23</b>
<b>Variables evaluadas .....</b>	<b>24</b>
<b>Colonización bacteriana rizosférica.....</b>	<b>24</b>
<b>Cuantificación de Clorofila .....</b>	<b>25</b>
<b>Variables morfométricas.....</b>	<b>25</b>
<b>Evaluación de colonización bacteriana en <i>Lactuca sativa L.</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>Colonización de PGPR en forma individual y en consorcio.....</b>	<b>27</b>
<b>Actividad promotora de crecimiento de las PGPR sobre <i>Lactuca sativa L.</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>Promoción del crecimiento vegetal en Lechuga (<i>Lactuca sativa L.</i>) .....</b>	<b>38</b>
<b>Cuantificación de Clorofila .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>43</b>



## RESUMEN

La dinámica población aumenta a través de los años generando una demanda en el sector alimenticio debido a que es uno de los principales recursos para la subsistencia del ser humano. Sin embargo, esta necesidad ha llevado a la implementación de agroquímicos en la agricultura de manera indiscriminada, afectando la función biológica del suelo. Una alternativa para poder disminuir este efecto negativo es el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB).

Dentro de este estudio se utilizaron cuatro bacterias promotoras de crecimiento vegetal para evaluar el efecto en el crecimiento de *Lactuca sativa* L. con la mono-inoculación de: *Acinetobacter* sp. EMMS02, *Pseudomonas putida* KT2440, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* OF 178, y en forma de multi-inoculante. El multi-inoculante se formuló utilizando las cepas anteriormente mencionadas; posteriormente se sembraron en vermiculita en condiciones de invernadero.

Las semillas axénicas fueron germinadas, y a los 10 días posteriores de la emergencia radicular se inocularon las plántulas con 2 mL de la suspensión bacteriana en la raíz y sobre la vermiculita estéril. El grupo control consistió en plántulas libre de células bacterianas. Las evaluaciones realizadas a los tratamientos fueron la adhesión a las 24 horas posterior a la inoculación (dpi), la colonización bacteriana a los 60 y los 90 días después de la inoculación. Los parámetros morfométricos, la cuantificación de la clorofila y la inoculación de la lechuga con las bacterias promotoras de crecimiento vegetal evidenció el incremento de peso seco de la raíz, longitud foliar y número de hojas con los tratamientos *P. putida* KT2440, *Acinetobacter* EMMS02 y el multi-inoculante de manera significativa ( $P < 0.05$ ); el peso seco de la parte aérea y la longitud radicular también fue superior en los tratamientos con *P. putida* KT2440 y *Acinetobacter* EMMS02. La inoculación con el multi-inoculante incrementó la concentración de clorofila total en comparación con los otros tratamientos.

Por otra parte, se observó una disminución del crecimiento de la lechuga con la inoculación de *Sphingomonas* OF178 en comparación al tratamiento control.

Los resultados generados en este trabajo sugieren que las rizobacterias *P. putida* KT2440 y *Acinetobacter* EMMS02, presentan el potencial para promover el crecimiento vegetal en el modelo de la *Lactuca sativa* L.

## INTRODUCCIÓN

El aumento poblacional de la especie humana ha llevado a la explotación de los recursos naturales con el fin de solventar las necesidades alimenticias de los millones de personas que habitan el planeta (Camelo *et al.*, 2011). Esta necesidad ha llevado a la aplicación continua de fertilizantes químicos provocando impactos negativos hacia los agroecosistemas ocasionando daños irreparables al ambiente (Zahid *et al.*, 2015). Para mejorar la producción agrícola evitando el uso de fertilizantes de origen sintético, las investigaciones se han orientado al desarrollo de aplicaciones biotecnológicas, generando un interés hacia los microorganismos benéficos del suelo (bacteria- interacción-planta) que promueven el crecimiento o evitan infecciones en el tejido vegetal por patógenos (Moreno *et al.*, 2018).

De manera específica, un método alternativo para reducir el uso de fertilizantes en la agricultura es la aplicación de inoculantes microbianos (Nehra *et al.*, 2016); estos productos son formulados con las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) o también conocidas como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), esta clasificación agrupa a las bacterias que habitan la rizosfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas (Labra-Cardón *et al.*, 2012 ), estas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, sistema antioxidante y sideróforos (Kumar & Verma, 2018).

Entre las PGPR más estudiadas se encuentran los géneros: Simbióticos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Merzorhizobium*) y no simbióticos (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*) que son implementadas como bio-inoculantes para promover el crecimiento y desarrollo vegetal sobre condiciones de estrés para la planta (Ma *et al.*, 2009a; Wani *et al.*, 2010).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal aumentan en gran medida el crecimiento de las plantas como cereales y otros cultivos de importancia agrícola (Santoyo *et al.*, 2016).

Estas PGPR representan una alternativa en la práctica agrícola ante el gran impacto negativo de la aplicación de estos insumos hacia el medio ambiente y el alto precio

de los fertilizantes y pesticidas químicos; por lo anterior los agricultores se han interesado especialmente por la biofertilización. (Postma *et al.*,2003; Welbaum *et al.*,2004).

Particularmente, los cultivos hortícolas requieren de gran cantidad de fertilizantes debido a la gran demanda de producción (Muñoz *et al.*,2014). La lechuga requiere nutrientes específicos para su desarrollo como: 2 Kg de Nitrógeno, 0.5 Kg de Fósforo, 4.3 Kg de Potasio , 0.9 Kg de Calcio y 0.2 de Magnesio para obtener una buena calidad y rendimiento comercial de esta hortaliza (Tlahque-Guitierrez, 2011).

## **MARCO TEÓRICO**

### **Mecanismos de acción empleadas por las PGPR**

Las bacterias rizosféricas desempeñan una función importante al establecer asociaciones con las plantas. Recientemente se ha documentado que las rizobacterias presentan características benéficas hacia su entorno, como el potencial de desintoxicación de metales pesados (Ma *et al.*, 2011b; Wani & Khan, 2010), tolerancia o degradación de pesticidas (Anhemad & Khan, 2012), control biológico de fitopatógenos e insectos (Hynes *et al.*,2008; Russo *et al.*, 2008; Joo *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2000) y junto con las propiedades promotoras de crecimiento de las plantas, mediante la producción de fitohormonas (Anhemad & Khan ,2012) y sideróforos (Jahanian *et al.*, 2012;Tian *et al.*, 2009) entre otros. En base a los efectos que ejercen estos microorganismos sobre el crecimiento de las plantas, se clasifican en tres grupos: benéficas, neutras y patógenas, (Beneduzi *et al.*, 2012).

Las bacterias promotoras de crecimiento rizosférico, tienden a actuar por dos mecanismos distintos: Directos e indirectos.

Entre los mecanismos directos destacan: la síntesis de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, la producción de vitaminas, nitritos, la solubilización de fósforo (P) inorgánico y la oxidación de sulfuros, el incremento en la permeabilidad de la raíz, y la reducción de la toxicidad por metales pesados. (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Por otra parte, las PGPR generan la promoción indirecta del crecimiento de las plantas, mediante la disminución o la prevención de los efectos nocivos de los microorganismos fitopatógenos hacia la planta mediante la producción de sustancias

antagónicas o generando la resistencia a patógenos. (Sivasakthi *et al.*, 2014). Dentro de sus mecanismos se incluyen la producción de la el enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC), antibióticos, enzimas degradantes de la pared celular, cianuro de hidrógeno, resistencia sistémica inducida (ISR), inhibición de *Quorum Sensing* y sideróforos (Balogh *et al.* 2010; Frampton *et al.* 2012).

### **Mecanismos directos**

Fitohormonas (Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, Etileno, Ácido abscísico)

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos producidos por las plantas, que ejercen su función en muy bajas concentraciones y su principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales (Alcantara-Cortes *et al.*, 2019).

#### Auxinas

Las auxinas son hormonas vegetales que participan en los procesos de desarrollo de las plantas e intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación a nivel celular (Ljung, 2013; Sauer *et al.*, 2013). Estas sustancia se produce en diferentes estructuras de las plantas induciendo la elongación de tallos, la formación de raíces adventicias, en las hojas y los tallos (Taiz & Zeiger, 2003).

#### Citoquininas

Las citoquininas son aminopurinas N6 que inician la proliferación celular en muchas células vegetales. Estas son sintetizadas en las raíces, en los embriones del desarrollo, en las hojas jóvenes, en los frutos y participan en procesos de división celular, morfogénesis de los tallos y las raíces, la maduración de los cloroplastos, elongación celular y la senescencia. (Taiz & Zeiger, 2003)

#### Etileno

El etileno es considerado una hormona que estimulen el crecimiento de la planta, pero a concentraciones altas (mayor a > 10ppm) pueden ser dañinas, induciendo la

defoliación, inhibición del crecimiento radicular y senescencia prematura que conduce a un rendimiento menor de los cultivos (Li *et al.*, 2005, Desbrosses *et al.*, 2009).

### Solubilización de fosfato

El fósforo (P) es el elemento mineral más importante seguido del nitrógeno (N), su deficiencia limita el crecimiento de las plantas (Beltrán, 2014). Sin embargo, esta baja disponibilidad de fósforo hacia las plantas se debe a que la mayoría de fósforo se encuentra de forma insoluble, mientras que las plantas solo lo absorben de dos maneras solubles, el monobásico ( $H_2PO_4$ ) y el dibásico ( $HPO_4^{2-}$ ) (Bhattacharyya & Jha, 2012). Las bacterias solubilizadoras de fosfatos, solubilizan los fosfatos insolubles de los suelos, esta forma química disponibles para las plantas (Goswami *et al.*, 2016) y las plantas proporcionan compuestos carbonados que son metabolizados para el crecimiento microbiano (Moreno *et al.*, 2018).

### Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por organismos procariotas, que poseen el complejo multienzimático di-nitrogenasa reductasa. Éste cataliza la reducción altamente endergónica de nitrógeno atmosférico a amonio en presencia de magnesio (Azcon & Talón 2016).

Las bacterias que reducen el nitrógeno atmosférico en amonio son denominadas diazotróficas. Entre los organismos diazótrofos se encuentran, arqueas y bacterias que colonizan diversas especies vegetales. (Venieraki *et al.*, 2011)

## Mecanismos indirectos

### Sideróforos

Se ha documentado ampliamente la participación del hierro en diferentes procesos biológicos vitales para las células como cofactor de una gran variedad de reacciones enzimáticas (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013). El hierro es bastante abundante en los suelos; sin embargo, el ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) se oxida a ion férrico ( $Fe^{+3}$ ), este ión forma compuestos insolubles, no disponible para las plantas. (Ramamoorthy *et al.*, 2001).

Las rizobacterias suprimen a los fitopatógenos convirtiendo el hierro en un factor limitante, mediante su secuestro, formando el complejo sideróforo-hierro. (Vacheron *et al.*, 2013). Por lo que su producción desempeña un papel importante para reducir la proliferación de fitopatógenos por quelación del hierro y mejora el desarrollo de las plantas mediante una mayor absorción de hierro. (Hibbing *et al.*, 2010; Masalha *et al.*, 2010; Kativar *et al.*, 2004)

#### Antibióticos

Los antibióticos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan como inhibidores de crecimiento, mediante la alteración de las actividades metabólicas de microorganismos. Esta actividad antagonista es la más eficaz para suprimir el crecimiento de fitopatógenos. (Has *et al.*, 2005; Bharti *et al.*, 2015). Dentro de los mecanismos de acción de los antibióticos se incluyen la inhibición de la síntesis de pared celular, y la desestabilización estructural de la membrana celular, entre otros mecanismos. (Beneduzi *et al.*, 2012).

#### Resistencia sistémica inducida

La interacción que presentan algunas rizobacterias con su planta huésped reduce el número de enfermedades o la severidad de alguna infección generada por bacterias, hongos, virus, nemátodos y algunos insectos patógenos. (Poupin *et al.*, 2013). La resistencia inducida es el estado de mejora en la capacidad defensiva que desarrollan las plantas cuando se estimulan adecuadamente (Van Loon *et al.*, 1998). Este proceso depende de las vías de señalización del ácido jasmónico y etileno presentes en la planta (Bordiec *et al.*, 2011). Estas moléculas de señalización acumuladas coordinan las respuestas de defensa y, cuando se aplican exógenamente, son suficientes para inducir resistencia a las plantas (Ryals *et al.*, 1996).

## **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO VEGETAL (*Lactuca sativa* L.)**

### Descripción de la especie.

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta herbácea, autógena y anual. Su órgano comestible son sus hojas, las cuales son glabras, brillantes de color verde intenso o

rojo. (Carrasco & Sandoval, 2016). Las hojas, lisas y sin pecíolos emergen en forma de roseta que no se ramifica, dependiendo de la variedad se forma un cogollo apretado (Gallardo *et al.*, 1996; Rincón, 2001).

La raíz principal es pivotante, corta y con pequeñas ramificaciones; tiene numerosas raíces laterales de absorción, las cuales se desarrollan en la capa superficial del suelo con una profundidad de 5 a 30 cm. (Granval & Graviola, 1991; Valadez, 1997; Alzate & Loaiza, 2008).

El tallo es pequeño, corto, cilíndrico y no se ramifica cuando la planta está en el estado óptimo de cosecha. El tallo se alarga hasta 1.2 m de longitud, cuando finaliza la etapa comercial. (Valadez, 1997).

## Información taxonómica

### Taxonomía

La lechuga es una planta anual, autógena y la clasificación de la USDA (2006) se encuadra en los siguientes taxones:

Reino:	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Lactuca L.
Especie	Lactuca sativa L.

## Aporte nutricional

La lechuga se caracteriza por ser una hortaliza rica en antioxidantes, vitaminas y minerales. Es uno de los vegetales con mayor consumo en mundial y su principal característica es la digestibilidad. (Hernán-Boris & Almanza-Vega, 2016)

El valor nutricional de la lechuga se resalta por el alto contenido de minerales y vitaminas. Es una fuente importante de calcio, hierro y vitamina A, proteína, ácido

ascórbico (vitamina C), y complejo B. Dado su bajo valor calórico, se ha tornado como el ingrediente básico en las dietas alimenticias (Whitaker & Ryder, 1964). El aporte de calorías de esta hortaliza es muy bajo, mientras que la concentración de vitamínica C es muy alta. Así mismo, aporta alta concentración de potasio, fósforo y su contenido de agua es del 94% ( Alzate & Loaiza, 2008).

## Temperatura

En general, es una especie vegetal que se adapta a las temperaturas bajas; la temperatura óptima para el crecimiento oscila entre los 18 a 23 °C durante el día y de 7 a 15 °C durante la noche, la temperatura máxima puede ser de 30 °C y la mínima que puede soportar es de hasta -6 °C (Quintero et al., 2000).

En los ambientes de clima frío, en la fase del crecimiento del cultivo requiere temperaturas entre 14 y 18 °C con máximas de 24 °C y mínimas de 7 °C, debido a que la formación de las cabezas de la lechuga exige la diferencia de temperaturas entre el día y la noche (Alzate & Loaiza, 2008).

## Importancia económica

La producción de Lechuga en el país se ha incrementado año con año. México es el octavo productor de lechuga con un total de 370, 066 toneladas, superado en primer lugar por China con 13,434,116 toneladas, Estados Unidos con 3,889,120, India con 1,059,850 entre otros. (FAO, 2013).

## ANTECEDENTES

### Descripción y aplicación de bacterias promotores de crecimiento rizosféricas en plantas.

#### *Azospirillum brasilense*

El género *Azospirillum* es uno de los más estudiados, estos microorganismos son capaces de colonizar gran variedad de plantas y promover significativamente su crecimiento, desarrollo y productividad en condiciones de campo. (Bashan & de-Bashan, 2010)

*Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* son las especies más estudiadas de este género debido a su gran capacidad para estimular el crecimiento de las plantas, y de aumentar el rendimiento de los cultivos (Díaz-Franco & Ortegón, 2006; García-Olivares *et al.*, 2006). Se describen en la literatura como bacterias Gram negativas y la morfología de las células depende del estado nutricional del cultivo. (Bashan *et al.*, 1991). Son microorganismos de vida libre, fijadoras de nitrógeno, en forma de vibrio o espirilo, que producen flagelos polares y peritricos (Baldani *et al.*, 2005).

García-Olivares *et al.*, (2006) evaluó el rendimiento de producción de biomasa y grano del sorgo en condiciones de invernadero y de campo, en este estudio las semillas de sorgo fueron inoculadas con tres cepas distintas de *A. brasilense* donde demuestra que un incremento de 13-17 % de rendimiento mayor que el testigo.

Fasciglione *et al.*, (2012) describió que la inoculación de lechuga con *A. brasilense* promueve una germinación temprana, aumenta el peso seco de la hoja, y contenido de clorofila cuando se cultivaron a una concentración de a 40 mmol-3 de cloruro de sodio (NaCl).

Villa-Castro *et al.*, (2014) evaluó el efecto de la inoculación de tres cepas de *Azospirillum spp.* en maíz (Patrón 9, IPN-33 IPN -35) bajo condiciones de invernadero, demostrando que la cepa Patrón 9 incrementó el peso seco de la parte aérea de la planta y evidenció el potencial de esta cepa para uso agrícola en los cultivos.

Mangmang *et al.*, (2015) evaluó los efectos en el crecimiento temprano de plántulas de lechuga, jitomate y pepino con la inoculación de tres cepas de *A. brasilense* en

estas plantas (Sp7, Sp7-S, y Sp245). Los resultados mostraron que el efecto de la inoculación varió enormemente con las especies de las plantas, los métodos de inoculación y las cepas de PGPR, sugirió que los efectos de la inoculación podrían depender de la concentración del inóculo y de la producción de IAA (ácido indol-3-acético).

### *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas spp.* son bacterias gram negativas capaces de adaptarse a diferentes tipos de hábitats y entornos contaminados con hidrocarburos (Wu *et al.*, 2010). Si bien, se ha observado que en ambientes ampliamente estructurados, este género bacteriano diverge rápidamente (Martín *et al.*, 2014). *Pseudomonas sp.* promueve el crecimiento vegetal (presenta mecanismos de promoción directa) y actúan como agentes de biocontrol contra fitopatógenos (Bakker *et al.*, 2007). Las especies más caracterizadas son *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* (Dowling & O’Gara 1994; Molina *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que la inoculación con algunas cepas de *Pseudomonas* mejora el crecimiento del frijol común (Ahmadzadeh & Tehrani 2009), sésamo (Kumar *et al.* 2009), trigo y maíz (Rosas *et al.* 2009), frijol mungo (Sharma & Johri 2003) y alfalfa (Yanes *et al.* 2012).

Sánchez-López *et al.*, (2014) evidenció que la inoculación con *P. fluorescens* FR1, *Pseudomonas sp.*, UVLO27 y *Pseudomonas sp.* LEAV18, incrementó la biomasa y el desarrollo de las plantas de *Lactuca sativa L.*, de manera significativa ( $P < 0.05$ ) actuando estas cepas como solubilizadoras de fosfato y utilizando como fuente principal, roca fosfórica.

Costa-Guitierrez *et al.*, (2020) evidenció que *P. putida* KT2440 puede tolerar altas concentraciones de NaCl y determinó como la salinidad influye en rasgos como la producción de compuestos de indol, síntesis de sideróforos y solubilización de fosfato. La inoculación de las plantas de soja y maíz con esta cepa mejoró significativamente la germinación de las semillas, la longitud de la raíz y el tallo de estas plantas en condiciones salinas en comparación con las plantas no inoculadas.

### *Acinetobacter spp.*

Dentro del contexto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, *Acinetobacter sp.*, ha demostrado su capacidad para la promoción de crecimiento en distintas plantas. Se sabe que ciertas cepas tienen la capacidad de producir sideróforos (Indiragandhi *et al.*, 2008; Sachdev *et al.*, 2010; Sarode *et al.*, 2009), solubilizar fosfatos, (Gulati *et al.*, 2009; Peix *et al.*, 2009). Sin embargo, hay poca evidencia de algunas cepas de este género que pueden ejercer un mecanismo indirecto, como la supresión de crecimiento de hongos fitopatógenos. (Hudderdar *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007).

Rokhbakhsh *et al.*, (2011) indicó que *Acinetobacter sp.* PUCM1022 mejoró la altura de disparo, longitud de la raíz y peso seco de la raíz de las plántulas de mijo perla en comparación con los controles, subrayando el potencial de promoción del crecimiento de las plantas de estos aislados.

Kuan *et al.*, (2016) demostró que la inoculación de maíz con bacterias como *Bacillus pumilus* S1r1, *Klebsiella pneumoniae* Fr1, *Bacillus subtilis* UPMB10 y *Acinetobacter sp.* S3r2 aumentó significativamente la absorción de nitrógeno de la planta, la biomasa seca y el rendimiento de las mazorcas de maíz.

Rhithu *et al.*, (2017) mencionó que el aislado *Acinetobacter sp.* PDB4 es una buena candidata para promover la germinación y la longitud radicular en plantas de arroz en condiciones de estrés, generado por la presencia del hidrocarburo poli-aromático Benzopireno (BaP).

### *Sphingomonas spp.*

El género *Sphingomonas* fue descrito por primera vez por Yabuuchi *et al.*, (1990), son bacterias en forma de bacilos Gram negativos, no esporulantes, aeróbicos, quimioheterotróficos, no móviles o móviles (Busse *et al.*, 2003). Estos son tradicionalmente conocidos como degradadores, bien adaptados para realizar la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Margesin *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2016; Ohta *et al.*, 2004) y hexaclorohexano (HCH). Además, se ha demostrado la capacidad de *Sphingomonas sp.* para la producción de moléculas como ACC

desaminasa, AIA y producción de sideróforos, cuando esta bacteria es inoculada en plantas de maíz (Mohanty *et al.*, 2016; Molina-Romero *et al.*, 2017).

#### Multi-inoculante

El uso de biofertilizantes formulados con una sola especie microbiana, frecuentemente no se obtienen los resultados deseados sobre el cultivo (Felici *et al.*, 2008; Roberts *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha estudiado que la inoculación de plantas con consorcios bacterianos se observa una mejor promoción de crecimiento vegetal en comparación a la inoculación con una sola rizobacteria en distintos cultivos, y eso es debido al sinergismo que se establece entre las PGPR, proporcionándole a la planta el beneficio de biocontrol (Young *et al.*, 2008)

Imran *et al.*, (2002) evaluó los mecanismos de control biológico y promoción de crecimiento en forma individual y en multi-inoculante sobre tomate inoculado con *P. fluorescens* CHA0, *P. aeruginosa* IE-6S + y *B. japonicum* 5-69 mr, confrontando con los fitopatógenos a *M. phaseolina*, *F. solani* y *R. solani*. Mostraron que el consorcio bacteriano suprimió de manera más eficiente a los patógenos y obtuvo un crecimiento superior en biomasa seca en comparación al control y la inoculación individual.

Molina-Romero *et al.*, (2017) evidenció que el multi-inoculante formulado con bacterias tolerantes a la desecación como: *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* OF178, *Acinetobacter* EMMS02 y *A. brasilense* Sp7, mejoró el peso seco de la raíz y de la parte aérea, la altura y el diámetro de maíz criollo azul en comparación al control y a los tratamientos individuales en condiciones de invernadero; además evidenció algunas características que presentan las cepas del consorcio como la producción de sideróforos, indoles totales y solubilización de fosfatos.

## JUSTIFICACIÓN

El crecimiento poblacional se ha vinculado con la demanda alimenticia, para solventar esta problemática se han aplicado sustancias químicas (fertilizantes y agroquímicos) sobre el suelo de una forma indiscriminada y como consecuencia se ha deteriorado su funcionamiento biológico de este. Una alternativa para reducir el elevado empleo de agroquímicos se ha centrado en la búsqueda de métodos biotecnológicos alternativos, como la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) a cultivos de importancia agronómica. Esta opción es una candidata

excepcional para reducir el impacto negativo de agroquímicos sobre el ambiente y obtener rendimientos similares al tradicional en los cultivos inoculados con PGPR.

## **HIPÓTESIS**

La mono-inoculación y la multi-inoculación de *Lactuca sativa* L. var. Longifolia con bacterias promotoras de crecimiento rizosféricas como *Acinetobacter* sp. EMMS02, *Pseudomonas putida* KT2440, *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* OF178 podrían generar un efecto positivo en la estimulación del crecimiento de la hortaliza.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La capacidad de colonización de *Acinetobacter* sp. EMMS02, *Pseudomonas putida* KT2440, *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* OF178 (en mono -inoculación y en multi-inoculación) en la rizosfera de *Lactuca sativa* L. será eficiente para estimular el crecimiento?

¿La interacción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) en forma de mono-inoculación y multi-inoculación bacteriana sobre la rizosfera de *Lactuca sativa* L. estimularán el crecimiento de la misma manera?

¿La mono-inoculación y el multi-inoculación bacteriana de las PGPB en *Lactuca sativa* L. afectará la concentración de clorofila A, B y total?

## **OBJETIVOS GENERAL**

Evaluar la interacción de *Lactuca sativa* L., var. longifolia cuando es inoculada con las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): *Acinetobacter* sp. EMMS02, *Pseudomonas putida* KT2440, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178 en forma de mono-inoculación y en multi-inoculación, bajo condiciones de crecimiento en invernadero.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la colonización bacteriana presente en el sistema radicular de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* EMMS02, *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178, en forma de mono-inoculación y en multi-inoculación.
- Evaluar la variación morfométrica de *Lactuca sativa* L. variedad longifolia cuando es inoculada con *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* EMMS02, *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178, en forma de mono-inoculación y en multi-inoculación.
- Cuantificar la clorofila A y B de los diferentes tratamientos con la mono-inoculación y el multi-inoculación bacteriana de *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* EMMS02, *A. brasilense* Sp7 y *Sphingomonas* sp. OF178.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana en el Instituto de Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP. Cada cepa fue reactivada con su respectivo medio selectivo, *Pseudomonas putida* KT2440 en Citrato de Simmons-*Cm*<sup>150</sup> (CS con CM: cloranfenicol 150 µg/mL de medio), *Azospirillum brasilense* Sp7 RC-*Cro*<sup>50</sup> (Rojo Congo con CRO: Ceftriaxona 50 µg/mL de medio), *Acinobacter* sp EMM02 en DT-*CTX*<sup>30</sup> (Agar dextrosa triptona con CTX Cefotaxima 30 µg/mL de medio) , *Sphingomonas* OF178, en LB AL 5%- *AK*<sup>50</sup> (LB con AK amikacina. 50 µg/mL de medio).

Para la reactivación del multi-inoculante bacteriano (formulado con *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* EMMS02, *A. brasilense* Sp7, *Sphingomonas* sp. OF178) se utilizaron los mismos medios de cultivos selectivos de las cuatro cepas utilizadas.

### Crecimiento y suspensión celular de inoculación bacteriana

Los inóculos fueron preparados individualmente. Las cepas seleccionadas se sembraron en su medio selectivo por la técnica en sembrado masivo. El crecimiento celular de cada una de las cepas bacterianas se colectó en matraces con 100 mL de

agua destilada estéril. El multi-inoculante fue preparado con 10% de cada uno de los inóculos individuales en un volumen total de 100 mL.

Para determinar el número de bacterias en las suspensiones celulares, se realizó el método de goteo en placa (drop plate), que se fundamenta en realizar diluciones seriadas con un volumen final de 1mL; se agrega 100 µl de la suspensión bacteriana a 900 µl de MgSO<sub>4</sub> al 10 mM, se realizaron siete diluciones.

### **Desinfección y germinación de semillas**

Para poder evaluar la capacidad promotora de crecimiento bacteriano vegetal en cada uno de los tratamientos de *Lactuca sativa L.*, se realizó una desinfección de semillas previo a la inoculación, con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 10 minutos a una agitación constante (Galleli, *et al.* 2015). Una vez finalizado el tiempo de agitación, se hicieron 10 lavados con agua destilada estéril con intervalos de 2 minutos para eliminar rastros de hipoclorito de sodio.

Posteriormente se colocaron 300 semillas desinfectadas en cajas Petri, con una capa de vermiculita estéril humedecida con 5 mL de agua destilada estéril. Se utilizaron 50 semillas por cada tratamiento.

Se dejaron a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad hasta la emergencia radicular de las semillas.

Una vez emergidas se trasplantaron a las charolas germinadoras de 200 cavidades provistas de vermiculita estéril. Se colocó 1 plántula por cada cavidad y se regó con agua destilada estéril hasta la primera brotación de hojas verdaderas.

Todas las actividades descritas anteriormente se realizaron en condiciones estériles empleando campana de flujo laminar.

### **Inoculación bacteriana**

A los 10 días posteriores a la emergencia radicular, se inocularon los 5 tratamientos (50 plántulas por tratamiento), con 2 mL de la suspensión bacteriana en la raíz y sobre la vermiculita estéril. El grupo control únicamente consistió en plántulas libre de células bacterianas (sin inóculo). Se le adicionó 2 mL de agua destilada estéril.

Los tratamientos realizados se describen a continuación:

Cepa	Tratamiento	Población bacteriana En mono-inoculación (UFC/mL)	Población bacteriana en multi-inoculante (UFC/mL)
Grupo control (Ctrl)	Agua estéril y Solución MSJ	Ausente	Ausente
<i>Azospirillum brasilense</i> (Sp7)	Agua estéril y Solución MSJ	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^6$
<i>Sphingomonas</i> (OF178)	Agua estéril y Solución MSJ	$7 \times 10^7$	$7 \times 10^7$
<i>Acinetobacter</i> sp. (EMMS02)	Agua estéril y Solución MSJ	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^7$
<i>Pseudomonas putida</i> (KT2440)	Agua estéril y Solución MSJ	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^6$

### Solución nutritiva y Condiciones de invernadero

Después de la inoculación, las plantas se etiquetaron con su respectivo tratamiento y se mantuvieron en condiciones de invernadero bajo una temperatura mínima de 10 °C durante la noche y una máxima de 27 °C. Se regaron diariamente con agua estéril hasta la emergencia de las primeras hojas verdaderas aproximadamente 15 días después de la germinación (ddg). Las plantas recibieron una dosis de 2 mL de solución nutritiva MSJ tres veces a la semana hasta los 36 días posteriores a la germinación. La formulación de la solución MSJ es:  $NH_4NO_3$ ,  $KNO_3$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ , FeNaEDTA,  $H_3BO_3$ ,  $MnSO_4$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ , KI, preparada con agua destilada estéril (Murashige y Skoog, 1962). El pH oscilaba de 6.4 a 7.2

Cuando se alcanzó los 30 ddg, las plántulas se trasplantaron a bolsas compuestas de 1L vermiculita estéril (Muñoz *et al.*, 2003; Molina-Romero *et al.* 2017) colocando 150 mL de MSJ y 150 mL de agua estéril.

Las primeras dos semanas del establecimiento de la plántula en maceta, el regado por semana se realizó con 150 ml de MSJ y con 150 ml de agua estéril.

La tercera semana de establecimiento, el riego fue modificado a dos riegos con solución nutritiva y un riego con agua estéril por semana.

Cada una de las bolsas se colocaron dentro de una maceta para evitar cualquier tipo de contaminación.

### **Variables evaluadas**

Para evaluar el efecto de la inoculación de las PGPR en *Lactuca sativa* L., la cosecha se realizó 90 días después de la germinación (ddg). Se establecieron dos experimentos independientes. Las variables evaluadas fueron, biomasa húmeda, biomasa seca, longitud de la raíz, número de hojas, longitud de área foliar, colonización de la rizosfera y cuantificación de clorofila total, A y B.

### **Colonización bacteriana rizosférica**

Para evaluar la colonización del sistema radicular de las plántulas de *Lactuca sativa* L., se realizó un muestreo aleatorio a las 24 horas después de la inoculación y a los 30, 60 y 90 días posteriores a la inoculación (dpi).

Para poder cuantificar el número de bacterias adheridas a la raíz, se tomaron 5 plantas por cada tratamiento.

Las plantas de cada tratamiento se retiraron cuidadosamente de la vermiculita, el sistema radicular se colocó en un recipiente estéril independiente, y la raíz se agitó para descartar la vermiculita que no estaba adherida fuertemente a la raíz, se determinó el peso seco de la vermiculita separada de la raíz, este valor de peso seco de la vermiculita se empleó para generar el cociente de la población bacteriana que colonizó la raíz y la vermiculita adherida: Unidades formadores de colonia/gramo de vermiculita (UFC/gV) (Rodríguez-Andrade et al., 2015).

Cada una de las raíces se sumergieron en 50 mL de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  a al 10 mM y se agitaron constantemente durante 20 minutos en frascos estériles (se realizaron agitaciones manuales cada 5 min, con 30 repeticiones).

Las poblaciones bacterias rizosféricas se determinaron con el método de DropPlate a partir de la suspensión celular obtenida de las raíces de las plantas analizadas, se realizaron diluciones seriadas y se sembró 20  $\mu$ l de cada dilución (Morales et al. 2011) en el medio selectivo correspondiente: *Pseudomonas putida* KT2440 en Citrato de

Simmons-*Cm*<sup>150</sup> (CS con CM:cloranfenicol 150 µg/mL de medio), *Azospirillum brasilense* Sp7 RC-*Cro*<sup>50</sup> (Rojo Congo con CRO: Ceftriaxona 50 µg/mL de medio), *Acinobacter* sp SMM02 en DT-*CTX*<sup>30</sup> (Agar dextrosa triptona con CTX Cefotaxima 30 µg/mL de medio) , *Sphingomonas* OF178, en LB AL 5%- *AK*<sup>50</sup>(LB con AK amikacina. 50 µg/mL de medio).

### **Cuantificación de Clorofila**

Para la determinación de pigmentos fotosintéticos (Clorofila a y b) se siguió la metodología propuesta por Hiscox e Israelstam ,1979.

Se midió la densidad óptica por espectrofotometría a 645 y 663 nm. Para su determinación se empleó la ecuación descrita por Arnon, 1949 y los coeficientes de absorción de Mackinney:

Clorofila A= (12.7 x Abs 663) – (2.69 x Abs 645)

Clorofila B= (22.9 x Abs 645) – (4.68 x Abs 663)

Clorofila Total= (20.2 x Abs 645) + (8.02 x Abs 663)

Se establecieron 2 experimentos independientes en diferentes estaciones del año:

Primer experimento: Abril a Julio, utilizando como soporte vermiculita estéril.

Segundo experimento: Julio a Octubre utilizando como soporte vermiculita estéril.

### **Variables morfométricas**

Las plantas de lechuga se cosecharon a los 90 dpi. Se evaluó la biomasa fresca y seca de la parte aérea y la raíz.

Para medir el peso fresco, la planta fue retirada de la bolsa cuidadosamente y se sumergió la raíz en un contenedor de agua para eliminar cualquier resto de vermiculita, posteriormente se determinó el peso con una balanza granataria marca Zeigen.

Para evaluar la longitud foliar y longitud radicular se utilizó un metro y se contabilizó el número de hojas presentes de cada planta.

Para determinar el peso seco, las plantas se introdujeron a un horno de secado a una temperatura de 70 °C por 72 h hasta alcanzar un peso constante (Vargas *et al.*, 2001).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron sometidos a una evaluación estadística empleando un análisis de varianza (ANOVA) para comparar la diferencia de medias entre grupos y una prueba post-hoc Tukey en la morfometría y actividad fotosintética de *Lactuca sativa* L.

Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la colonización del sistema radicular de las plantas inoculadas con PGPR.

## RESULTADOS

### Evaluación de colonización bacteriana en *Lactuca sativa* L.

#### Colonización de PGPR en forma individual y en consorcio.

La evaluación de la adherencia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), a las 24 horas después de la inoculación, mostró que *P. putida* KT2440, presentó la mayor capacidad para adherirse e interactuar con el sistema radicular de *Lactuca sativa* L., con una población promedio de  $10^6$  UFC/gV ( $6.25 \pm 0.88$ ) corroborado con el análisis estadístico (Kruskall-Wallis  $p = 0.002$  Test de comparaciones múltiples Dunn muestra  $< 0.05$ ). Por otro lado, *Acinetobacter* EMMS02 ( $5.10 \pm 0.80$ ) y *Sphingomonas* OF178 ( $5.80 \pm 0.40$ ) presentaron una capacidad de adherencia similar, a diferencia de *A. brasilense* Sp7 ( $5.02 \pm 0.57$ ) con la menor adhesión (**Tabla 1**). Posteriormente, el consorcio bacteriano mostró una capacidad de adhesión en el orden de  $10^5$  UFC/ gV (**Tabla 2**).

La evaluación de la colonización a los 60 dpi sí presentó diferencias significativas entre los tratamientos individuales. *Acinetobacter* EMMS02 ( $3.55 \pm 0.55$ ) mostró una población promedio menor en el orden  $10^3$  UFC/gV (Kruskall-Wallis  $p = 0.047$ ). El resto de los tratamientos presentaron una población similar en un rango de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/gV (**Tabla 1**).

Por otro lado, el consorcio bacteriano presentó una disminución en la capacidad de colonización a los 60 ddi para *A. brasilense* ( $4.63 \pm 0.37$ ) y *Acinetobacter* EMMS02 ( $3.52 \pm 0.42$ ); sin embargo, para *Sphingomonas* OF178 ( $5.17 \pm 0.95$ ). y *P. putida* presentaron colonización similar a la adhesión (**Tabla 2**).

La evaluación de la colonización a los 90 días post-inoculación, mostró diferencias significativas (Kruskall-Wallis  $p = 0.005$ ), entre el tratamiento inoculado con *A. brasilense* que presentó una colonización de  $5.41 \pm 0.03$  UFC/gV; sin embargo, para *P. putida* KT2440 ( $6.69 \pm 0.65$ ), *Sphingomonas* OF178 ( $6.2 \pm 0.71$ ) y *Acinetobacter* EMMS02 ( $6.06 \pm 0.65$ ) registraron una población similar en el orden de  $10^6$  UFC/g. (**Tabla 1**) El consorcio bacteriano presentó una colonización en el orden de  $10^5$  y  $10^6$  UFC/gV, sin diferencia significativa (**Tabla 2**).

**Tabla 1 Capacidad de colonización de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) inoculadas en forma de mono-inoculación en el sistema radicular de *Lactuca sativa* L.**

Tratamientos	Log UFC/gV 24 horas ddi	Log UFC /gV 60 ddi	Log UFC /gV 90 ddi
Mono-inoculación	Adherencia	Colonización	Colonización
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	5.06 ( $\pm$ 0.57) c	5.44 ( $\pm$ 0.53) b	5.42 ( $\pm$ 0.03) b
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	6.25 ( $\pm$ 0.88) a	6.49 ( $\pm$ 0.35) ab	6.34 ( $\pm$ 1.54) a
<i>Acinetobacter sp.</i> EMMS02	5.10 ( $\pm$ 0.80) b	3.55 ( $\pm$ 0.53) c	6.07 ( $\pm$ 0.65) b
<i>Sphingomonas sp.</i> OF178	5.80 ( $\pm$ 0.40) b	6.03 ( $\pm$ 0.51) ab	6.22 ( $\pm$ 0.71) b

Los valores mostrados son la media de la evaluación de 5 plantas con la desviación estándar ( $\pm$ ) a las 24 horas, 60 y 90 días dpi. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ , Kruskal-wallis test).

**Tabla 2 Capacidad de colonización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) en forma de multi-inoculación bacteriana en el sistema radicular de *Lactuca sativa* L.**

Tratamiento con el multi-inoculante bacteriano	Logaritmo de la población bacteriana UFC/gV 24 horas ddi	Logaritmo de la población bacteriana UFC /gV 60 ddi	Logaritmo de la población bacteriana UFC /gV 90 ddi
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	5.13 ( $\pm$ 0.68) a	4.63 ( $\pm$ 0.37) bc	5.38 ( $\pm$ 0.85) b
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	5.17 ( $\pm$ 1.27) a	6.41 ( $\pm$ 0.55) a	6.69 ( $\pm$ 0.65) a
<i>Acinetobacter sp.</i> EMMS02	5.27 ( $\pm$ 0.63) a	3.52 ( $\pm$ 0.42) c	5.70 ( $\pm$ 0.59) b
<i>Sphingomonas sp.</i> OF178	5.43 ( $\pm$ 0.64) a	5.17 ( $\pm$ 0.95) ab	5.32 ( $\pm$ 1.17) b

Los valores mostrados son la media de la evaluación de 5 plantas más la desviación estándar ( $\pm$ ) a las 24 horas, 60 y 90 días ddi. Las letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ , Kruskal-wallis test).

## Actividad promotora de crecimiento de las PGPR sobre *Lactuca sativa* L.

Las características morfológicas de *Lactuca sativa* L. evaluadas fueron el número de hojas, longitud radicular, longitud foliar, biomasa húmeda y seca de raíz y parte área.

A los 90 días posteriores de la inoculación, se observó que las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 presentaron un mayor número de hojas, a diferencia de los demás tratamientos. En el segundo experimento, se registró que *A. brasilense* Sp7, *Acinetobacter* EMMS02 y el multi-inoculante presentan una similitud en el número de hojas con respecto a *P. putida* KT2440; en contraste *Sphingomonas* OF178, presentó un decremento en el número de hojas de *Lactuca sativa* L. (Figura 1)

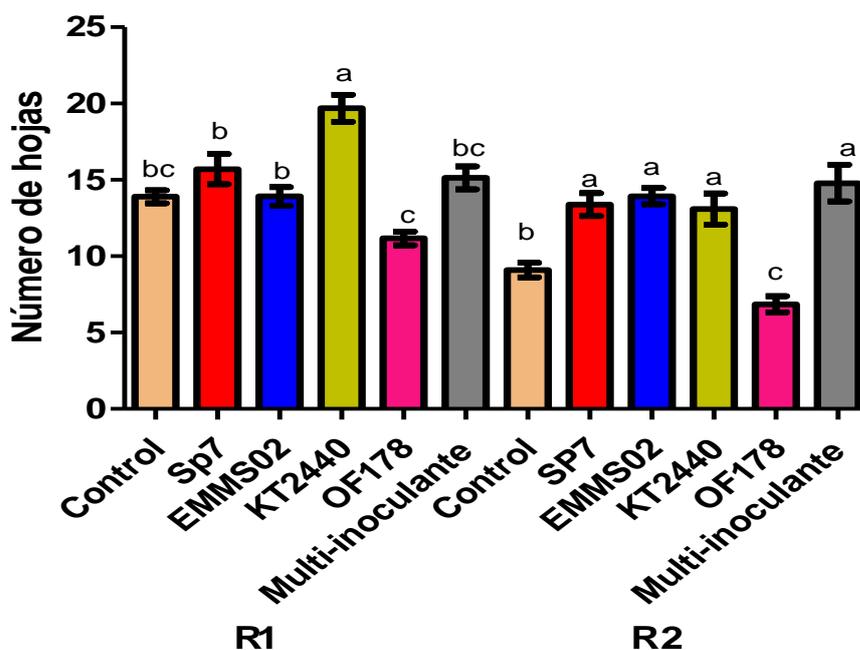


Figura 1 Media del número total de hojas presentes en *Lactuca sativa* L. a los 90 dpi inoculadas con PGPR: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc P < 0.05)

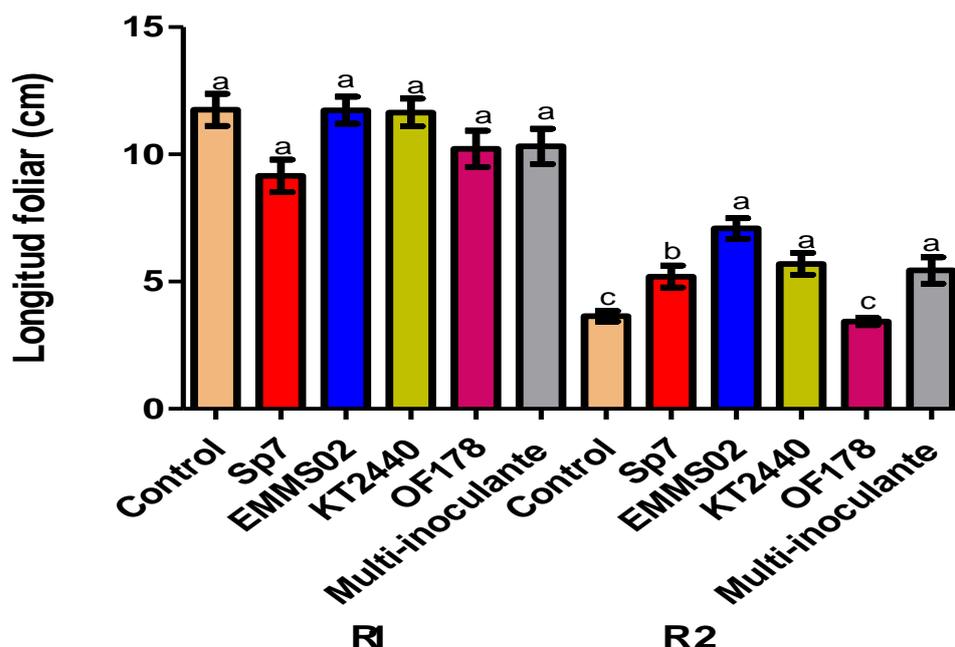


Figura 2 Media de la longitud foliar de *Lactuca sativa* L. de cuatro hojas por planta a los 90 dpi, inoculadas con las PGPR: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ )

En la evaluación de la longitud foliar de *L. sativa*, se observó que todos los tratamientos presentaron una tendencia similar en el primer experimento. En el segundo experimento se observó mayor longitud foliar en los tratamientos inoculados con *Acinetobacter* EMMS02, *Pseudomonas putida* KT2440, el multi-inoculante y *A. brasilense* Sp7, estos presentaron diferencias significativas en comparación al grupo control y *Sphingomonas* OF178 (**Figura 2**).

Posteriormente, la longitud radicular no presentó variación entre el grupo control y los seis tratamientos de inoculación en el primer experimento, sin embargo, en el segundo experimento, *P. putida* KT2440, *Acinetobacter* EMMS02, *A. brasilense* Sp7 y el multi-inoculante presentaron mayor sistema radicular con diferencias significativas en comparación al grupo control y *Sphingomonas* OF178. (**Figura 3**)

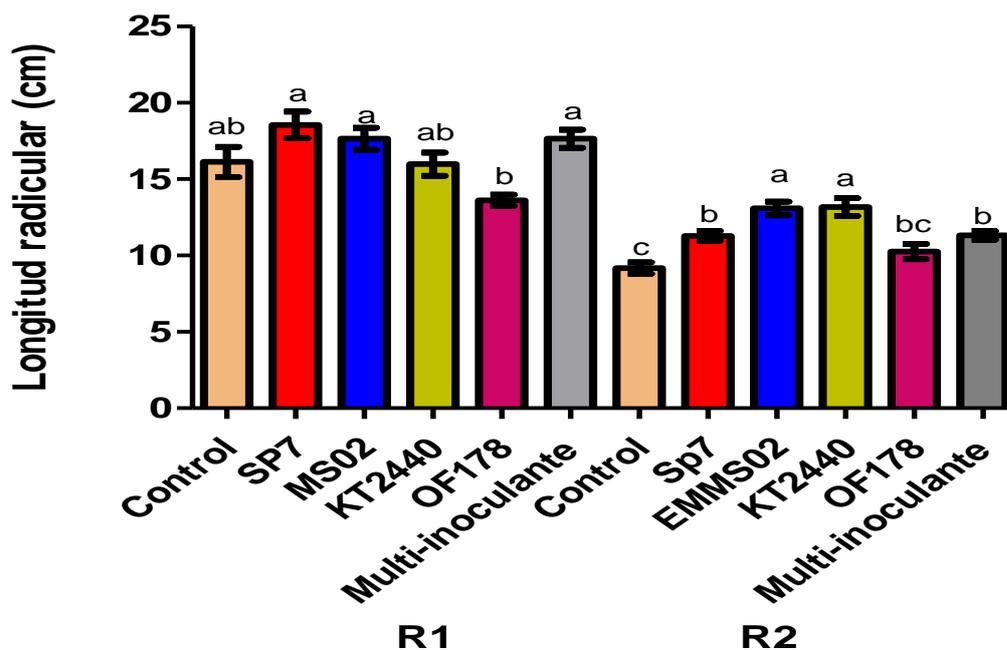


Figura 3 Longitud radicular de *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi, inoculadas con PGPR: *A. brasilense* Sp7; EMMS02: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ ).

La producción total de biomasa fresca de la parte aérea a los 90 ddi, registró durante el primer experimento (20 plantas evaluadas) que el tratamiento *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* sp. EMMS02, *A. brasilense* Sp7, el multi-inoculante y el control presentaron un peso similar en la biomasa fresca, a diferencia de *Sphingomonas* OF178 con una producción menor. En contraste, en el segundo experimento (25 plantas evaluadas) se observó una similar producción de la biomasa fresca de la parte aérea en los tratamientos de *P. putida* KT2240, *Acinetobacter* sp. EMMS02, *A. brasilense* Sp7 y el multi-inoculante, con una diferencia significativa en comparación al control y *Sphingomonas* OF178 (**Figura 4**).

En el primer experimento (20 plantas evaluadas) todos los tratamientos presentaron una similar producción de biomasa fresca de raíz, excepto para *Sphingomonas* OF178, este presentó la menor biomasa fresca de raíz en comparación con el tratamiento control; a diferencia del segundo experimento (25 plantas evaluadas), el tratamiento inoculado con *Acinetobacter* EMMS02 presentó la mayor biomasa fresca del sistema radicular a diferencia de los demás tratamientos inoculados y el grupo control. (**Figura**

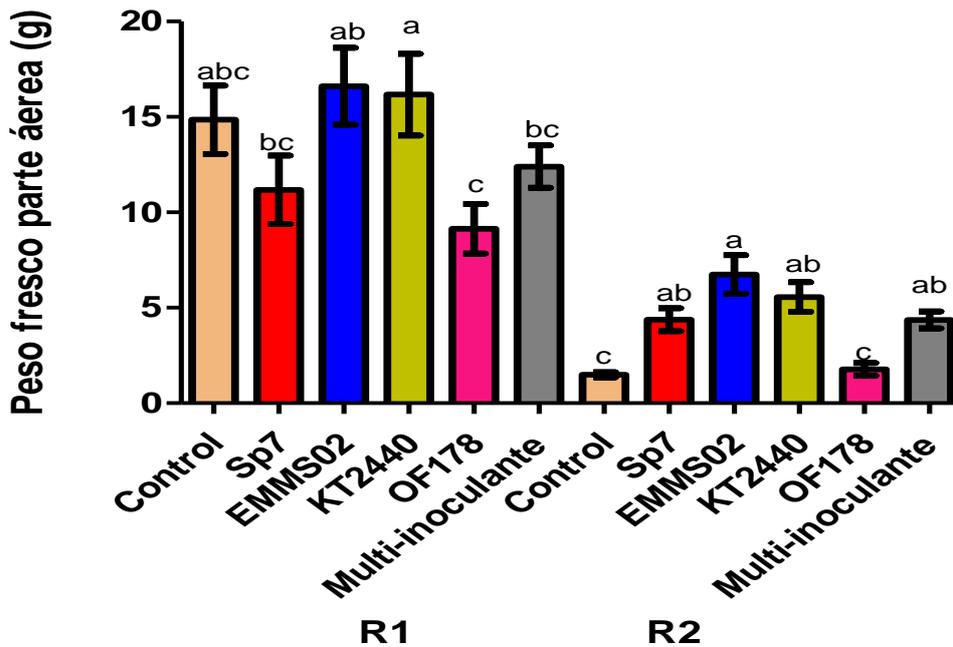


Figura 4 Peso fresco total de parte aérea de *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi, inoculadas con PGPR *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ ).

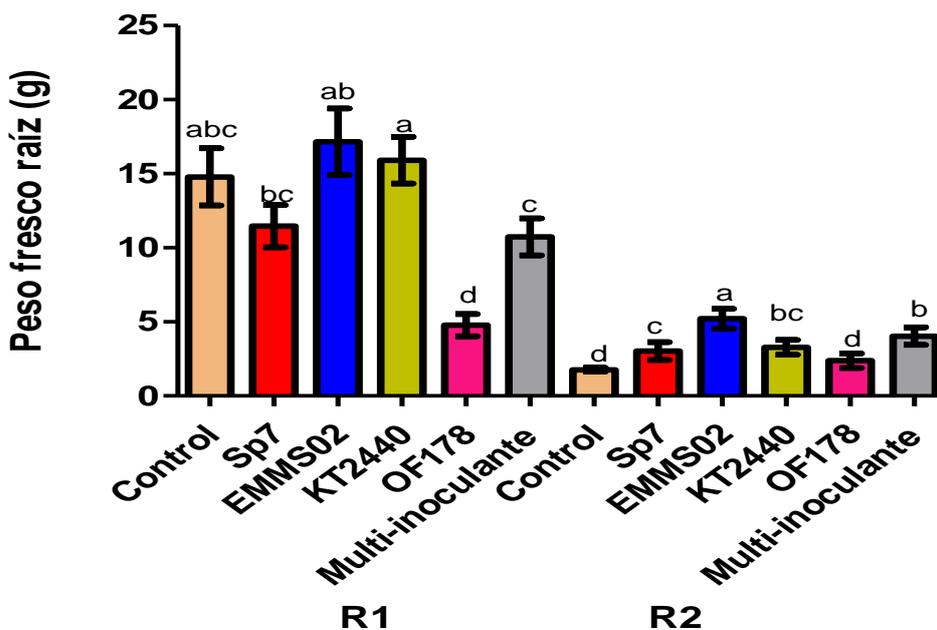


Figura 5 Peso fresco total de raíz de *Lactuca sativa* L. a los 90 dpi, inoculadas con PGPR: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ ).

El tratamiento con mayor peso seco de la parte aérea en el primer experimento fue *P. putida* KT2440 mostrando diferencias significativas ( $<0.05$ ) en comparación al grupo control y los demás tratamientos inoculados. En el segundo experimento la tendencia fue similar, el mayor peso seco lo presentó KT2440 y el tratamiento con *Acinetobacter* sp. EMMS02 (Gráfica 6).

Para el peso seco del sistema radicular, en el primer experimento no hubo diferencias significativas entre los tratamientos inoculados de forma individual, el consorcio y el grupo control; en contraste, el tratamiento inoculado con *Sphingomonas* OF178 generó menor peso seco radicular. En el segundo experimento, los tratamientos de *Acinetobacter* sp. EMMS02, *P. putida* KT2440 y el multi-inoculante reportaron el mayor valor de peso seco de la raíz y presentaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos de PGPR (Gráfica 7).

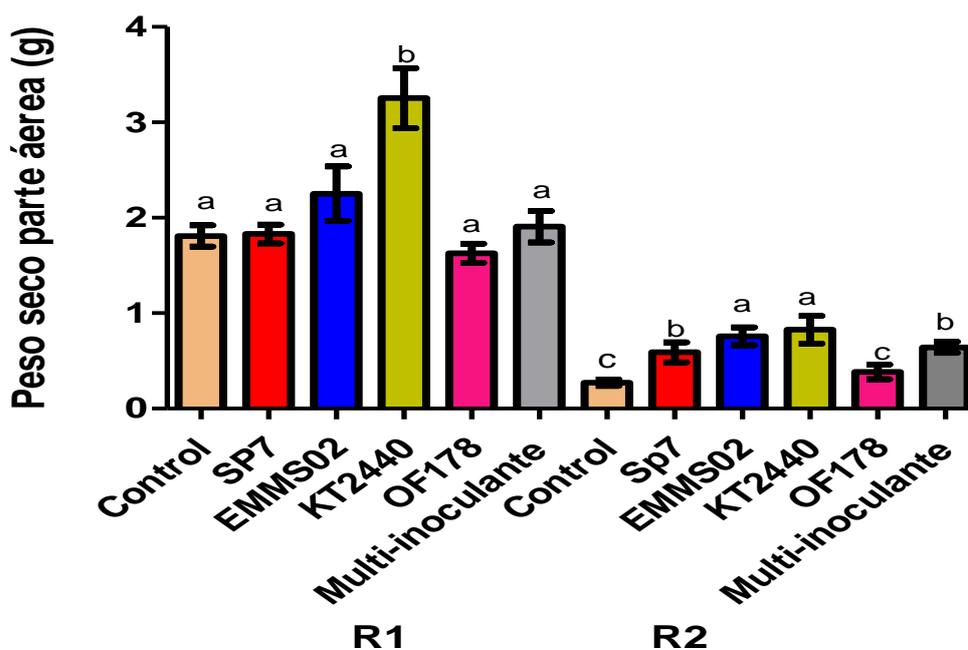


Figura 6 Peso seco total de parte aérea en *Lactuca sativa* L. a los 90 dpi, inoculadas con PGPR: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ ).

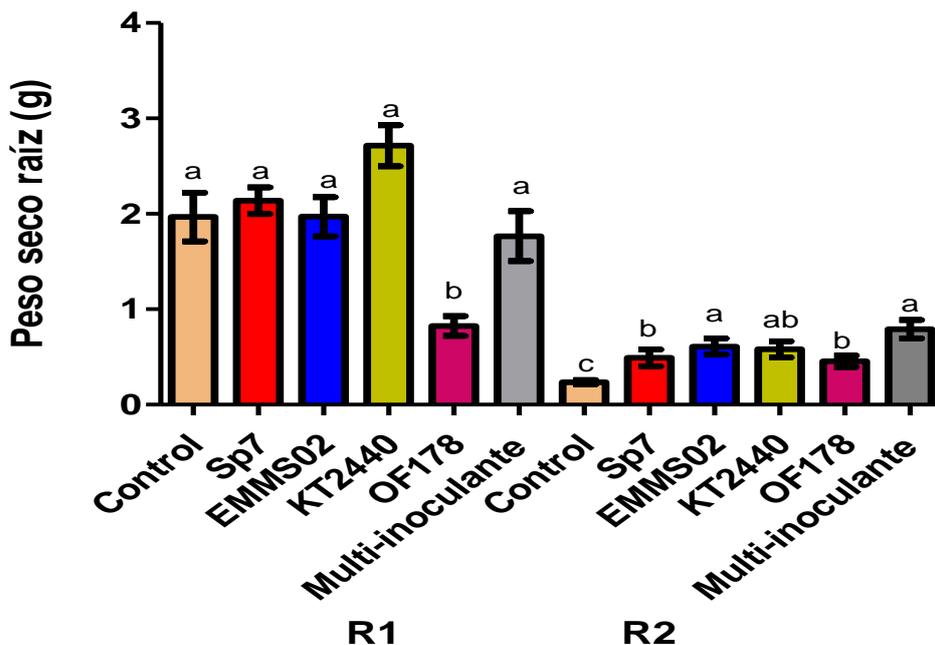


Figura 7 Peso seco total de raíz en *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi, inoculadas con PGPR: *A. brasilense* Sp7; *Acinetobacter* sp. EMMS02; *P. putida* KT2440; *Sphingomonas* sp. OF178. R1: experimento 1 corresponde a la evaluación de 20 plantas (n=20), R2: experimento 2 corresponde a la media de la evaluación de 25 plantas (n=25) (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativos Tukey post-hoc  $P < 0.05$ )

### Evaluación de actividad fotosintética de *Lactuca sativa* L.

Se determinó clorofila A, B y total a todos los tratamientos evaluados con la lechuga.

El primer parámetro evaluado fue Clorofila A (ChIA), el tratamiento del multi-inoculante ( $50.96 \pm 4.64 \mu\text{g/mL}$ ) mostró el mayor valor de ChIA, con una diferencia significativa con respecto al grupo control ( $33.18 \pm 7.42 \mu\text{g/mL}$ ), *A. brasilense* Sp7 ( $28.73 \pm 3.48 \mu\text{g/mL}$ ), *Acinetobacter* sp. EMMS02 ( $32.88 \pm 10.10 \mu\text{g/mL}$ ), *P. putida* KT2440 ( $29.59 \pm 13.81 \mu\text{g/mL}$ ) y *Sphingomonas* OF178 ( $23.68 \pm 5.63 \mu\text{g/mL}$ ) (**Figura 8**). El contenido de la Clorofila b en las hojas de *Lactuca sativa* L. fue similar en todos los tratamientos (**Figura 9**).

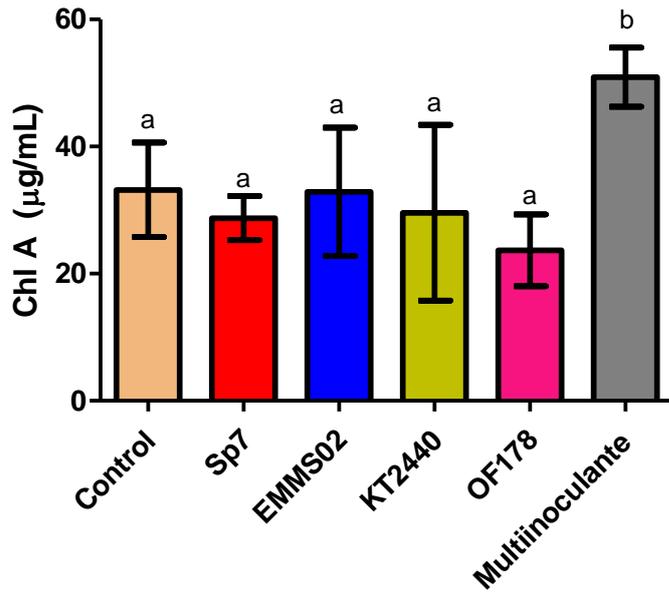


Figura 8 Contenido de Clorofila A (Chl A) evaluada en 0.5 g de hojas de *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi, plantas inoculadas con PGPR, media de la evaluación de 10 plantas (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas Tukey post-hoc  $P < 0.05$ )

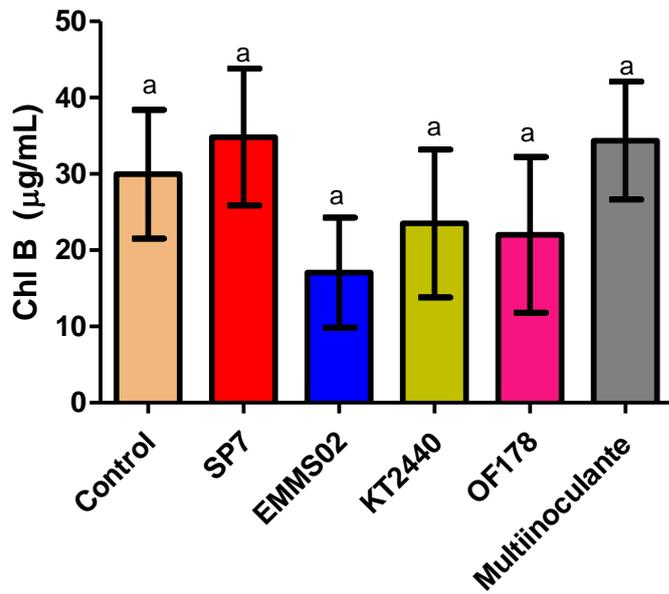


Figura 9 Contenido de Clorofila B (Chl B) evaluada en 0.5 g de las hojas de *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi., plantas inoculadas con PGPR, media de la evaluación de 10 plantas (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas Tukey post-hoc  $P < 0.05$ )

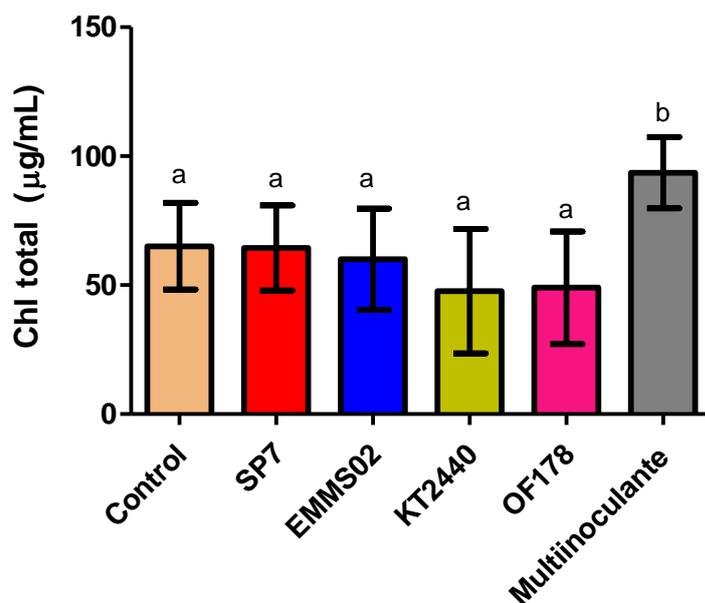


Figura 10 Contenido de Clorofila total evaluada en *Lactuca sativa* L. a los 90 ddi. (medias que no comparten una letra son estadísticamente significativas Tukey post-hoc  $P < 0.05$ )

Para el contenido total de clorofila el tratamiento con el multi-inoculante ( $93.59 \pm 13.79$  µg/mL) mostró el mayor valor en comparación con los demás tratamientos (**Figura 10**).

## DISCUSIÓN

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal son generalmente empleadas como inoculantes para la bioestimulación, biocontrol y biofertilización. Sin embargo, un requisito indispensable para promover el crecimiento vegetal es la colonización eficiente del sistema radicular de la planta (Noumavo *et al.*, 2016). Tal es el caso de *P. putida* KT2440 que en este estudio tuvo una densidad de colonización adecuada ( $10^6$  UFC /gV) a las 24 horas, 60 y 90 post-inoculación (**Tabla 1**). La colonización de *P. putida* en la rizosfera de *Lactuca sativa* L. fue similar a lo reportado en plantas de maíz (Molina-Romero *et al.*, 2017; Costa-Guiterrez *et al.*, 2020); esta capacidad de colonización a la radícula se podría sustentar con los estudios donde describen la excelente habilidad del género *Pseudomonas* para adaptarse rápidamente a nuevos ambientes (Martín *et al.*, 2014). Por otro lado, *A. brasilense* Sp7 obtuvo una densidad de colonización menor en un orden de magnitud en comparación a lo reportado en cultivos de pimiento inoculado con *A. brasilense* Sp-245 (Bashan, 1998) y lechuga

inoculada con *A. brasilense* T2P10 (Díaz-Vargas *et al.*, 2001). Es importante enfatizar que la colonización de *A. brasilense* Sp7 a la raíz de la lechuga fue menor en este trabajo en comparación con otros estudios; esta controversia se podría explicar por las diferentes interacciones bioquímicas presentes en el suelo y del genotipo de bacterias empleadas (Rojas-Muñoz & Caballero-Mellado, 2003) o incluso por la variedad de la planta que se esté utilizando (Vessey, 2003).

En este trabajo se utilizó vermiculita como sustrato para el establecimiento de *Lactuca sativa* L.; sin embargo, diversos autores han reportado que, al ser un suelo inerte, la facilidad para poder establecer una interacción con la planta sin competencia alguna es ideal. (Morales-García *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2017). Por otra parte, al proporcionar los nutrientes esenciales mediante una solución nutritiva, se sugiere que la bacteria se le dificulta adaptarse a un ambiente restringido en nutrientes por lo que los exudados ofrecidos por parte de la planta y los metabolitos por parte de suelo no son suficientes para establecer una adecuada colonización (**Tabla 1**).

En este estudio *Acinetobacter* sp. EMMS02 presentó una densidad de colonización baja a los 60 ddi ( $10^3$  UFC /gV); sin embargo, a los 90 días post-inoculación del sistema radicular, fue adecuada ( $10^6$  UFC /gV). La tendencia de colonización fue similar a lo reportado por Molina *et al.*, 2017 en plantas de maíz utilizando la misma cepa (**Tabla 1**). La eficiente colonización de esta rizobacteria se podría sustentar con estudios donde *Acinetobacter* sp., se perfila como una PGPR prometedora en promover el crecimiento debido a su capacidad de adaptarse a condiciones de estrés ambientales (Rokhbakhsh-Zamin *et al.*, 2011), esto podría explicar la reducción de población a los 60 ddi en la rizosfera con el sustrato de vermiculita y la eficiente colonización a los 90 ddi similar a la de *P. putida* KT2440 y a *Sphingomonas* OF178 ( $10^6$  UFC /gV). Sin embargo, para *Sphingomonas* OF178, la densidad de población no es similar a lo reportado en cacahuate (Jesus-Ramos *et al.*, 2020) y maíz (Morales-García *et al.*, 2013), estos estudios utilizaron la misma cepa en diferentes plantas. Lo anterior fortalece la hipótesis, que el efecto benéfico de la interacción de bacteria-planta es dependiente de la variedad de la planta y el genotipo de la planta (Muñoz-Rojas *et al.*, 2003; Martínez de Oliveira *et al.*, 2006).

Por otro lado, la colonización del consorcio registró un rango similar a la mono-inoculación evaluada a las 24 horas, 60 y 90 ddi. Las cuatro cepas inoculadas en

consorcio no mostraron ninguna actividad de antagonismo. Cada cepa colonizó el sistema radicular de la planta de manera eficiente como lo reportado en maíz inoculado con este consorcio (Molina-Romero *et al.* 2017) aplicado en este trabajo.

### **Promoción del crecimiento vegetal en Lechuga (*Lactuca sativa* L.)**

En este trabajo se observó que la inoculación con la cepa *P. putida* KT2440 tiene un efecto promotor en comparación a los demás tratamientos de inoculación en *Lactuca sativa* L. sembradas sobre vermiculita en condiciones de invernadero en dos estaciones diferentes del año. Estos resultados coinciden con Molina *et al.*, 2017 y Costa-Gutiérrez 2020 donde utilizan a *P. putida* KT2440 como una bacteria promotora de crecimiento vegetal en maíz y lechuga. Se ha reportado que una manera eficaz para evidenciar la promoción de crecimiento vegetal es la determinación del peso seco (Soriano *et al.*, 2012). Con la inoculación de esta cepa se obtuvieron los mayores valores de peso seco de la parte aérea y raíz a diferencia del grupo control en los dos experimentos realizados. Este resultado se puede sustentar por las características de que *P.putida* KT2440, como una PGPR que presenta diversos mecanismos directos e indirectos de promoción de crecimiento vegetal, como la solubilización de fosfatos, la producción de ácido indol acético (AIA), sideróforos (Molina *et al.*, 2017) y resistencia sistémica inducida (Matilla *et al.*, 2011). Se ha documentado que las bacterias capaces de solubilizar fosfato mejoran significativamente los parámetros morfométricos de las plantas, como el grosor del tallo, número de ramas o incluso el área foliar (El-Yazeid & Abou-Aly, 2011). Además, al ser productora de AIA, ejerce efectos anatómicos positivos sobre el sistema radicular como elongación y formación de raíces laterales, permitiendo una mayor absorción de nutrientes (Patten y Glick, 2002) otorgando a la planta mayores beneficios para un óptimo crecimiento.

Por otro lado, *Acinetobacter* sp. es un género que recientemente se ha documentado como una bacteria capaz de promover el crecimiento vegetal (PGPR) (Patel *et al.*, 2017). En estudios recientes la inoculación de *Acinetobacter* sp. registró el aumento de peso seco y longitud radicular de *P. glaucum* (Rokhbakhsh-Zamin *et al.*, 2011); la biomasa seca de plantas de Canola (P. Indiragandhi *et al.*, 2008), esto se podría explicar por las características que presentan algunas cepas de este género como la fitoestimulación (Huddedar *et al.*, 2002), solubilización de fosfato (Gulati *et al.*, 2009;

Peix *et al.*, 2009) producción de sideróforos (Sarode-Prashant *et al.*, 2009) e incluso fijación de nitrógeno in vitro (Patel *et al.*, 2017).

En este estudio se observó que la cepa *Acinetobacter* EMMS02 tuvo la capacidad de estimular el crecimiento de lechuga bajo temperaturas óptimas de crecimiento para la planta, esta cepa generó aumento en el número de hojas, peso seco y fresco de raíz, peso fresco del área foliar, longitud radicular en la segunda réplica. Estos datos refuerzan que *Acinetobacter* sp. es un género bacteriano PGPR con potencial para promover el crecimiento vegetal, sin embargo, aún desconocemos los cambios bioquímicos y moleculares que suceden en la interacción bacteria-planta en los dos experimentos realizados. Posiblemente la temperatura es un factor que dispara la activación de los genes de esta bacteria que participan en los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (Molina *et al.*, 2017).

Por el contrario, *A. brasilense* es una de las PGPR más estudiadas debido a su gran capacidad de aumentar el rendimiento en diferentes cultivos como maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004) y esto se debe a la capacidad de producción y liberación de fitohormonas como auxinas, citocininas, giberelinas (De Bashan *et al.*, 2007) y fijación biológica de nitrógeno, entre otras (Parra & Cuevas, 2001); sin embargo, en este estudio *A. brasilense* Sp7, en el primer experimento realizado, presentó un comportamiento similar al grupo control; en contraste, en el segundo experimento si se observó promoción de crecimiento por el aumento en el número de hojas, longitud radicular, longitud foliar, peso fresco y seco de raíz y parte aérea. **(Figura 1-8)**. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mangmang *et al.*, 2015 donde inocularon a *A. brasilense* Sp7-S en lechuga y se observó el incremento del número de hojas y la longitud del sistema radicular.

Los resultados obtenidos con la inoculación de *Sphingomonas* OF178 mostraron un crecimiento similar o menor al tratamiento control **(Figura 1-8)**. La adherencia y la colonización de esta cepa en la rizosfera de la planta fue eficiente **(Tabla 1)**. Si bien, diversos autores mencionan que la capacidad de supervivencia de las bacterias y la colonización es esencial para llevar a cabo la promoción de crecimiento (Nihorimbere V. *et al.*, 2011; Noumavo *et al.*, 2016) así como la compatibilidad entre los microorganismos y los factores intrínsecos de la planta, específicamente los

exudados de raíz (Trivedi et al., 2012). En este trabajo no se observó una promoción de crecimiento a pesar de generar una eficiente colonización del sistema radicular de la lechuga, en cambio se presentó una alteración negativa en la morfometría de *Lactuca sativa* L. en las plantas inoculadas con esta cepa. Estos resultados son similares a lo reportado por Jesús-Ramos et al., 2020 donde inoculó a *Sphingomonas* OF178 para potenciar el crecimiento del cacahuate, estos autores reportaron una disminución en el número de hojas y ramas con respecto a las plantas no inoculadas. También se ha reportado que algunas bacterias promotoras de crecimiento vegetal al ser inoculadas en plantas como cacahuate generan efectos negativos en su desarrollo como necrosis, clorosis en los tejidos (Merino et al., 2020) o incluso, la disminución en el sistema radicular del frijol (Torrez-Gutiérrez et al., 2020) esto podría deberse a el exceso de metabolitos producidos por parte de la bacteria, causándole a la planta un efecto tóxico, por ejemplo *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria que produce hasta 78 µg mL<sup>-1</sup> de AIA y otros metabolitos, provocando una alteración negativa sobre la planta, originando “agalla de la corona” cuyos síntomas son tumores en raíces, tallos y ramas en diversas especies vegetales (Liu et al., 1982; Khakipour et al., 2008; Farzana et al., 2009; Zarrin et al., 2009; Wahyudi et al., 2011; Lara-Mantilla et al., 2011).

Por otro lado, el multi-inoculante reportó diferencias significativas en el peso seco de raíz y parte aérea de la lechuga en el segundo experimento bajo condiciones óptimas de temperatura para el crecimiento de la planta, en comparación al control, pero la promoción de crecimiento vegetal fue similar a la inoculación individual de *P. putida* KT2440 o *Acinetobacter* EMMS02 (**Figura 6**). Diversos autores reportaron que al combinar distintas PGPR (multiinoculante), promueven el crecimiento y favorecen el rendimiento del cultivo de forma superior en comparación a la mono-inoculación debido a las actividades sinérgicas que ofrecen los multiinoculantes hacia las plantas (Young et al., 2007; Xin qi et al., 2019; Jesús-Ramos et al., 2020). Estas cepas previamente utilizadas en otros estudios en forma de multi-inoculante, se reportó que el consorcio estimuló el crecimiento del maíz de manera favorable y superior a diferencia de la mono-inoculación y el grupo control (Molina et al, 2017). Sin embargo, en este trabajo el consorcio bacteriano generó cambios significativos para *Lactuca sativa* L. similares a la mono-inoculación; en contraste, la capacidad de colonización del consorcio fue la más eficiente en el sistema radicular. Los resultados observados

en este trabajo concuerdan con la premisa que establece que el genotipo de los organismos involucrados juegan un papel importante en el efecto benéfico generado por la asociación entre microorganismos y plantas.

Además, en un estudio realizado con cuatro genotipos de maíz, se observó que dos de ellos respondieron favorablemente a la inoculación con *Azospirillum* en comparación a las otras dos variedades (García de Salamone et al., 1996), lo anterior podría explicar que la multi-inoculación del consorcio con esta variedad de lechuga, no es superior en comparación a la mono-inoculación de *P. putida* KT2440 o *Acinetobacter* EMMS02.

### **Cuantificación de Clorofila**

En este estudio la evaluación de la concentración de la clorofila en *Lactuca sativa* L., tanto la clorofila A (ChA) y Clorofila total fue similar a los tratamientos inoculados individualmente con las PGPR y el grupo control, excepto para el consorcio bacteriano.

En contraste, los tratamientos inoculados con *P. putida* KT2440 o *Acinetobacter* EMMS02 si presentaron diferencias significativas en los parámetros de peso seco de la parte aérea y de la raíz, número de hojas y longitud foliar con respecto al control a pesar de contener la misma concentración de Clorofila A, B y total. Sin bien, en estudios donde algunas plantas son inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal ya sea para promover el crecimiento o para la recuperación de suelos contaminados (fitorremediación), las comparaciones de clorofila son mayores con respecto al grupo control (Perez-Rosales *et al.*, 2017; Castro & Blanco, 2018; Diagne *et al.*, 2020), debido a que estas rizobacterias les proveen metabolitos para un óptimo desarrollo vegetal, por lo que la clorofila es un marcador ideal para evaluar el estado nutricional de la planta (Salisbury & Ross, 1992; Potash & Phosphate Institute, 1997), este parámetro se asocia con la producción de biomasa vegetal (Bashan et al. 2006; Nobel 2009), esta correlación concuerda con la inoculación de la lechuga con el consorcio (en el segundo experimento), este tratamiento presentó mayor pesos seco de la raíz, la parte aérea y concentración de clorofila total en comparación al control; este resultado coincide con lo reportado por Ruiz-Santiago

*et,al.*, 2019; donde utilizan consorcios bacterianos para promover el crecimiento y obtener un mejor rendimiento en las plantas inoculadas.

Esta correlación se puede explicar por la función que desempeñan estos dos pigmentos (Clorofila A y B) para la captación de la energía luminosa y su contribución en el proceso fotosintético (Ruiz-Santiago *et al.*,2019), por lo que el incremento en la actividad fotosintética generada en las hojas de lechuga y la combinación con la actividad benéfica de las PGPR, sustentaría el obtener un mayor crecimiento vegetal, sin embargo, desconocemos el sustento bioquímico para explicar porque si existe un aumento en el crecimiento vegetal y no en la concentración de clorofila en los tratamientos inoculados con *P. putida* KT2240 o *Acinetobacter* EMMS02 bacterias promotoras de crecimiento vegetal de *Lactuca sativa* L. var. Longifolia en este trabajo.

## CONCLUSIÓN

1. La colonización bacteriana de las PGPR evaluadas fue eficiente en el sistema radicular de *Lactuca sativa* L., en forma de monoinoculación y multiinoculante.
2. *Pseudomonas putida* KT2440 es una bacteria que ejerce un efecto promotor de crecimiento en *Lactuca sativa* L.
3. *Acinetobacter* sp. EMMS02 podría ser una candidata para promover el crecimiento vegetal en *Lactuca sativa* L.
4. *Sphingomonas* sp. OF178 ejerce un efecto inhibitor en el crecimiento de *Lactuca sativa* L., en contraparte, esta bacteria presentó una adecuada capacidad de colonizar la raíz.
5. La inoculación de la lechuga con el multi-inoculante incrementó la concentración de clorofila total y en algunos parámetros morfométricos.

## PRESPPECTIVAS

- Evaluar la actividad de promoción de crecimiento de *Lactuca sativa* L., en condiciones de campo cuando es inoculada con *Pseudomonas putida* KT2240 y *Acinetobacter* sp. EMMS02.
- Estudiar la asociación genotípica de estas PGPR con diferentes variedades de *Lactuca sativa* L.
- Demostrar cambios histofisiológicos en la anatomía de *Lactuca sativa* L. cuando son inoculadas con *Pseudomonas putida* KT2440 y *Acinetobacter* sp. EMMS02.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ahemad, M. & Khan S.M (2011). Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. 86, 945-950.
- 2) Ahmadzadeh M, Tehrani AS (2009) Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biol Control* 48:101–107
- 3) Alcantara-Cortes, J.S., Acero G.J., Alcantara-Cortes J.D., Sanchez-Morales, Ruth., (2019) Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*. 17(32), 109-129.
- 4) Alzate JF, Loaiza LF. (2008). Monografía del cultivo de la lechuga. *Colinagro*, pp.37.
- 5) Azcon-Bieto, J. y Talón M. (2016). *Fundamentos de fisiología vegetal*. pp. 377-398. Ed. Mc Graw Hill/ Interamericana de España, Madrid, España.
- 6) Balogh, B., Jones J.B., Iriarte, F., Momol, M. (2010) Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol* 11:48–57
- 7) Baldani, J.I., Krieg, N.R., Baldani, V.L.D., Hartmann, A., Döbereiner, J. (2005) Genus II. *Azospirillum*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Brenner DJ, Krieg NR & Staley JT, eds), pp. 7–26. Springer-Verlag, New York.
- 8) Bakker PA, Pieterse CM and van Loon LC (2007) Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97 239–243.
- 9) Bashan, Y., de bashan, L., (2010) How the plant growth -promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth . A critical assessment . *Advances in Agronomy* 108,77 -136.
- 10) Bashan, Y., Levanony, H., & Whitmoyer, R. E. (1991) Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology* 131:187-196.
- 11) Beltrán, P. E. M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113.
- 12) Beneduzi A., Ambrosini A., Passaglia LM. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet Mol Biol*. 35(4).
- 13) Bhattacharyya, P.N. & Jha, D. N. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) : emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*. 28 :1327–1350.
- 14) Bharti. P., Tewari, R., (2015) Purification and structural characterization of a phthalate antibiotic from *Burkholderia gladioli* OR1 effective against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *The J Microb Biotech Food Sci*. 5, 207.
- 15) Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix H., Dhondt S., Ait Bark, E., Kauffmann, S., Jeandet, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Clement, C., Baillieu, F., Dorey, S. (2011) Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant

- growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *J Exp Bot* 62:595-603 .
- 16) Busse H.J., Denner EBM., Buczolits S., Salkinoja-Salonen M., Bennisar A., Kampfer P., (2003) *Sphingomonas autantica* sp.nov. *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* so. Nov. Air and dustborne and Antarctic, Orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53 : 1253-1260.
  - 17) Camelo R. M., Vera M. S., & Bonilla B. R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 12:2 159-162.
  - 18) Carrasco, S. & Sandoval C. (2016). Manual práctico del cultivo de Lechuga. Madrid, España: Mundi-Prensa
  - 19) Castro, Y. & Blanco, E. L.(2018) Estimación del contenido de Clorofila y Nitrógeno en plantas de pimentón inoculadas con bacterias rizosféricas. *Científica UNET*. 30(1); 105-112.
  - 20) Costa-Gutierrez, S. B.-L.-D.-H.-U. (2020). Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of eptA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 10: 4577-4592.
  - 21) Desbrosses, G., Contesto, C., Varoquax F., Galland M., Touraine, B., (2009) PGPR-*Arabidopsis* interactions is a useful system to study signalling pathways involved in plants developmental control. *Plant Signal Behav.* 4, 321-323.
  - 22) Díaz Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez J.J. & Alcántar González, G. (2011) INOCULACION DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO EN LECHUGA. *Terra*. 19(4):327-335.
  - 23) Díaz-Franco, A. & Ortegón, M. A. (2006). Efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* y fertilización química en el crecimiento y rendimiento de canola (*Brassica napus*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 29: 63 - 67
  - 24) Dowling DN and O’Gara F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* 12 133–141.
  - 25) El-Yazeid, A. A., & E. Abou-Aly (2011). Enhancing growth productivity and quality of tomato plants using phosphate microorganisms. *Aust. J. Basic Appli. Sci.* 5 : 371-379.
  - 26) Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R. y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 251-258.
  - 27) Farzana, Y., O. Radziah, S. Kamaruzaman, and S. S. Mohd. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growthpromoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *African J. Microbiol. Res.* 3: 815-821.
  - 28) Frampton, R.A., Pitman, A.R., Fineran P.C. (2012). Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Int J Microbiol.*

- 29)FAO. (2013). Producción de alimentos y materias primas agrícolas. [En línea]. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Revisado 1 de marzo del 2013).
- 30)Fasciglione G. Casanovas M. E., Yommi, A. Sueldo A.J., Barassi, C.A. (2012) *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *J Sci Food Agric.* 92: 2518–2523.
- 31)Felici, C., Vettori, L., Giraldi, E., Forino, L.M.C., Toffanin, A.M., & Nuti, M. (2008) Single and co-inoculation of *bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*. Effects on plants growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40(2), 260-270.
- 32)Gallardo M., Jackson L.E., Thompson R.B. (1996 b). Shoot and root physiological responses to localized zones of soil moisture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp). *Plant Cell and Environment* 19, 1169-1178.
- 33)Galelli, M.E., Sarti G.C., & Miyazaki. S.S. (2015) *Lactuca sativa* biofertilization using biofilm from *Bacillus* with PGPR activity. *Journal of Applied Horticulture*, 17(3): 186-191.
- 34)García-Olivares, J. G. Moreno-Medina, V. R. Rodríguez, -Luna, I. Mendoza-Herrera, A. y Mayek-Pérez, N. (2007). Efectos de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 305-310
- 35)García-Olivares, J.G., Moreno-Medina V. R., Rodríguez-Luna I. C., MendozaHerrera A. & Mayek-Pérez, N. (2006) BIOFERTILIZACIÓN CON *Azospirillum brasilense* EN SORGO, EN EL NORTE DE MÉXICO. *Agric. Téc. Méx.* 32(2), 135-141.
- 36)García de Salamone, I.E., Döbereiner J., Urquiaga, S. (1996) Fijación biológica en asociaciones de genotipos de maíz cepa-cepa *Azospirillum* evaluadas N técnica de dilución de isótopos. *Biol Fertil Soils.* 23, 249-256.
- 37)Goswami, D., Thakker, J. N., Dhandhukia, P. C. & Tejada-Moral, M. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). doi:10.1080/23311932.2015.1127500.
- 38)Granval, N., & Graviola, J.C. ( 1991) Manual de producción de semillas hortícolas. Asociación Cooperadora de la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 82 pp.
- 39)Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana RC (2009) Plant growthpromoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter* rhizosphaerae strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Current Microbiology* 58: 371-377.
- 40)Haas, D. & Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Nature Rev Microbiol.* 3: 307-319.
- 41)Hernán-Boris V.Z., & Almanza-Vega G. (2016) EVALUATION OF THE EFFECT OF MACRONUTRIENTS FROM HUMAN URINE AS FERTILIZER IN THE GROW OF *LACTUCA SATIVA*. *Bolivian Journal of Chemistry* ,33(1) 20-26.

- 42) Hibbing M. E, Fuqua ,C., Parsek, M.,R, Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Rev Microbiol*, 8: 15-25.
- 43) Hynes, R.K., Leung, G.C., Hirkala, D.L., Nelson, N.M. (2008) Isolation, selection, of characterization of beneficial rhizobacteria from pea , lentil and chickpea grow in Western Canada. *Can,J. Microbiol.* 54,248-258.
- 44) Huddedar S, Shete A, Tilekar J, Gore S, Dhavale D, Chopade B (2002) Isolation, characterization, and plasmid pUPI126-mediated indole-3-acetic acid production in *Acinetobacter* strains from rhizosphere of wheat. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102: 21-39.
- 45) Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM (2008) Characterization of plant growth–promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* 56: 327-333.
- 46) Imra A., Siddiqui S., Shahid Shaukat. (2002) Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. *Biol Fertil Soils* 36:260–268.
- 47) Joo, G.,L., Kin, Y.M., Kim, J.T., Rhee,, I.K., Kim, J.H., Lee, I.J., (2005) Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *J. Microbiol.* 43 , 510-515.
- 48) Jahanian, A., Chaichi, M.R., Rezaei, K., Rezayazdi, K., Khavazi, K. (2012) The effect of plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) on germination and primary growth of artichoke (*Cyanara scolymus*). *Int. J. Agric. Crop Sci.* 4, 923-929.
- 49) Jesús-Ramos, A., Antonino Baez, A., Molina-Romero, D., Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E. (2020) Potenciación del crecimiento de cacahuete criollo Huaquechula por bacterias rizosféricas aplicadas de forma individual o en consorcio. *Alianzas y Tendencias -BUAP*, 5(19):20-39.
- 50) Muñoz-Rojas, J., & Caballero-Mellado, J. (2003). Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microbial Ecology*, 46(4), 454–464. doi:10.1007/s00248-003-0110-3
- 51) Katiyar. V.& Goel, R. (2004). Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regul* 42: 239-244.
- 52) Kuan KB, Othman R, Rahim KA, Shamsuddin ZH (2016) Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS one* 11:e0152478.
- 53) Kumar A., & Verma JP. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiol. Res.* 207, 41–52.

- 54) Kumar S, Pandey P, Maheshwari DK (2009) Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4. *Eur J Soil Biol* 45:334–340.
- 55) Labra-Cardón, D., Guerrero-Zúñiga, L. A., Rodríguez-Tovae, A. V., Montes-Villafán, S., Pérez-Jiménez, S. & Rodríguez-Dorantes, A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Rev. Int. Cont. Ambient*, 28(1), 7-16.
- 56) Lara-Mantilla, C., L. Oviedo-Zumaqué y C. A. Betancur-Hurtado. (2011) Bacterias nativas con potencial en la producción de ácido indolacético para mejorar los pastos. *Zootec. Trop.* 29: 187-194.
- 57) Li, Q., Saleh-Lakha S., Glick B.R., (2005) The effect of native and ACC desaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Can J microbiol*, 51,511-514.
- 58) Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140,943-950. 3
- 59) Liu, C. H., X. Chen, T. T. Liu, B. Lian, Y. Gu, V. Caer, Y. R. Xue, and B. T. Wang. (2007) Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 459-466.
- 60) Liu, S. T., K. L. Perry, C. L. SchardL, and C. I. Kado. (1982). *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 79: 2812-2816
- 61) Ma, Y., Rajkumar, M., Freitas, H. (2009a). Isolation and characterization of Ni mobilizing PGPB from serpentine soils and their potential in promoting plant growth and Ni accumulation by *Brassica spp.* *Chemosphere* 75, 719–725.
- 62) Ma. Y., Rajkumar, M., Luo, Y., Freitas, H. (2011b) Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants- effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.* 19-,230-237.
- 63) Martín, M., Martínez-Granero, F., & Rivilla, R., (2011) COLONIZACIÓN DE LA RIZOSFERA POR PSEUDOMONAS. En Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. *Fundamentos y Aplicaciones Agroambientales de las Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismos.* (pp.333-344).
- 64) Margesin, R., Zhang D.-C and Busse H.J. (2012) *Sphingomonas alpina* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* .62, 1558–1563
- 65) Martínez-Morales, L. J. Soto-Urzúa, L. Baca, B. E. and Sánchez, J. A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 228(2):167-173.
- 66) Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., Mengel, K.(2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertil Soils.* 30,433-439.

- 67) Mangmang, J.S., Deaker, R., Rogers, G., (2015). Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching Hort. Sci. (Prague). (1): 37–46 .
- 68) Muñoz-Rojas, J., & Caballero-Mellado, J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. Microb Ecol. 46:454–464.
- 69) Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L and Ramos JL 2000 Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.* 32 315–321.
- 70) Molina-Romero D, Baez A, QuinteroHernández V, Castañeda-Lucio M, Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales MdR, et al. (2017) Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. *PLoS ONE* 12(11).
- 71) Morales-García, Y.E. (2013). ANTAGONISMO ENTRE BACTERIAS DE INTERÉS AGRÍCOLA Y EVALUACIÓN DE INOCULANTES. (Doctorado) Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- 72) Moreno-Reséndez A., García-Mendoza V., Reyes-Carillo J. & Cano-Ríos P. (2018) Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 20(1), 68-83.
- 73) Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- 74) Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster, D.J., Sikora, D.J., Polston, J.E., Kloepper, J.W., (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. *Plant Dis.* 84, 779-784.
- 75) Muñoz, P., Ortiz, C., Ferrer, F., Montero, J.
- 76) Muñoz, P. Ortiz, C. Ferrer, F. Montero, J.I. (2014). Efectos de la fertilización nitrogenada sobre la producción y calidad de un cultivo de escarola. V Jornadas del grupo de Fertilización. *Actas de Horticultura* 66:116-121
- 77) Nehra, V., Saharan, B. S. & Choudhary, M. (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *Springerplus*, 5(1), 948.
- 78) Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargianssi, M., Thonart P. (2011) Beneficial effect of the
- 79) Noumavo, P. A., Agbodjato, N. A., Baba-Moussa, F., Adjanooun, A. & Baba-Moussa, L. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*, 15(27), 1452- 1463.
- 80) Ohta, H., Hattori, R., Ushiba, Y., Mitsui, H., Ito, M., Watanabe, H., Tonosaki, A. & Hattori, T. (2004). *Sphingomonas oligophenolica* sp. nov., a halo- and organo-sensitive oligotrophic bacterium from paddy soil that degrades phenolic acids at low concentrations. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2185–2190.

- 81) Parra, J., & Cuevas, F. (2001) Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Redalyc*. 31, 14
- 82) Patel, P., Rushabh, S. & Krunal M. (2017) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING POTENTIAL OF *Acinetobacter* sp. RSC7 ISOLATED FROM *Saccharum officinarum* cultivar Co 671. 5(4), 483-491.
- 83) Patten CL and Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68:3795-3801
- 84) P. Indiragandhi, R. Anandham, M. Madhaiyan (2008) Characterization of Plant Growth -Promoting Traits of Bacteria Isolated From Larval Guts of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr Microbiol*. 56:327-333.
- 85) Peix A, Lang E, Verborg S, Spröer C, Rivas R, Santa-Regina I, Mateos PF, Martínez-Molina E, Rodríguez-Barrueco C, Velázquez E (2009). *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 334-341.
- 86) Postma J, Montanari M, van den Boogert PHJF. (2003). Microbial enrichment to enhance the disease suppressive activity of compost. *Eur J Soil Biol*. 39:157–163.
- 87) Potash and Phosphate Institute. 1997. Manual internacional de fertilidad de suelos. Norcross, G.A. U.S.A. 146 p.
- 88) Poupin, M.J., Timmermann, T., Vega, A., Zuñiga., A., Gonzáles, B., (2013) Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 8,69435.
- 89) Quintero, I., J. Zambrano, M. Cabrita y R. Gil. 2000. Evaluación en campo y postcosecha de nueve cultivares de lechuga *Lactuca sativa* L. *Rev. Fac. Agron*. 17: 482-491.
- 90) Ramamoorthy V., Visawanathan R., Raguchander T., Prakasam V., Samiyappan, R. (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pest and diseases. *Crop Prot* 20:1-11.
- 91) Ryals J.A, Neuenschwander U.H, Willits M.G, Molina, A., Steiner H-Y & Hunt, M.D, (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1808-19
- 92) Rincón L. (2001). Necesidades hídricas, absorción de nutrientes y respuesta a la fertilización nitrogenada de la lechuga iceberg. Tesis doctoral. 211 pp.
- 93) Rodríguez-Andrade, O., Fuentes-Ramírez, L.E., Morales-García, Y. E., Molina-Romero, D., Bustillos-Cristales, M.R., Martínez-Contreras, R.D., Muñoz-Rojas, J., (2015) The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. *Rev Argent Microbiol*. 47(4):335-343.

- 94) Rokhbakhsh-Zamin, F., Dhara Sachdev<sup>1,2</sup>, Nadia Kazemi-Pour<sup>2</sup>, Anupama Engineer<sup>3</sup>, Karishma R. Pardesi<sup>1</sup>, Smita Zinjarde<sup>2</sup>, Prashant K. Dhakephalkar & Balu A. Chopade. (2011) Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(6), 556–566.
- 95) Rosas SB, Avanzini G, Carlier E, Pasluosta C, Pastor N, Rovera M (2009) Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biol Biochem* 41:1802–1806
- 96) Russo, A., Vettori, L., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., Toffanin, A., (2008) Enhanced micropopagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr.S 2 /5 plants. *J. Biotechnol.* 137, 312-319.
- 97) Rhitu Kotoky, Sujit Das, L. Paikhomba Singha, Piyush Pandey, K. Malabika Singha. Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB4. *Environmental Technology & Innovation* 8,256–268
- 98) Sachdev D, Nema P, Dhakephalkar P, Zinjarde S, Chopade B (2010) Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of *Acinetobacter* community from the rhizosphere of wheat. *Microbiological Research* 165: 627-638.
- 99) Salisbury, F. B., Ross, C. W. (1992) *Fisiología vegetal*. Ed. Iberoamérica S.A. México. p: 319 338.
- 100) Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda M & Glick BR (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* 183,92–99.
- 101) Sarode Prashant D, Rane Makarand R, Chaudhari Bhushan L, Chincholkar Sudhir B (2009) Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. *Malaysian Journal of Microbiology* 5: 6-12.
- 102) Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot* 64:2565- 2577.
- 103) Sharma A, Johri BN (2003) Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting *fluorescent Pseudomonas* strain GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol Res* 158:77–81
- 104) Sivasakthi, S., Usharani G., & Saranraj P. (2014). Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)- *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*. 9(16); 1265 -1277.
- 105) Soriano, B.; González, A. (2012) Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* sobre el crecimiento vegetal de paprika, *Capsicum annuum* var. Longum, y lechuga, *Lactuca sativa*. *REBIOL* 32: 31-103.
- 106) Taiz L, Zeiger E (2002) *Fisiología Vegetal* (volumen 2) Synauer Associates Inc Barcelona.

- 107) Tei, F., P. Benincasa, & M. Guiducci. (2003) Critical nitrogen concentration in lettuce. *Acta Horticulturae* 627:187-194.
- 108) Tenorio-Salgado, S., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt R., Caballero-Mellado J., Pérez-Rueda. (2013) Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered* 4: 236-468.
- 109) Tian, F., Dian, Y., Zhu, H., Yao, L., Du, B., (2009) Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* 40, 276-284 Tlahque-Guitierrez, J., (2011) Producción e hidroponías de Lechuga con y sin recirculación de solución nutritiva. Universidad Autónoma de Chapingo.
- 110) Trivedi, P., He, Z., Van Nostrand, J. D., Albrigo, G., Zhou, J., and Wang, N. (2012) 930 Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities 931 associated with citrus rhizosphere. *ISME J* 6:363-383.
- 111) USDA. (2006). PLANTS Profile. [En línea] Disponible en: [http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=lactuca+sativa&mode=scina me&submit.x=0&submit.y=0](http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=lactuca+sativa&mode=scina%20me&submit.x=0&submit.y=0). (Revisado 1 de marzo del 2013). Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moëne-Loccoz. (2013) Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci.* 4:356. Van Loon, LC, Bakker, PAHM & Pieterse, CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 36:453-83.
- 112) Valadez A. (1997). Producción de hortalizas. México, Noriega Editores, 298 pp.
- 113) Vessey, J.K.(2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255, 571–586. ,
- 114) Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I. & Katinakis, P. (2011). The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microb Ecol*, 61 (2), 277-285.
- 115) Villa-Castro, L. Mayek-Perez, N. García-Olivares, J.G. & Hernandez-Mendoza, J.L. (2014). Efecto de la inoculación en maíz en cepas nativas de *Azospirillum* sp. *Revista de investigación y difusión científica agropecuaria.* 18(1): 33-38.
- 116) Vivienne, N. Matiru, F. D. and Dakora, S. (2004). Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *Afr. J. Biotechnol.* 3(1):1-7.
- 117) Welbaum G, Sturz AV, Dong Z, Nowak J. (2004). Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit Rev Plant Sci.* 23:175–193.
- 118) Whitaker T, Ryder EJ. (1964). La lechuga y su producción. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, Servicio de Investigaciones Agrícolas, Centro Regional de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional, México, 53 pp.

- 119) Wahyudi, A. T., R. P. Astuti, A. Widyawati, A., Meryandini, and A. A. Nawangsih. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *J. Microbiol. Antimicrobials* 3: 34-40.
- 120) Wani, P.A., Khan, M.S., (2010). *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3262–3267.
- 121) Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., & Vander, L. D. (2010) Comparative genomic and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida* *FEMS Microbiol.Rev.* 35,299-323.
- 122) Xin Qi, Xichao Hao, Xiaoming Chen, Shiqi Xiao, Shilin Chen, Xuegang Luo, Shanqiang Wang, Jia Tian, Dan Wang, Yunlai Tang. Integrated phytoremediation system for uranium-contaminated soils by adding a plant growth promoting bacterial mixture and mowing Grass. *Journal of Soils and Sediments.* 19:1799–1808.
- 123) Yanes ML, De La Fuente L, Altier N, Arias A (2012) Characterization of native fluorescent *Pseudomonas* isolates associated with alfalfa roots in Uruguayan agroecosystems. *Biol Control* 63:287–295.
- 124) Yabuuchi E., Yano I., Oyaizu H, Hashimoto Y, Ezaki T., Yamamoto H (1990) Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. Nov. And comb. Nov. *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov. *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov. *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov. *Sphingomonas capsulata* comb.nov. and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol immunol* 34:99-119.
- 125) Young Cheol Kim & Hyunhae Jung Kil Yong Kim & Seur Kee Park (2008) An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora blight* of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions, *Eur J Plant Pathol.*120:373–382.
- 126) Zahid, M., Abbasi, M. K., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). *Frontiers in microbiology*
- 127) Zarrin, F., M. Saleemi, Z. Muhammad, T. Sultan, M. Aslam, R. U. Rehman, and M. F. Chaudhary.( 2009) Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African J. Biotechnol.* 8: 219-225

