



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LECHUGA INOCULADAS CON BACTERIAS AISLADAS DE MELIPÓNIDOS COMBINADAS CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y FERTILIZACIÓN FOSFATADA

ORLANDO CATALÁN BARRERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2021

La presente tesis titulada: **Crecimiento de plantas de lechuga inoculadas con bacterias aisladas de melipónidos combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada**, realizada por el alumno: **Orlando Catalán Barrera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR



Dr. Ronald Ferrera Cerrato

ASESORA



Dra. Dulce Jazmín Hernández Melchor

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2021



La presente tesis: **“Crecimiento de plantas de lechuga inoculadas con bacterias aisladas de melipónidos combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada”**, fue financiada por el proyecto **SEP-CONACYT 257847 “Diversidad de meliponinos, estudio de microorganismos asociados y análisis de las propiedades biológicas de sus productos”**.

CRECIMIENTO DE PLANTAS DE LECHUGA INOCULADAS CON BACTERIAS AISLADAS DE MELIPÓNIDOS COMBINADAS CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES Y FERTILIZACIÓN FOSFATADA

Orlando Catalán Barrera, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Los meliponinos (abejas sin aguijón) promueven el funcionamiento del ecosistema a través de sus interacciones con plantas y microorganismos. El estudio de bacterias asociadas a estas abejas representa un potencial biotecnológico, al conocer y evaluar sus efectos benéficos. Esta investigación evaluó la promoción del crecimiento de plantas de lechuga, en invernadero, al inocular bacterias aisladas de sin aguijón en combinación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y fertilización fosfatada. El primer ensayo evaluó el efecto de 11 bacterias aisladas de abejas sin aguijón, inoculadas en hoja o en raíz de lechuga, y analizando índice de verdor (Unidades SPAD), eficiencia fotosintética del fotosistema II, área foliar, área foliar específica, y peso seco (aéreo, radical y total). La inoculación de bacterias (en hojas o en raíz), produjo beneficios en todas las variables, representando una forma efectiva de uso como inoculantes, destacando las bacterias *Pantoea anthophila* (T38) y *Serratia nematodiphila* (15). El segundo ensayo inoculó las dos bacterias destacadas, en combinación con HMA (*Claroideoglossum claroideum* y *Funneliformis mosseae*), y con tres dosis de fertilización fosfatada (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$) en lechuga, y evaluando peso fresco, área foliar, área foliar específica, peso seco (aéreo, radical y total), colonización micorrízica, supervivencia bacteriana inoculada en hoja, y número de estomas. Los resultados mostraron diferencias significativas en las plantas inoculadas con las bacterias en comparación con los controles, destacando el peso seco y el área foliar. La inoculación con HMA no mostró diferencias significativas en comparación con su combinación con bacterias. La aplicación de las dosis 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, mostró mayores resultados al combinarse con las dos bacterias. Las bacterias aisladas de meliponinos presentan propiedades fisiológicas que benefician a las plantas; por lo que su uso como bacterias promotoras de crecimiento vegetal es factible para producir plantas de lechuga en almácigos, en combinación con HMA, y con dosis bajas o medias de fertilización fosfatada.

Palabras clave: meliponas, abejas sin aguijón, *Pantoea anthophila*, *Serratia nematodiphila*, inoculación foliar, micorriza arbuscular, fósforo.

GROWTH OF LETTUCE PLANTS INOCULATED WITH BACTERIA ISOLATED FROM MELIPONIDS IN COMBINATION WITH ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND PHOSPHATE FERTILIZATION

Orlando Catalán Barrera, M.Sc.

Colegio de Postgraduados, 2021

ABSTRACT

Meliponidas (stingless bees) promote the functioning of ecosystems through their interactions with plants and microorganisms. The study of bacteria associated to these bees represents a biotechnological potential, by knowing and evaluating their potential benefits. This research evaluated the growth promotion of lettuce plants, under greenhouse, by inoculating bacteria isolated from meliponids in combination with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and phosphate fertilization. The first assay evaluated the effect of 11 bacteria isolated from stingless bees, inoculated on leaves or roots, and analyzing greenness index (SPAD Units), photosynthetic efficiency of photosystem II, leaf area, specific leaf area, and dry weight (aerial, radical and total). Bacterial inoculation (in leaves or roots) benefited all variables, representing an effective form of using them as inoculants, highlighting the bacteria *Pantoea anthophila* (T38) and *Serratia nematodiphila* (15). The second assay inoculated the two prominent bacteria, in combination with AMF (*Claroideoglossum claroideum* and *Funneliformis mosseae*), and with three doses of phosphate fertilization (11, 22 and 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$) in lettuce, and evaluating fresh weight, leaf area, specific leaf area, dry weight (aerial, root and total), mycorrhizal colonization, bacterial survival inoculated on the leaf, and number of stomata. The results showed significant differences in the plants inoculated with the bacteria compared to the controls, highlighting the dry weight and the foliar area. Inoculation with AMF did not show significant differences when compared to its combination with bacteria. The application of 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, showed greater results by combining the two bacteria. Bacteria isolated from meliponids have physiological properties that benefit plants; therefore, its use as plant growth promoting bacteria is feasible for producing lettuce plants in seedbeds, in combination with AMF, and with low or medium doses of phosphate fertilization.

Key words: meliponids, stingless bees, *Pantoea anthophila*, *Serratia nematodiphila*, foliar inoculation, arbuscular mycorrhiza, phosphorus.

DEDICATORIA

Principalmente esta tesis está dedicada a Dios por ser parte fundamental y más importante que una persona pueda tener.

Con todo el amor y cariño dedico este trabajo a mi madre, por ser la persona más importante en mi vida, por todo el apoyo, consejos y amor que me ayuda todos los días a ser siempre una mejor persona.

A mis hermanos, por todos los consejos y apoyo que me dan y me ayudan a seguir adelante en cada decisión que debo tomar.

A todos mis sobrinos, que siempre me llenan de alegría y amor, porque son parte importante en mi vida que me ayuda e inspira a seguir superándome.

A los doctores Ronald Ferrera y Alejandro Alarcón, por brindar siempre toda su confianza en mí, por todo el apoyo y consejos que me han ayudado a crecer personalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a todas las personas que de forma directa e indirecta me apoyaron en mi formación profesional, especialmente a:

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mis estudios e investigación de maestría.

Al Área de Microbiología de suelos, por permitirme realizar mi investigación en las instalaciones y con todo el material necesario para poder realizar mi tesis.

Al Dr. Alejandro Alarcón por ayudarme y guiarme en la realización de mi trabajo de maestría, por todo el conocimiento y apoyo que me brindó y la confianza en los diferentes trabajos que me dieron la oportunidad de participar.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por apoyarme incondicionalmente siempre, guiarme en mi investigación y ayudarme a crecer profesional y personalmente con los diferentes trabajos y participaciones que me confiaron durante mi maestría.

A la Dra. Dulce Jazmín, parte de mi comité, que siempre estuvo dispuesta a ayudarme y guiarme en la realización de mi tesis de maestría.

A todos mis amigos, que gracias a ellos el trabajo siempre fue más llevadero, gracias a sus conocimientos, apoyo en laboratorio y todas las bonitas experiencias que siempre me hará recordarlos.

A mi madre y a toda mi familia que siempre están ahí para apoyarme, y a pesar de la distancia se que siempre cuento con todos ellos.

Al CONACYT por el apoyo en financiamiento económico para la realización de esta investigación de maestría.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. HIPÓTESIS	5
4.1 Hipótesis general.....	5
4.2 Hipótesis específicos	5
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
5.1 Bacterias	6
5.2 Relación planta-microorganismo	6
5.3 Filos bacterianos asociados a insectos.....	9
5.4 Importancia de la interacción insectos-microorganismos	9
5.5 Importancia de la estructura intestinal de los insectos en las poblaciones bacterianas	12
5.6 Principales funciones de las bacterias intestinales de insectos	14
5.7 Bacterias asociadas a melipóninos	16
5.8 Mecanismos especializados de bacterias intestinales	17
5.9 Efectos de la simbiosis insecto-microorganismo en la agricultura.....	18
5.10 Diferencias entre meliponinos y <i>Apis mellifera</i>	19
5.11 Diferencias de la miel de meliponinos y <i>Apis mellifera</i>	22
5.12 Lechuga.....	23
5.12.1 Metabolitos secundarios importantes de la lechuga	24
5.13 Aplicaciones de microorganismos benéficos en el cultivo de lechuga.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27

6.1 Experimento 1. Evaluación y selección de cepas bacterianas aisladas de meliponidos e inoculadas en plantas de lechuga	27
6.1.1 Germinación de las semillas.....	27
6.1.2 Preparación del inóculo bacteriano	29
6.1.3 Inoculación de plántulas en invernadero.....	30
6.1.4 Variables evaluadas.....	31
6.2 Experimento 2. Efecto de cepas bacterianas seleccionadas aisladas de meliponidos, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y tres dosis de fertilización con fósforo, en plantas de lechuga.	32
6.2.1 Germinación de las semillas e inoculación del consorcio micorrízico arbuscular	33
6.2.3 Preparación del inóculo micorrízico arbuscular	34
6.2.4 Preparación del inóculo bacteriano	35
6.2.5 Inoculación de las plantas con las cepas bacterianas	35
7.1 Experimento 1. Evaluación y selección de cepas bacterianas aisladas de meliponidos e inoculadas en plantas de lechuga.	38
7.2 Experimento 2. Efecto de cepas bacterianas seleccionadas y aisladas de meliponidos, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y con tres dosis de fertilización con fósforo, en plantas de lechuga.	47
10. LITERATURA CITADA	74
APÉNDICE	107

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microscopia de bacterias intestinales de abeja.	10
Figura 2. Morfología general del intestino de insectos y sus modificaciones.	13
Figura 3. Abejas obreras con polen recolectado..	17
Figura 4. Abejas melíferas obreras:	20
Figura 5. Diferencias entre individuos de abejas melíferas:	21
Figura 6. Abeja melipona cuidando la entrada del nido.....	21
Figura 7. Valores de fluorescencia Fv/Fm de plantas de lechuga.....	39
Figura 8. Valores de índice de verdor (Unidades SPAD) de plantas de lechuga	40
Figura 9. Valores de Peso seco aéreo de plantas de lechuga.	41
Figura 10. Valores de Peso seco radical de plantas de lechuga.	43
Figura 11. Valores de Peso seco total de plantas de lechuga	44
Figura 12. Valores de Área foliar de plantas de lechuga.	45
Figura 13. Valores de Área foliar específica de plantas de lechuga.	46
Figura 14. Valores de Índice de verdor (SPAD) de plantas de lechuga.....	52
Figura 15. Valores de Peso fresco de plantas de lechuga	53
Figura 16. Valores de peso seco de hoja de plantas de lechuga.....	55
Figura 17. Valores de Peso seco de raíz de plantas de lechuga	56
Figura 18. Valores de Peso seco total de plantas de lechuga	58
Figura 19. Valores de Área foliar de plantas de lechuga	59
Figura 20. Valores de Área foliar específica de plantas de lechuga	61
Figura 21. Valores de Número de estomas de plantas de lechuga	62
Figura 22. Valores de Colonización micorrízica de plantas de lechuga	64

Figura 23. Plantas del experimento 1. Inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón. 110

Figura 24. Plantas de lechuga del experimento 2. Inoculadas con bacterias seleccionadas aisladas de abejas sin aguijón, HMA y tres dosis de fertilización fosfatada. 111

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Grupos microbianos de insectos y su potencial benéfico.....	11
Cuadro 2. Grupos bacterianos asociados a insectos de acuerdo con su tipo de alimentación Homgoh (2010).	15
Cuadro 3. Especies bacterianas aisladas de abejas sin aguijón.....	28
Cuadro 4. Propiedades bioquímicas de especies bacterianas aisladas de abejas sin aguijón.	29
Cuadro 5. Efecto de la inoculación bacteriana como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga	48
Cuadro 6. Efecto de la aplicación de tres dosis de fertilización fosfatada como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga.....	48
Cuadro 7. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga, de.....	49
Cuadro 8. Resultados de la evaluación de la supervivencia bacteriana de plantas inoculadas en hoja.....	50

1. INTRODUCCIÓN

Las abejas sin aguijón (ASA) (meliponinos), son insectos eusociales que viven en colonias en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo (Aguilera Peralta y Ferrufino, 2004), y son uno de los pocos grupos de América con comportamientos sociales y colonias perennes que se reproducen por enjambres (Nates, 2005). Las abejas sin aguijón se agrupan en la familia Apidae y la tribu meliponini, se estiman 33 géneros con aproximadamente 400 especies para el Neotrópico, distribuidas desde México hasta Argentina y algunas islas del Caribe, de los cero hasta los 4000 msnm (Yurrita *et al.*, 2017).

La importancia ecológica, cultural y económica de estas abejas, deriva por sus hábitos polinizadores y por su miel. Algunos antecedentes históricos denotan la importancia de estos insectos y su uso por civilizaciones antiguas; por ejemplo, los Mayas consideraban a las abejas sin aguijón como parte de su riqueza natural y cultural, desde el punto de vista económico, por las propiedades medicinales de la miel y del polen (Ayala *et al.*, 2013). Además del uso de materiales primarios derivados de las abejas, el cerumen era utilizado para fabricar utensilios o piezas ornamentales como forma de representación de diversos pensamientos simbólicos y cósmicos. Los métodos de identificación tradicional de estos insectos, se basan en sus características morfológicas, comportamiento, aspectos sensoriales, y por su funcionalidad o utilidad (Zamudio y Hilgert, 2012). El estudio de este grupo de abejas, al igual que aquellas de la especie *Apis mellífera*, se fundamenta en la calidad de su miel, ya que cuenta con propiedades nutricionales de alta calidad, alta capacidad antioxidante y rica en diferentes elementos, lo cual le brinda importancia en el área medicinal (Cauich *et al.*, 2015). En específico, la miel de las abejas sin aguijón puede presentar mejores propiedades en comparación con la producida por *A. mellífera*, a pesar de que estas últimas presentan mayor área de exploración y diversidad florística para el pecoreo (Álvarez *et al.*, 2018).

En la naturaleza existen relaciones complejas entre varios grupos de organismos. Ejemplo de esto, es la interacción entre insectos y microorganismos benéficos, que se establece mediante una relación mutualista de suma importancia en la cual los insectos benefician a las bacterias al brindar las condiciones adecuadas para su crecimiento y sobrevivencia en su interior o exterior; por su parte, las bacterias ayudan a los insectos en aspectos nutricionales, o como reguladores de la fisiología y desarrollo, e incluso la protección contra patógenos (Zheng *et al.*, 2018; Arias, 2019; Khan *et al.*, 2020). Lo anterior, promueve mayor posibilidad de que los insectos puedan adaptarse a nuevos ambientes.

Por su parte, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses de más del 85% de plantas terrestres (Pinto *et al.*, 2017). Debido a sus múltiples beneficios como potenciadores del crecimiento vegetal, los HMA son una alternativa factible para mejorar la producción vegetal gracias a los diversos beneficios relacionados con la translocación de nutrientes, protección contra patógenos, resistencia a sequías y otras condiciones de estrés (Llonin *et al.*, 2002; Carreón *et al.*, 2014; García *et al.*, 2016), y por la actividad metabólica que se promueve en la planta por estos microorganismos (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2001).

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una planta de gran extensión de terreno cultivable, resistente a diferentes temperaturas que van desde los -12°C a 35°C, siendo los 18°C la temperatura óptima para su crecimiento, aunque las altas temperaturas suelen tener efectos negativos en la germinación de las semillas (Lamichhane *et al.*, 2018). Este cultivo es uno de los vegetales más consumido y que se produce de forma intensiva en todo el mundo, la parte consumible es la hoja, por lo que su producción se realiza hasta la etapa vegetativa; por lo anterior, es comercializado con un valor económico importante en el mercado (Monroy *et al.*, 2017). Esta planta cuenta con propiedades nutrimentales importantes de los que destacan

calorías, fenoles, vitaminas, minerales, etc., y es considerada como una parte fundamental en la dieta humana debido a los diferentes beneficios que ofrece (Chu *et al.*, 2002).

Algunas investigaciones han probado la eficacia de la utilización de microorganismos benéficos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) y HMA para promover el crecimiento de plantas de lechuga con resultados notables en su combinación (Chávez *et al.*, 2017; Cerna *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2019). Más aun, existe limitada información sobre el uso de bacterias aisladas de insectos, y en particular abejas sin aguijón (ASA), en combinación con HMA, aplicadas a la producción de plantas de lechuga. Por lo anterior, esta investigación evaluó la promoción del crecimiento de plantas de lechuga, en invernadero, al inocular bacterias aisladas de meliponinos en combinación con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y fertilización fosfatada.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ASA son un componente importante en los ecosistemas, como uno de los principales polinizadores de flores a demás de que promueven el buen funcionamiento del sistema a través de sus interacciones. Las ASA son de gran importancia debido a la miel que producen, y su utilización data desde la antigüedad en donde los nativos la utilizaban con diferentes fines. El estudio morfológico e intestinal de la composición bacteriana en las ASA, representa un potencial biotecnológico y aplicable que podría ayudar a conocer mejor el funcionamiento y composición de la miel de estos insectos.

Las bacterias aisladas de abejas melíferas poseen propiedades bioquímicas importantes que benefician la salud de las abejas, derivado de su actividad metabólica (enzimática) en el interior de las abejas, por lo cual se beneficia directamente su salud (Nwese *et al.*, 2017). Los metabolitos derivados de los microorganismos del intestino de las abejas, ayudan al

procesamiento del polen para transformarlo en miel; y estos microorganismos poseen propiedades enzimáticas que benefician la calidad y cuidado de la miel (Khan *et al.*, 2020), y con la actividad antagónica contra microorganismos entomopatógenos, por lo cual se mantiene en buen estado toda la colmena y la miel que proviene de estas abejas (Al-Ghamdi, *et al.*, 2020; Barth *et al.*, 2020).

Existen grupos de bacterias y hongos que a través de sus procesos metabólicos pueden beneficiar considerablemente tanto el suelo como a las plantas mismas (Terrestre *et al.*, 2017). Así, la implementación de microorganismos benéficos para las plantas en los sistemas agrícolas, es una alternativa factible que puede beneficiar el crecimiento de plantas de lechuga, al mitigar el uso desmedido de químicos en el suelo (Gastón *et al.*, 2017), combatir diferentes enfermedades, y aumentar la eficiencia de las plantas para resistir a diferentes factores de estrés (Noguez *et al.*, 2017).

Las bacterias aisladas de abejas sin aguijón cuentan con propiedades bioquímicas relevantes para considerarse como una alternativa biotecnológica para la agricultura, y para su uso como biofertilizantes junto a otros microorganismos como los hongos micorrízicos arbusculares (Harikumar, 2017), así como para validar su efectividad en combinación con manejo de fertilización química a base de fósforo, con la finalidad de mejorar la producción de diferentes cultivos (Battini *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la promoción del crecimiento de plantas de lechuga en condiciones de invernadero, mediante la inoculación de bacterias aisladas de abejas sin aguijón en combinación con hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada.

3.2 Objetivos específicos

1. Seleccionar bacterias aisladas de abejas sin aguijón con capacidad de promover el crecimiento de plantas de lechuga en almácigos bajo condiciones de invernadero.
2. Evaluar el efecto de bacterias aisladas de abejas sin aguijón inoculadas en hojas o en raíz, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada, en la promoción del crecimiento de plantas de lechuga en almácigos, en invernadero.

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis general

La inoculación de bacterias aisladas de abejas sin aguijón en combinación con hongos micorrízicos arbusculares y fertilización fosfatada mejorarán el crecimiento de plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

4.2 Hipótesis específicos

1. Las bacterias aisladas de abejas sin aguijón que sean seleccionadas promoverán el crecimiento de plantas de lechuga en almácigos bajo condiciones de invernadero.
2. Las bacterias aisladas de abejas sin aguijón inoculadas en hoja o en raíz, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y con la aplicación de fertilización fosfatada, promoverán el crecimiento de plantas de lechuga en almácigos, en invernadero.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Bacterias

Las bacterias son un grupo de microorganismos megadiverso en el planeta, cumplen con funciones importantes en la naturaleza como el reciclaje de nutrientes, en los ciclos biogeoquímicos, etc.; además, tienen la capacidad de adaptarse en diversas condiciones y hábitats en todo el planeta (Corrales *et al.*, 2015). Debido a la importancia que tienen algunas de estas funciones elementales para las plantas, algunas bacterias son consideradas como promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), ya que influyen en la sanidad vegetal y brindando condiciones adecuadas desde el suelo, para contribuir en la mejora de la nutrición vegetal (Olanrewaju *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2017).

Por lo anterior, diversos estudios han reportado la eficacia biotecnológica de algunas bacterias, y su consecuente uso en la agricultura como biofertilizantes (Ángeles y Cruz, 2015; Gracia *et al.*, 2015; Hidalgo *et al.*, 2016; Terrestre *et al.*, 2017), aprovechando sus múltiples beneficios para promover el crecimiento vegetal y la fertilidad del suelo (Gastón *et al.*, 2017). Las bacterias también aportan otros beneficios para las plantas al liberar metabolitos que controlan patógenos, tolerar condiciones de sequía, salinidad, toxicidad, etc. (Noguez *et al.*, 2017), y en la fitorremediación de suelos contaminados (Perea *et al.*, 2017).

5.2 Relación planta-microorganismo

El crecimiento de las plantas beneficia el crecimiento de los microorganismos del suelo, las plantas tienen la capacidad de liberar compuestos a nivel molecular que permiten la proliferación de los microorganismos en las raíces y en sus áreas circundantes, y estos patrones son conocidos como mecanismos de señalización planta-microorganismo (Zhang *et al.*, 2016).

De igual forma, los microorganismos pueden presentar mecanismos de señalización que son reconocidos o no, por las plantas, y pueden influir en la comunidad microbiana. Algunos estudios señalan que estos patrones de reconocimiento pueden estimular o controlar la inducción de la defensa vegetal hacia patógenos, enfermedades y otros factores abióticos (Pieterse *et al.*, 2014).

Por su parte, las plantas tienen sistemas de defensa que pueden presentarse de forma local en la raíz, conocido como proceso de “cebado” el cual ocurre cuando la planta prepara la comunicación cuando al detectar la presencia microbiana tanto en raíz como en hojas para responder de forma eficaz en caso de ser algún patógeno (Selosse *et al.*, 2014). En este proceso, se pueden producir hormonas vegetales de señalización como el ácido jasmónico, etileno, entre otros; que inducen la resistencia a enfermedades en la planta a través del proceso llamado resistencia sistémica inducida (RSI). Esta RSI contrariamente a la presencia de fitopatógenos o insectos, es contrarrestada por BPCV y hongos simbióticos por lo que se pueden establecer en los órganos y tejidos vegetales (Conrath, 2011; Jung *et al.*, 2012). Por su parte, la resistencia sistémica adquirida (RSA) es generada por fitohormonas como el ácido salicílico y el ácido jasmónico reguladoras del crecimiento vegetal, y son generadas por las plantas después de haber presenciado daño en su estructura causado por microorganismos o insectos. Esta respuesta de defensa puede durar desde varios días o semanas y mantiene a las plantas activas contra la presencia de uno o varios patógenos (Laredo *et al.*, 2017; Trinidad *et al.*, 2019).

Las plantas pueden secretar moléculas específicas que suelen presentarse cuando se genera la interacción entre microorganismos ya sea de vida libre o simbiótica, como los rizobios o los HMA (Rivero *et al.*, 2015; Tugizimana *et al.*, 2018). Debido a que naturalmente no son reconocidos como propios del sistema vegetal, se presenta un mecanismo de señalización

conservada denominado como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs) (Bonfante y Genre, 2015; Tsuzuki *et al.*, 2016). En ambos casos, estos grupos microbianos representan relaciones simbióticas mutualistas, y son definidas a través del intercambio molecular de biomoléculas que permiten el establecimiento de forma más rápida y eficaz en la superficie de la raíz; estas biomoléculas son conocidas generalmente como factores Nod para los rizobios, y factores Myc para los HMA (Ruyter, *et al.*, 2013). Los factores Nod como Myc son moléculas modelo sobre el tipo de relación inter-comunicativa encargados de suprimir de forma directa las respuestas de defensa del ácido salicílico, dando origen a la comunicación simbiótica (Oldroyd, 2013).

La liberación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) es otro mecanismo de señalización que realizan las plantas; estos compuestos pueden ser liberados desde la parte aérea hacia las raíces o viceversa, siendo los más comunes los terpenoides, fenilpropanoides y compuestos derivados de ácidos grasos y aminoácidos (Vivaldo *et al.*, 2017; Cantúa *et al.*, 2019).

Las bacterias también pueden liberar diferentes COV's de los que resaltan los terpenos, pirazinas, compuestos azufrados entre otros, (Tyc *et al.*, 2017) los cuales atraviesan de forma directa las membranas; en las hojas sirven para protegerlas contra herbívoros, y en la raíz funcionan como repelentes o atrayentes de microbios específicos; un ejemplo, es la liberación de β -cariofileno para atraer al nematodo entomopatógeno que parasita larvas de gusanos (Delory *et al.*, 2016). Las auxinas, giberelinas y citoquininas son biomoléculas producidas por microorganismos que afectan el crecimiento y desarrollo de tejido, las respuestas "inmunes", y la señalización hormonal dentro de la planta (Duca *et al.*, 2014).

5.3 Filos bacterianos asociados a insectos

Los principales filos bacterianos encontrados en intestinos de insectos son Verrucomicrobia, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, Firmicutes, Gamma, proteobacteria, actinomicetos y algunos géneros como *Lactobacillus* sp, *Bacillus* sp, *Clostridium* sp, actinobacterias, entre otros (Colman *et al.*, 2012). Algunos grupos de insectos presentan relaciones específicas y reconocidas con algunos géneros bacterianos como *Snodgrassella* sp., *Gilliamella* sp. y *Wolbachia* sp., con grupos de insectos como termitas, abejas, y abejorros (Hongoh, 2010; Martinson *et al.*, 2011; Koch *et al.*, 2013; Syed *et al.*, 2018; Elzeini *et al.*, 2020; Mohammad *et al.*, 2020).

Existen diferentes formas de colonización de las bacterias en el cuerpo de insecto, destacando la vía oral (la más frecuente), por la comida, consumo de heces, directamente de los huevos, transmisión vertical de madre a hijos, etc. (Martinson *et al.*, 2012). Algunas investigaciones han encontrado ADN bacteriano del género *Bacillus* sp., en fósiles de meliponas de la especie *Proplebeia dominicana*, lo cual demuestra la interacción entre ambos grupos desde la antigüedad, y las posibles relaciones que se pueden suponer para su supervivencia. Por su parte, algunas especies del género *Streptomyces* sp. se han encontrado en las celdas de crías y otros materiales del nido de abejas sin aguijón, y estas especies han presentado potencial biotecnológico debido a su capacidad inhibitoria contra patógenos, como por ejemplo, su capacidad inhibitoria contra el entomopatógeno *Paenibacillus larvae* (Menezes *et al.*, 2013; Al-Ghamdi, *et al.*, 2020; Barth *et al.*, 2020).

5.4 Importancia de la interacción insectos-microorganismos

En el ecosistema se establecen relaciones de importancia entre microorganismos e insectos; estos últimos, brindan las condiciones adecuadas para el crecimiento y supervivencia

microbiana que a su vez, ayudan a los insectos mediante aspectos nutricionales, reguladores de la fisiología y desarrollo, e incluso protección contra patógenos, lo cual favorece la capacidad de adaptación de los insectos a diferentes hábitats (Arias, 2019). Este tipo de relaciones ayuda a entender la forma en que se realizan diversos procesos en la naturaleza y que, mediante la combinación de factores entre ambos grupos, pueden suceder procesos fisiológicos complejos que benefician complementariamente a los organismos en los ecosistemas; ejemplo de ello, son las abejas melíferas y sus bacterias asociadas (Raymann y Moran, 2018).

Por lo anterior, algunas investigaciones han estudiado el comportamiento de poblaciones microbianas con relación al tipo de insecto y el área donde se encuentran. Ejemplo de esto son las abundantes cantidades de bacterias y levaduras encontradas en el tracto digestivo de escarabajos y abejas melíferas en comparación con otra parte del cuerpo de algunos insectos (Figura 1) (Boekhout *et al.*, 2005; Elzeini *et al.*, 2020). Lo anterior denota que el microbioma intestinal de los insectos está relacionado con el beneficio en la digestión metabólica de compuestos derivados de las plantas (Khiyami y Alyamani, 2008).

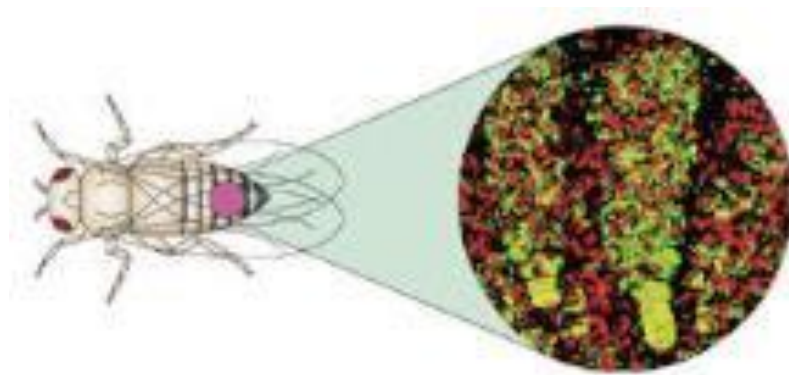


Figura 1. Microscopia de bacterias intestinales de abeja (Baldo y Clarck, 2008).

Los insectos presentan relaciones tanto positivas como negativas con otros organismos, su estado de crecimiento puede ser afectado rápidamente por parásitos o enfermedades que pueden afectar a pocos individuos o a toda la colmena (Cuadro 1). Algunas poblaciones de insectos pueden ser afectadas drásticamente en ciertas etapas del año, causando daños irreversibles por condiciones adecuadas (por ejemplo, temporada de lluvias) para la proliferación de microorganismos (hongos) entomopatógenos (Zuñiga, 2017).

Cuadro 1. Grupos microbianos de insectos y su potencial benéfico.

Insecto	Microorganismo	Potencial	Referencia
Termitas	Bacterias	Celulolíticas, promueven la degradación de celulosa en insectos madereros.	Mantilla y Pineda (2013); Bozzetta <i>et al.</i> (2018).
Coleópteros	Levaduras	Antagonismo	Salazar <i>et al.</i> (2016)
Pulgones	<i>Buchnera</i>	Aporte de aminoácidos	Arias (2019)
Moscas	<i>Wolbachia pipientis</i>	Protección contra virus, efecto en la reproducción	Sanda (2016)
Chinches	<i>Shikawaella capsulata</i>	Resguardo nutricional en dietas estrictas	Fukatsu y Hosokawa (2002)
Luciérnagas	Actinobacterias, Firmicutes	Aumento en la eficiencia de nutrición	Salem <i>et al.</i> (2012)
Escarabajos	Bacterias	Nutrición de larvas post eclosión	Kolsch y Pedersen (2010)
Escarabajos y termitas	Arqueas	Aumento en la digestión de alimentos	Engel y Moran (2013)
Mariposas, polillas	<i>Wolbachia</i> sp.	Modifica las hormonas de señalización en las mandíbulas	Sugio <i>et al.</i> (2014)
Escarabajo	<i>Pseudomonas</i>	Segrega proteínas que modifican respuesta de defensa de la planta	Wielkopolan (2016)
Gusano cogollero	<i>Pantoea ananatis</i> , <i>Serratia</i> spp, <i>Rahnella</i> spp.	Segregan proteínas que modifican respuesta de defensa de la planta	Priya <i>et al.</i> (2012); Acevedo <i>et al.</i> (2017); Wang <i>et al.</i> (2018).

5.5 Importancia de la estructura intestinal de los insectos en las poblaciones

bacterianas

El tracto intestinal de los insectos está formado de estructuras centrales divididas en tres partes: intestino anterior, medio y posterior; el anterior y posterior tienen origen en el ecotodermo embrionario y están cubiertos por una capa quitilaginosa. El intestino medio tiene origen distinto, de células endodérmicas y carece de recubrimiento exoesquelético, y es el principal lugar donde se lleva a cabo la digestión y absorción de alimentos en la mayoría de los insectos; la forma estructural de los intestinos varía según la especie, debido a las altas modificaciones sufridas en su evolución (Figura 2) (Chapman *et al.*, 2013).

En el intestino medio solo se encuentra del 1 al 4% de la población total de bacterias intestinales, en donde se realiza la digestión y la absorción nutrimental hacia la hemolinfa, y donde se suelen realizar afectaciones importantes por los patógenos más eficaces (Dussaubat *et al.*, 2012).

Las bacterias intestinales dentro del organismo, varían según el tamaño, la composición, ubicación y funciones del mismo. Las cantidades de bacterias de insectos adultos como una abeja, *Rhodnius*, saltamontes, y una mosca, varían de 10^7 a 10^9 células bacterianas; En los insectos que se alimentan de savia de árboles, su cantidad bacteriana es baja o nula, por el contrario, la mayor cantidad de bacterias se encuentran en insectos detritívoros y madereros en los que se incluyen grillos, termitas y cucarachas (Ryu *et al.*, 2010; Colman *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2012).

Existen mecanismos de selección bacteriana por parte de los insectos a través de reguladores específicos que controlan el nicho bacteriano benéfico en el intestino y ayuda a depurar a los posibles patógenos que se adquieren del ambiente por la alimentación del insecto (Wier *et al.*, 2010; Nyholm y Graf, 2012).

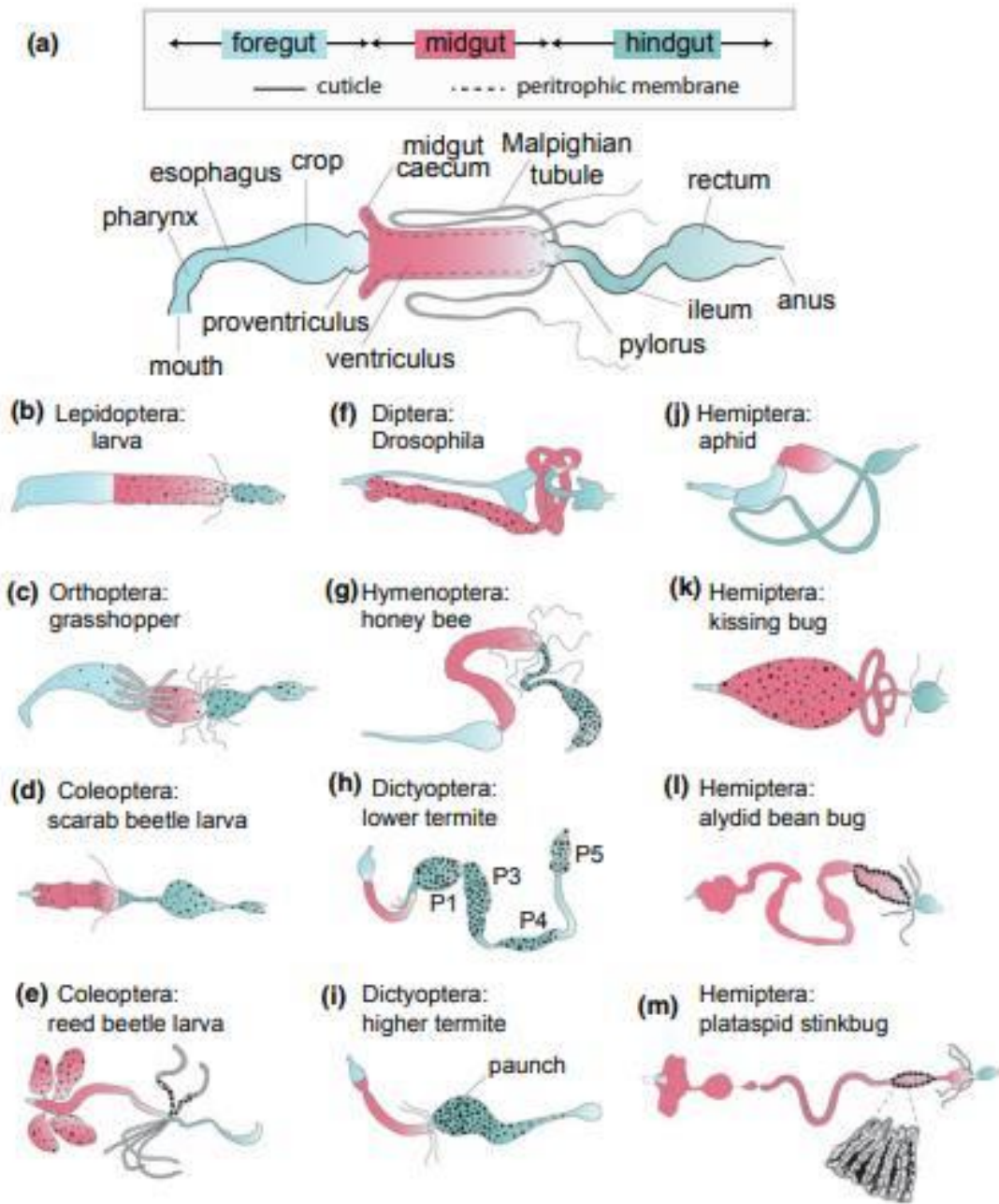


Figura 2. Morfología general del intestino de insectos y sus modificaciones: a) Morfología general, b) Larva de lepidoptera, c) Orthoptera, d) Larva coleóptera, e) Larva de escarabajo rojo, f) Diptera, g) Hymenoptera, h) Dictyoptera termita, i) Termita superior, j) Hemiptera áfido, k) Hemiptera insecto chupador, l) Dictyoptera superior, Termita, m) Hemiptera chinche (Engel y Moran, 2013).

5.6 Principales funciones de las bacterias intestinales de insectos

La microbiota intestinal de los insectos desempeña funciones importantes en distintos procesos que lo ayudan a su crecimiento y su adaptación ambiental; se estima que el número de bacterias intestinales es diez veces mayor al número total de células del mismo insecto (Krishnan *et al.*, 2014; Oliver y Martínez, 2014). Existen diferentes comportamientos con respecto a las poblaciones bacterianas en los intestinos, pueden ser mutualistas, parásitas e incluso, pueden existir especies que son simbioses obligados y desempeñar funciones elementales para la vida del insecto (Arias, 2019). La mayor cantidad bacteriana dentro del cuerpo de los insectos, se encuentra en el tracto digestivo, donde pueden sufrir procesos de reemplazo o dispersión por nuevas bacterias recién ingeridas consideradas como "bacterias transitorias", y cambiar en fracciones o completamente la flora intestinal según sean las necesidades o el potencial de éstas para reemplazar y subsistir en el nuevo hábitat del hospedero (Martinson *et al.*, 2012; Engel y Moran, 2013; Shapira, 2016).

La cantidad de bacterias presentes en los insectos es dependiente y afectada por diferentes aspectos como el hospedante, su estado de crecimiento, ambiente, dieta, edad y los diferentes compartimentos intestinales del insecto (Robinson *et al.*, 2010). Por ejemplo, en larvas y trabajadores de abejas, las cantidades de bacterias son mínimas o nulas en algunos casos, a mayor edad de los insectos en el caso de las abejas, los adultos contienen las concentraciones más altas de microorganismos en su cuerpo, al aumentar sus tareas y salidas de la colmena, sus poblaciones aumentan y varían constantemente (Kapheim *et al.*, 2015; Tarpy *et al.*, 2015). Algunas investigaciones confirman la presencia de enzimas presentes en las celdas del panal, las cuales se encargan de filtrar y descontaminar de bacterias presentes en el polen en el proceso de fermentación a miel (Martinson *et al.*, 2012). Dentro del panal, se realiza un proceso selectivo de transmisión bacteriana entre mismos individuos para conservar las

poblaciones microbianas dentro de la colmena para beneficiar y conservar la salud de las abejas (Martinson, 2011).

Algunos beneficios que reciben los insectos de su microbiota intestinal asociada, se relacionan con el apoyo para mejorar las dietas pobres en nutrientes, digestión de alimentos recalcitrantes, y participación en procesos fisiológicos como la comunicación inter- e intra-específica; Los organismos de la misma especie al comunicarse, segregan moléculas volátiles reconocibles entre ellos, dichas moléculas son sintetizadas y secretadas en el tracto intestinal por los microorganismos (Sharon *et al.*, 2010).

Las bacterias intestinales de las abejas ayudan a regular los sistemas de apareamiento y protegen contra parásitos y patógenos a través de la competencia de nutrientes dentro del insecto, o debido a que la concentración bacteriana en los lugares de entrada de los patógenos evita su entrada al interior o bien, por la activación del sistema inmune del insecto antes de comenzar con la infección (Stecher y Hardt, 2011). Esta última propiedad ha sido observada en abejorros, cuyas bacterias los protegen contra la infección de protozoos parásitos (Koch y Schmid, 2011). Los microorganismos intestinales de insectos incluyen protistas, arqueas, bacterias, y hongos, y su presencia depende del tipo de insecto, alimentación y forma de vida (Cuadro 2) (Brune 2010; Hongoh, 2010).

Cuadro 2. Grupos bacterianos asociados a insectos de acuerdo con su tipo de alimentación

Homgoh (2010).

Insecto	Microorganismo	Alimentación
Todos	Arqueas	Madera y detritos, etc.
Todos	Bacterias	Madera, detritos, etc.
Todos	Protistas	Madera
Todos	Hongos	Madera y detritos, etc.

5.7 Bacterias asociadas a melipóninos

Las abejas melíferas cuentan con asociaciones poco conocidas con diversos microorganismos que se encuentran en la superficie e interior de ellos, este tipo de microorganismos asociados, están involucrados en diferentes procesos que intervienen directamente en el sistema inmunológico, y apoyan la absorción de vitaminas y minerales que benefician la salud de las abejas (Engel *et al.*, 2012).

Las abejas sin aguijón cuentan con asociaciones bacterianas intestinales que promueven efectos benéficos en las propiedades bioquímicas de la miel, y en las propiedades antimicrobianas que ésta posee, algunas especies bacterianas como *Bacillus meliponotrophicus*, *Streptomyces* y *Lactobacillus* han sido reportadas en abejas de los géneros *Trigona* y *Melipona* (Morais *et al.*, 2013). Por su parte, algunos grupos microbianos presentan relaciones específicas y estrictas que les permite permanecer dentro de la colmena a pesar de las propiedades antimicrobianas que se encuentran en la miel y en la colmena, lo cual denota la complejidad de este tipo de interacciones entre las abejas y sus bacterias asociadas (Moran *et al.*, 2012).

El comportamiento de los insectos, depende de sus hábitos de alimentación y crecimiento así como de la diversidad de especies vegetales presentes en el ecosistema, debido a que se alimentan del polen de gran variedad de plantas (Figura 3). Por lo anterior, en áreas con mayor riqueza florística, existe también mayor presencia de insectos, por lo que para las abejas melíferas, la presencia de diversidad de flores en su entorno, afecta directamente su crecimiento y su supervivencia (León *et al.*, 2018).



Figura 3. Abejas obreras con polen recolectado. Martínez (2017).

5.8 Mecanismos especializados de bacterias intestinales

Existen mecanismos especializados que los microorganismos intestinales de insectos aprovechan para promover el cuidado de la salud de su hospedero y mejorar las condiciones para su propia sobrevivencia. Ejemplo de esto, es la capacidad de las bacterias para capturar y mantener nutrientes, vitaminas, etc., en áreas específicas del intestino con la finalidad de poder liberarlos cuando las condiciones de alimentación no sean favorables, especialmente en especies de insectos con dietas restringidas a un solo tipo de alimento, como aquellos que se alimentan de la savia (Nikoh *et al.*, 2011).

Ejemplo de los anteriormente mencionado es lo que ocurre con el insecto *Riporus pedertris* del frijol, el cual en una etapa de su crecimiento inicial debe ingerir al simbiote bacteriano (*Burkholderia*), el cual forma colonias en el intestino medio, promoviendo múltiples beneficios como el resguardo de nutrientes en el insecto; aquellos insectos que no adquieren este simbiote tras la formación de criptas intestinales, tienden a presentar crecimiento inadecuado o nulo (Kikuchi *et al.*, 2011).

Por otra parte, los escarabajos pueden transmitir sus simbioses, de la madre a los hijos, y esto ocurre a través de su presencia en la superficie de los huevos, al eclosionar las larvas, ingieren las partículas del huevo integrando a su cuerpo a los simbioses, y con ello, iniciar el ciclo nuevamente; de esta forma las bacterias promueven también, el incremento en la adquisición de nutrientes a las larvas (Kolsch y Pedersen, 2010).

5.9 Efectos de la simbiosis insecto-microorganismo en la agricultura

Las plantas, debido a su estado inmóvil en la naturaleza, han desarrollado sistemas de rápida percepción relacionados con sus mecanismos de defensa (Acevedo *et al.*, 2015) lo cual realizan mediante moléculas que son secretadas por la planta cuando detectan daño en las hojas causados por insectos (Heil y Land, 2014), específicamente en moléculas como la volicitina, pectinasas, polifenol oxidasa, proteínas salivales, etc. contenidas en secreciones de regurgitación o saliva de los insectos (Felton *et al.*, 2014).

Las relaciones que existen entre organismos en un ecosistema no están limitadas a la interacción entre individuos de la misma especie; por lo anterior, las plantas han desarrollado estrategias de resistencia ante la posible infección de patógenos o el posible establecimiento de simbioses benéficos (Devi *et al.*, 2017; Shittu *et al.*, 2019). La relación que existe entre insectos y plantas, es compleja e importante, y más aún cuando se trata de sistemas agrícolas, donde algunos microorganismos son transmitidos de uno a otro, o entre ambos organismos; por ejemplo, los simbioses reconocidos por los insectos, han sido adquiridos de plantas que ellos ingieren, como es el caso de las rickettsias ingeridas por la mosca blanca en plantas de lechuga (Arias, 2019). Esta actividad, promueve la transmisión continua de microorganismos de la filósfera de las plantas al intestino del insecto y viceversa, a través de la saliva o heces

depositadas; algunas investigaciones sugieren que la cantidad microbiana puede ser igual en las hojas como en el intestino de los insectos (Priya *et al.*, 2012).

Algunos insectos pueden activar indirectamente la respuesta de la planta contra patógenos a través de su sistema de defensa, al producir compuestos repelentes y/o metabolitos tóxicos secundarios que derivan del reconocimiento de enzimas secretadas por las glándulas salivales (glucosa oxidasa y lisozima) de los insectos (Hammer y Bowers, 2015). Algunas investigaciones confirman este mecanismo en gusanos recolectados en plantas de tomate y maíz (Acevedo *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Por el contrario, existen mecanismos especializados de algunos insectos que son capaces de suprimir los sistemas de defensa de las plantas a través de la liberación de moléculas especiales como polifenoloxidasas, peroxidasas, ácido jasmónico, y ácido salicílico (Chung *et al.*, 2017; Shikano *et al.*, 2018).

5.10 Diferencias entre meliponinos y *Apis mellifera*

Considerados en la “Tribu” meliponini, los meliponinos son insectos clasificados dentro del grupo de los himenópteros apócrifos de la familia Apidae; cuentan con características peculiares que los distinguen como la ausencia de aguijón, tener cuerpo más ancho y lleno de vellosidades, y un tamaño de entre 2 mm a 2 cm en comparación con las abejas de *A. mellifera* que son generalmente más grandes, cuyo cuerpo tiene menos vellosidades, y presentan aguijón (Martínez *et al.*, 2011). Estos dos grupos de abejas, son considerados como los más sociales y de mayor enfoque para la producción de miel (Genaro y Lóriga, 2018). En ambos grupos, las colonias están constituidas por una reina, cientos de trabajadores (obreras), y los zánganos (López, 2015). Para el género *Apis*, los machos son similares a las obreras tanto en tamaño como en apariencia, y las reinas son diferentes en ambos grupos de abejas (Figura 4) (Michener, 2013).

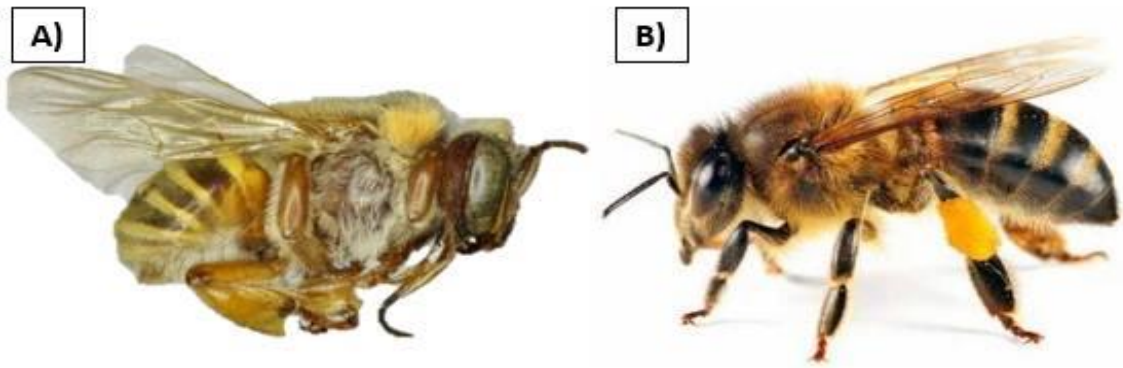


Figura 4. Abejas melíferas obreras: a) *Melipona beecheii*, b) *Apis mellifera*. (Ramírez, 2018).

Las colonias de abejas melíferas están constituidas por varios cientos de individuos, la recolección de comida para toda la colmena solo se realiza por una pequeña proporción de éstas (obreras). Este grupo de abejas son las que están más expuestas a los cambios en los nichos microbianos intestinales, y se cree que estos microorganismos permiten la adaptación evolutiva de las abejas, mediante la comunicación de las obreras al resto de las colmena, a través de moléculas secretadas desde el intestino por las bacterias y liberadas al exterior por la abeja, lo cual permite modificar el comportamiento (producción de más celdas, crías, miel etc.) de todas las abejas para obtener información sobre las condiciones del exterior (Figura 5) (Sánchez y Vandame, 2013).

Los meliponinos debido a la ausencia del aguijón (Euan, 2005), han desarrollado mecanismos de defensa, como poseer mandíbulas más robustas y secretar ácido fórmico (Guzmán *et al.*, 2011). Al no ser abejas agresivas en comparación con abejas europeas, hacen más estrecha la entrada a sus nidos en la cual pueda pasar una sola abeja, y así evitar la invasión de intrusos, o bien, secretan sustancias repelentes para otros insectos; de igual forma, asignan a un grupo de abejas para resguardar la entrada al nido (Figura 6) (Genaro y Loriga, 2018).

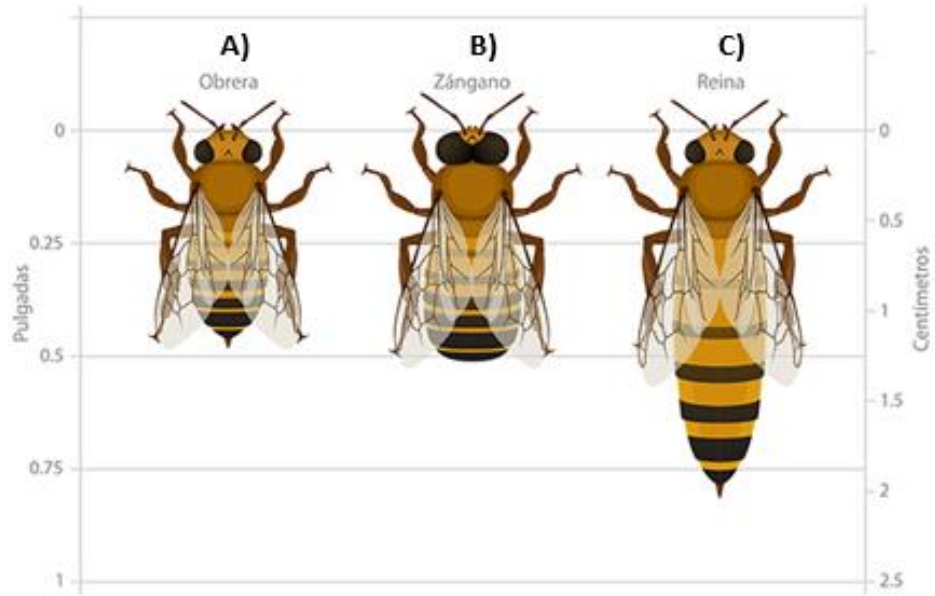


Figura 5. Diferencias entre individuos de abejas mellíferas: a) Obrera, b) Zángano, y c) Reina (ASU, 2018).



Figura 6. Abeja melipona cuidando la entrada del nido. (Baquero y Stamatti, 2007).

5.11 Diferencias de la miel de meliponinos y *Apis mellifera*

La miel es un producto natural consumible de sabor dulce-ácido que es producido por las abejas; la miel es sintetizada a partir del néctar de todo tipo de flores o exudaciones naturales de las plantas. Este producto cuenta con propiedades químicas y azúcares esenciales como glucosa (40%), fructosa (35%), entre otros azúcares simples (sacarosa y maltosa), y contiene minerales como Fe, Mn, Cu, S, P, Na, K, Mg, y Ca, a demás de componentes como proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas, ácidos orgánicos, y pigmentos vegetales derivados del tipo de planta (flores) en las que las abejas realizan el percoreo (Subovsky *et al.*, 2016).

Algunas de las características nutraceuticas más importantes de la miel, es su actividad antioxidante, y su contenido de fenoles, flavonoides, carotenoides, enzimas, proteínas y su capacidad inhibitoria, por lo que cuenta con propiedades nutricionales importantes en la nutrición humana (Kaygusuz *et al.*, 2016; Al-Ghamdi *et al.*, 2019; Taha *et al.*, 2020).

La miel producida por abejas sin aguijón (principalmente abejas Meliponas, Trigonas y Scaptotrigonas), es considerada como un producto de mejor calidad y mayor efecto benéfico potencial en comparación con la miel de *A. mellifera*, de mayor contenido de agua, conductividad eléctrica, proteínas, enzimas, flavonoides, etc. (Nwese *et al.*, 2017). A pesar de que las abejas de *Apis*, visitan y obtienen el polen de una variedad más amplia de plantas en comparación con aquellas que visitan las ASA (aunque concuerdan con algunas plantas), la miel de estas últimas tiene mejores propiedades nutraceuticas. Por lo anterior, el polen colectado por las ASA cuenta con mejor procesamiento enzimático derivado de la actividad microbiana asociada a ellas (Álvarez *et al.*, 2018).

Algunas bacterias presentes en las abejas, en sus nidos y en su miel, pueden desempeñar papeles de gran importancia ya que además de beneficiar la conservación y fermentación del polen, ayudan a las abejas en aspectos nutricionales y de supervivencia. Por lo cual, hacen

falta más investigaciones que se centren en el estudio de la diversidad funcional de las bacterias asociadas y las relaciones moleculares que se mantiene entre ambos grupos (bacteria-abeja) que les permiten coexistir funcionalmente en el ambiente (Morais *et al.* 2013).

A pesar de la importancia ecológica, económica y cultural de estos insectos, se ven afectadas por diferentes problemas como el cambio climático, cambio de uso de suelo, introducción de especies exóticas, falta de programas de gestión de conservación del ambiente (Villanueva *et al.*, 2005; Vamosi *et al.*, 2006), poco manejo profesional en la domesticación de los meliponicultores, lo cual provoca la disminución de competitividad en mercados internacionales por los altos costos de producción; por lo anterior, el conjunto de diversos problemas provoca la pérdida de poblaciones de abejas melíferas (Cauich *et al.*, 2015).

5.12 Lechuga

La lechuga (*Latuca sativa* L.) es considerada como una hortaliza de importancia a nivel mundial China (13 millones de toneladas), Estados Unidos (1.7 millones de toneladas), e India (1 millón de toneladas) son los tres primeros países con mayor producción de esta hortaliza, y México se posiciona en noveno lugar con 406 mil toneladas (FAO, 2020). A nivel nacional, los principales estados productores son Veracruz, Zacatecas y Tamaulipas respectivamente (SIAP, 2020), cuyo consumo se realiza en la etapa vegetativa del cultivo, y la parte comercializable y consumible es la hoja. Esta planta forma parte de una dieta ideal para el ser humano, aporta agua y cantidades adecuadas de calorías, fenoles, vitaminas, ácido fólico, y Fe y K, además de ser baja en grasas, calorías y sodio (Monroy *et al.*, 2017).

A pesar de ser una planta ampliamente consumida, se subestimaban sus propiedades nutraceuticas, y sus beneficios varían según la variedad de lechuga, por lo que es recomendable el consumo variado de este vegetal para aumentar la adquisición nutrimental

completa, aunque las dosis adecuadas de consumo de lechuga varían, y no se tienen valores exactos de sus aportes nutrimentales (Kim *et al.*, 2016).

5.12.1 Metabolitos secundarios importantes de la lechuga

Los metabolitos secundarios son sustancias orgánicas importantes que están presentes en todas las plantas, y no participan en procesos metabólicos fundamentales como la respiración, fotosíntesis, asimilación y transporte nutrimental, pero no todos se encuentran presentes en todas las especies de plantas o familias botánicas, y se producen en pequeñas cantidades (Ávalos y Pérez, 2009).

Este grupo de metabolitos funcionan específicamente con respecto a la necesidad de la planta, algunos pueden atraer microorganismos benéficos o repeler a los posibles patógenos (Robles *et al.*, 2016). Por tal razón, estos metabolitos son importantes en los sistemas de defensa de las plantas, y pueden manifestarse a través de VOC's, colores, y olores en las superficies de las hojas, de forma concentrada. Algunos de estas biomoléculas son estudiadas con importancia médica debido al potencial benéfico que tienen en la salud humana, como son las saponinas, esteroides, alcaloides, etc. (Robles *et al.*, 2016). Ejemplo de algunos de los metabolitos secundarios mas frecuentes en plantas de lechuga son, cido ascórbico, clorogénico, chicórico, cafeoil-meso-tartárico, ácidos fenólicos totales, antocianinas entre otros, son considerados importantes componentes en la salud humana (Mahmoudi *et al.*, 2010; El-Nakhel *et al.*, 2019).

Algunos otros beneficios importantes del consumo de lechuga se relacionan con su alta cantidad de vitaminas, fibras dietéticas, ácidos grasos, ácido fólico, que actúan directamente en problemas cardiacos y en la prevención de la formación o diseminación del cáncer (Chu *et al.*, 2002). Además, esta planta tiene propiedades ansiolíticas, antioxidantes, anticonvulsivas,

analgésicas, antidepresivas, o actividades antiinflamatorias y anticoagulantes (Ismail *et al.*, 2017; Younus *et al.*, 2019).

En el conocimiento cultural de la lechuga, esta planta se consume para tratar problemas como tos seca, insomnio, dolor, artritis reumática y neurosis; así mismo, se usa para impulsar la digestión y el apetito y para el tratamiento de problemas estomacales (Ismail y Mirza, 2015). En todas las variedades de lechuga se encuentra una sustancia llamada "lactucarium" encargada de inducir en el cuerpo cierta relajación y sueño, y también es usado como fármaco para el tratamiento de asma, bronquitis y afecciones hepáticas (Mohammad, 2013).

5.13 Aplicaciones de microorganismos benéficos en el cultivo de lechuga

Los biofertilizantes son alternativas favorables para el cuidado del ambiente y la salud humana, y los microorganismos promotores del crecimiento vegetal tienen la capacidad de beneficiar el crecimiento aéreo y radical de las plantas (Stoll *et al.*, 2018). La inoculación de este grupo de microorganismos en lechuga u otros cultivos hortícolas, ha demostrado sus efectos benéficos en las plantas. Algunas especies microbianas como *Azotobacter* sp. *Azospirillum* sp., y hongos micorrízicos arbusculares, son aplicados directamente a las plantas o combinados con sistemas complementarios de fertilización química, lo cual reduce considerablemente el uso de este último insumo químico al combinarse (Velázquez *et al.*, 2017; Cerna *et al.*, 2018). Por otra parte, estos microorganismos también son combinados con abonos orgánicos, lo cual aumenta de forma sinérgica los resultados obtenidos en la producción orgánica de diferentes cultivos (Chavez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018).

La producción de lechuga se realiza en diversos sistemas de producción; ejemplo de ello, son los sistemas hidropónicos como lo es la película nutritiva, raíz flotante, e incluso el uso de sustratos inertes o sistemas aeropónicos (Lee y Lee, 2015). La combinación de

microorganismos con diferentes sistemas de producción, puede ejercer resultados mayores que con solo su uso individual para aumentar la producción (Gutiérrez *et al.*, 2019).

La liberación de moléculas producidas por los microorganismos, también influyen en el metabolismo vegetal ya que permiten incrementar el crecimiento y la nutrición vegetal; algunos de los mecanismos reportados por los cuales actúan, se relacionan con los ciclos biogeoquímicos, lo que beneficia la disponibilidad nutrimental en el suelo favoreciendo su absorción por las raíces, algunos de procesos favorecidos por la inoculación de los microorganismos benéficos son, la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de AIA, etc. (Mangmang *et al.*, 2016; De Moraes *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019).

5.14 Importancia de la aplicación fosfatada en el cultivo de lechuga

El fósforo es un elemento importante en la naturaleza, este puede influir directamente en el crecimiento de las plantas dependiendo del estado fenológico y la especie vegetal (Al-Mharib *et al.*, 2019). Las condiciones adecuadas de este elemento puede beneficiar diferentes procesos del crecimiento de las plantas como el aumento de la producción de rendimiento (Li, *et al.*, 2020), como se mencionó anteriormente, la lechuga cuenta con diversos metabolitos de importancia nutricional, por lo que un mal manejo de este nutriente, puede provocar el aumento de la concentración de diferentes metabolitos (Gao *et al.*, 2020). Por otro lado, la influencia de este nutriente en presencia de diferentes factores como los microorganismos, favorece sinérgicamente su absorción y por consecuente el desarrollo de las plantas (Wu *et al.*, 2019).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Experimento 1. Evaluación y selección de cepas bacterianas aisladas de meliponidos e inoculadas en plantas de lechuga

El experimento se llevó a cabo en los meses de septiembre y octubre del 2020, en condiciones de invernadero, con temperatura máxima de 35 °C y mínima de 10 °C, y humedad relativa del 75%. El sustrato usado fue una mezcla de vermiculita y perlita (1:1 v/v) esterilizado previamente a 120 °C durante dos horas, por dos días consecutivos.

Las cepas bacterianas utilizadas en el experimento fueron seleccionadas de la colección de cepas de origen externo e interno del cuerpo de las abejas sin aguijón *Frieseomelitta nigra*, *Scaptotrigona pectoralis* y *Melipona beecheii* procedentes de Campeche, México (Baqueiro, 2020; Ferrera-Rodriguez *et al.*, datos no publicados) pertenecientes al proyecto SEP-CONACYT 257847 “Diversidad de meliponinos, estudio de microorganismos asociados y análisis de las propiedades biológicas de sus productos”. Las cuales corresponden a las especies *Pantoea anthophila* (S38), *P. anthophila* (T38), *P. anthophila* (T83), *P. anthophila* (T84), *Bacillus* sp. (T69), *Bacillus* sp. (T70), *Pseudomonas psychrotolerans* (T82), *Sinorhodobacter* sp. (T31), *Serratia nematodiphila* (15), *Staphylococcus arlettae* (18), y *Staphylococcus kloosii* (27) (Cuadro 3). Estas cepas bacterianas fueron seleccionadas a partir de características de importancia para la agricultura, y de pruebas bioquímicas con posible uso como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), de acuerdo con el Manual de Bergey’s (Claus y Berkeley, 1984) (Cuadro 4).

6.1.1 Germinación de las semillas

Se utilizó sustrato inerte compuesto de vermiculita y perlita en proporciones (1:1 v/v) previamente esterilizado a 120 °C durante 2 h, por dos días consecutivos. Se utilizaron semilleros de plástico de 180 cavidades previamente desinfectados con alcohol al 70%, que

fueron llenados a tres cuartas partes de su capacidad total. Posteriormente, se sembraron 5 semillas de lechuga variedad Parrish (AGROTEX con 90 % de germinación) previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% durante 30 s, y lavadas con agua destilada estéril. Una vez sembradas, las semillas fueron cubiertas con el mismo sustrato. Las semillas fueron regadas cada 3 días con 5 mL de agua destilada estéril por cavidad.

Cuadro 3. Especies bacterianas aisladas de abejas sin aguijón.

Cepas/claves	Clave interna	Abeja sin aguijón	Sitio de colecta	Lugar de aislamiento	Código del Genbank
<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.210	S38	<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	Pomuch, Campeche	Parte interna	MN733038
<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.224	T38	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte interna	MN733052
<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.234	T83	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte interna	MN733062
<i>Pantoea anthophila</i> CPO 4.235	T84	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte interna	MN733063
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.238	T69	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte interna	MN733066
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.229	T70	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte externa	MN733057
<i>Pseudomonas sychrotolerans</i> CPO 4.233	T82	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte interna	MN733061
<i>Sinorhodobacter</i> sp. CPO 4.222	T31	<i>Frieseomelitta nigra</i>	Tankuché, Campeche	Parte externa	MN733050
<i>Serratia nematodiphila</i> Mb15Tb	15	<i>Melipona beecheii</i>	Sihochac Campeche	Parte interna	MW857195
<i>Staphylococcus arlettae</i> Mb18N	18	<i>Melipona beecheii</i>	Sihochac Campeche	Nido	MW857196
<i>Staphylococcus kloosii</i> Mb27N	27	<i>Melipona beecheii</i>	Sihochac Campeche	Nido	MW857197

Cuadro 4. Propiedades bioquímicas de especies bacterianas aisladas de abejas sin aguijón.

Cepas/ propiedad	Clave	Fijación de N ₂	Solubilización de fosfato	Producción de AIA	Sideroforos	Catalasa	Resistencia a estrés salino
<i>Pantoea anthophila</i>	S38						
	T38						
	T83	+	+	+	+	+	+
	T84						
<i>Bacillus</i> sp.	T69						
	T70	+	+	+		+	
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>							
	T82	+	+	+	+		
<i>Sinorhodobacter</i> sp.	T31		+			+	
<i>Serratia nematodiphila</i>	15	+	+		+		
<i>Staphylococcus arlettae</i>	18	+	+				
<i>Staphylococcus kloosii</i>	27	+	+			+	+

6.1.2 Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas bacterianas fueron reactivadas en medio líquido Luria Bertani (Lb) (Birruaga *et al.*, 2020) brevemente, con un asa bacteriológica se tomó un poco de muestra y se colocó en tubos falcón de 30 mL con 15 mL de medio líquido Lb, los tubos se colocaron en agitación a 180 rpm durante 5 días a temperatura de 28°C, posteriormente, se sembraron en placas con medio sólido de Lb y se colocaron en incubadora a 20°C durante 4 días para la distinción y caracterización de las colonias puras.

Para la elaboración del inóculo bacteriano se colocaron 30 mL de caldo nutritivo en tubos Falcon, y se esterilizaron a 120 °C durante 18 min. Se tomó una colonia de las cepas reactivadas y se mezcló dentro del tubo correspondiente. Posteriormente, se colocaron en agitación durante tres días a 160 rpm a 27.4 °C, hasta obtener la concentración bacteriana de 7×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) estimadas por el método de diluciones seriadas. Una vez alcanzada la concentración deseada, los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min para eliminar el sobrenadante, a la pastilla bacteriana remanente, se agregó 30 mL de agua estéril para quedar así preparado el inóculo de cada cepa bacteriana, agitando en vortex, para su homogenización. La carga final bacteriana aplicada por mililitro de inóculo a las plantas fue de 7×10^8 células mL⁻¹.

6.1.3 Inoculación de plántulas en invernadero

Las plántulas de ocho días de crecimiento después de la germinación, fueron inoculadas una vez que presentaban dos hojas verdaderas, y dejando una sola plántula por cavidad. Con base en el propósito de la investigación, se realizaron dos diferentes tipos de inoculación bacteriana de manera independiente en las plantas: en la raíz aplicando la suspensión bacteriana en la base del tallo, y foliar mediante aspersión homogénea en las hojas. Para la inoculación radical se tomó 1 mL de cada suspensión bacteriana aplicada por plántula, colocando el inóculo en la base del tallo. Por su parte, para la inoculación foliar, el inóculo fue aplicado con un atomizador, por cada cepa, previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 5%. En cada atomizador, se colocaron 5 mL de inóculo, el cual fue asperjado homogéneamente en las hojas de las plantas, de cada tratamiento. Las plantas fueron previamente regadas con agua destilada estéril, y regadas nuevamente a las 24 horas posteriores a la inoculación.

6.1.4 Variables evaluadas

Después de 25 días de la inoculación, se evaluó la eficiencia del fotosistema II (PSII), y el índice de verdor (Unidades SPAD), en las plantas vivas. Posteriormente, las plantas fueron cosechadas, para determinar el peso seco (hojas, raíz y total), área foliar, y área foliar específica.

La cuantificación de la supervivencia de bacterias inoculadas en las hojas se determinó a las 24 h, y a los 20 días de la inoculación. Se colectaron hojas de las plantas inoculadas y de plantas testigo (sin inoculación bacteriana); se cortaron 10 fragmentos de hoja de 1 cm², y se colocaron en tubos con 10 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, se realizó el método de diluciones seriadas (-2, -3, y -4) (Ramirez *et al.*, 2020). Los fragmentos suspendidos en los tubos con agua destilada, se agitaron vigorosamente en vortex, y se tomaron 100 µL de la suspensión, y se aplicaron en cajas de Petri con medio de cultivo sólido de Lb, y con una varilla de vidrio estéril se homogenizó la alícuota sobre el agar. Las cajas se incubaron a 28 °C por 24-48 h, y se realizó la cuantificación de las UFC.

La eficiencia del PSII (Fv/Fm) se midió mediante el uso del Fluorómetro OS-30p+ (Opti-Sciences) portátil. Para ello se realizó la estandarización de tiempo para la adaptación de la hoja en la fase oscura, al colocar los sensores (clips) con cámara oscura en la hoja, y realizar la medición. Los tiempos de adaptación en la fase oscura para lechuga fueron de 15 min. Los clips se colocaron con la cámara cerrada, y después de 15 min se colocó el medidor portátil. Una vez colocado el medidor, se abrió la cámara, y se tomó rápidamente la lectura de Fv/Fm. Se hizo una medición por planta con tres repeticiones por tratamiento.

El índice de verdor (Unidades SPAD) se tomó con un medidor de clorofila Spadmeter (Minolta, SPAD-502, Japón), tomando lecturas en tres hojas diferentes de cada planta, y considerado ocho plantas por tratamiento.

La determinación del área foliar fue medida en el laboratorio. Las hojas fueron separadas y acomodadas en acetatos para medirlas en un integrador de área foliar LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EE. UU.).

Una vez determinadas las variables anteriores, las hojas fueron colocadas en bolsas de papel y secadas a 70 °C por 72 h, para determinar el peso seco mediante balanza analítica. El área foliar específica se determinó mediante la división del área foliar entre el peso seco de las hojas (Angulo *et al.*, 2018).

6.1.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 24 tratamientos y 10 repeticiones cada uno. Los tratamientos consistieron en un testigo (sin inocular), y 11 tratamientos correspondientes a las cepas bacterianas utilizadas. Los resultados de las variables determinadas se analizaron con el programa SAS mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$).

6.2 Experimento 2. Efecto de cepas bacterianas seleccionadas aisladas de meliponidos, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y tres dosis de fertilización con fósforo, en plantas de lechuga.

El experimento se llevó a cabo en los meses de noviembre y diciembre del 2020 en condiciones de invernadero con temperatura máxima de 35 °C y mínima de 10 °C, con humedad relativa del 80%.

A partir del experimento anterior, se seleccionaron dos cepas bacterianas que presentaron las mejores características de promoción del crecimiento de plantas de lechuga. Para el caso de la inoculación foliar, se seleccionó la cepa T38 (*Pantoea anthophila*), y para el caso de la inoculación en raíz se seleccionó la cepa 15 (*Serratia nematodiphila*). Estas bacterias fueron

combinadas con la inoculación de un consorcio micorrízico arbuscular integrado por las especies *Claroideoglossum claroideum* y *Funneliformis mosseae*, el cual ha sido previamente evaluado como promotor del crecimiento de especies hortícolas (Carballar *et al.*, 2018).

Los tratamientos de inoculación con los microorganismos fueron combinados también con tres dosis de fertilización con P (11, 22 y 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$) aplicadas con la solución nutritiva de Long Asthon (Hewitt, 1966) cuya composición se aprecia en el Anexo 1 (Cuadro A-01, del Apéndice).

6.2.1 Germinación de las semillas e inoculación del consorcio micorrízico arbuscular

Se utilizó sustrato inerte compuesto de vermiculita y perlita en proporciones (1:1 v/v) previamente esterilizado a 120 °C durante 2 h, por dos días consecutivos. Se utilizaron semilleros de plástico de 180 cavidades previamente desinfectados con alcohol al 70 %.

Se establecieron 24 semilleros de 10 cavidades con dos condiciones de inoculación micorrízica: 1) con el consorcio micorrízico arbuscular, y 2) sin inoculación. En los semilleros en los que se inocularía el consorcio micorrízico, se colocaron 5 g del inóculo previamente propagado en arena de río y usando alfalfa (*Medicago sativa*) como planta trampa. Este inóculo tuvo 200 esporas por 5 g de inóculo, y fragmentos de raíces colonizadas con 35% de colonización total. Sobre el inóculo se sembraron 10 semillas de lechuga, las cuales fueron previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5 %, y enjuagadas con agua destilada esteril, se cubrieron con otra capa del sustrato estéril. Para los tratamientos sin inoculación micorrízica simplemente se llenaron las cavidades de los semilleros a tres cuartas partes de su capacidad total, y se sembraron las 10 semillas de lechuga, y se cubrieron con otra capa de sustrato estéril.

6.2.3 Preparación del inóculo micorrízico arbuscular

La cuantificación del número de esporas en el inóculo micorrízico se realizó mediante la extracción de esporas por el método del tamizado húmedo, decantación y centrifugación con gradiente de sacarosa (Modificado de Gerdemann y Nicolson, 1963; Daniels y Skipper, 1972, citado por Ferrera-Cerrato *et al.*, 2020). Brevemente, el inóculo (10 g) se colocó en un vaso de precipitado con 1 L de agua corriente, agitándolo vigorosamente durante 5 min, y dejando reposar otros 5 min. El sobrenadante fue vertido a través de dos tamices de 0.59 y 0.045 mm de tamaño de poro, este paso se repitió cinco veces. El material colectado en el tamiz más pequeño fue colocado en tubo Falcon de 30 mL, con solución de sacarosa (20 % y 60 %).

Para la extracción de esporas por centrifugación se preparó sacarosa en concentraciones de 20 % y de 60 %. Primero se colocaron 5 mL de sacarosa al 20% dentro de un tubo Falcón, posteriormente, se colocaron 4 mL de la concentración de sacarosa al 60% en el fondo del tubo, para formar el gradiente entre ambas concentraciones. Con una varilla de vidrio se manipula el material obtenido del tamiz de 0.045 mm, y se vierte en el tubo con el gradiente de sacarosa, tomando la mayor cantidad de material posible, pero con la menor cantidad de agua. El tubo se centrifugó a 3000 rpm por 5 min, e inmediatamente el contenido se vertió en un tamiz de 0.045 mm, para enjuagar con agua destilada y eliminar la sacarosa. Finalmente, las esporas se colocaron en una caja de Petri, y observadas al estereoscopio, para contabilizarlas, y estimar su número por gramo de inóculo seco.

Para evaluar la colonización micorrízica de las plantas trampa se utilizó el procedimiento modificado de clareo y tinción de raíces Phillips y Haymann, (1970). Se cortaron 20 fragmentos de raíz de 1 cm, y se colocaron en KOH al 10 % para su decoloración durante 48 h; posteriormente, las raíces se enjuagaron con agua de la llave y se colocaron en ácido clorhídrico al 10 % durante 10 min; transcurrido el tiempo las raíces sin enjuagar, se colocaron

en azul tripano al 0.05 %, por 30 min. Por último, las raíces se colocaron en ácido láctico 50 % para retirar el exceso del colorante, y se colocaron sobre un portaobjetos para ser observadas al microscopio óptico y determinar el porcentaje de colonización.

6.2.4 Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas bacterianas fueron reactivadas en medio líquido Luria Bertani (Lb) (Birruaga *et al.*, 2020) brevemente, con un asa bacteriológica se tomó un poco de muestra y se colocó en tubos falcón de 30 mL con 15 mL de medio líquido Lb, los tubos se colocaron en agitación a 180 rpm durante 5 días a temperatura de 28°C, posteriormente, se sembraron en placas con medio sólido de Lb y se colocaron en incubadora a 20°C durante 4 días para la distinción y caracterización de las colonias puras.

Para la elaboración del inóculo bacteriano, se colocaron 30 mL de caldo nutritivo en tubos Falcon, y se esterilizaron a 120 °C durante 18 min. Se tomó una colonia de las cepas reactivadas y se mezcló dentro del tubo correspondiente. Posteriormente, se colocaron en agitación durante tres días a 160 rpm a 27.4 °C, hasta obtener la concentración bacteriana de 6×10^8 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) estimadas por el método de diluciones seriadas. Una vez alcanzada la concentración deseada, los tubos se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min para eliminar el caldo nutritivo, y a la pastilla bacteriana remanente, se agregó agua estéril para preparar el inóculo de cada cepa bacteriana, agitando en vortex, para su homogenización. La carga bacteriana aplicada por mL de inóculo a las plantas fue de 6×10^8 UFC mL⁻¹.

6.2.5 Inoculación de las plantas con las cepas bacterianas

Después de ocho días de germinación de las semillas, una vez que presentaron dos hojas verdaderas, las plántulas fueron inoculadas con las bacterias. Después de cinco días de la inoculación, se dejaron únicamente dos plántulas de lechuga por cavidad. Al igual que el

experimento anterior, se realizaron dos tipos de inoculación bacteriana de manera independiente: foliar y radical, de acuerdo con el tipo de cepa seleccionada y con su efectividad en ambas condiciones de inoculación.

Para la inoculación de la bacteria *S. nematodiphila* en la raíz, se aplicó 1 mL del inóculo bacteriano por plántula de los tratamientos correspondientes, en 10 plantas de cada tratamiento correspondiente a esta forma de inoculación. Por su parte, para la inoculación de la bacteria *P. anthophila*, el inóculo fue asperjado en las hojas (10 plantas de cada tratamiento correspondiente a esta forma de inoculación) mediante atomizadores previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 %, en los que se colocaron 5 mL del inóculo bacteriano.

A los 20 días después de la inoculación bacteriana, las plántulas fueron trasplantadas de los semilleros a macetas con 500 g de sustrato. El trasplante se hizo cuidadosamente para evitar la pérdida del inóculo micorrízico de los cepellones. Al momento del trasplante, en los tratamientos correspondientes, se realizó una segunda inoculación bacteriana de acuerdo con su forma de inoculación, equivalente a la carga de inóculo aplicado en la primera inoculación.

6.2.6 Aplicación de las dosis de fertilización fosfatada

La aplicación de las diferentes dosis de P en el experimento se suministraron a través de la solución nutritiva Long Ashton (Cuadro A-01, Anexo 1 del Apéndice), modificada para aplicar las dosis deseadas de 11, 22, y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, a partir de la fuente de P (NaH_2PO_4).

6.2.7 Variables evaluadas

Después de 35 días de la inoculación, se consideró la evaluación de la supervivencia de bacterias inoculadas en hoja, y el índice de verdor (Unidades SPAD). Posteriormente, las plantas fueron cosechadas, y se determinó el peso fresco, el peso seco (hojas, raíz y total), el área foliar, el área foliar específica, el número de estomas, y la colonización micorrízica.

El índice de verdor (Unidades SPAD), se tomó con un medidor de clorofila Spadmeter (Minolta, SPAD-502, Japón), tomando lecturas en tres hojas diferentes de cada planta, considerado ocho plantas por tratamiento.

El número de estomas se determinó mediante decoloración y tinción de hojas (Cárdenas, 1999). Brevemente, se colectaron hojas de plantas de cada tratamiento, se cortaron fragmentos de 1 cm² de cada hoja, por triplicado, y los fragmentos se suspendieron en hipoclorito de sodio al 5% por 24 h. Trascurrido este tiempo, los fragmentos se colocaron en una solución de rosa de bengala al 0.05 % durante dos horas; posteriormente, se procedió a colocar los fragmentos en portaobjetos, y se observaron en microscopio óptico para realizar el conteo de estomas.

El peso fresco fue tomado después de cosechar las plantas mediante una balanza portátil. La medición del área foliar fue medida en laboratorio. Las hojas fueron separadas y acomodadas en acetatos para medirlas en un integrador de área foliar LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EE. UU.). Una vez determinadas las variables anteriores, las hojas fueron colocadas en bolsas de papel y secadas a 70 °C por 72 h, para determinar el peso seco. El área foliar específica se determinó mediante la división del área foliar entre el peso seco foliar (Angulo *et al.*, 2018).

6.2.8. Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un experimento factorial 4x2x3, considerando cuatro niveles de inoculación bacteriana (sin inoculación, *P. anthophila*, *S. nematodiphila*, y su combinación), 2 niveles de inoculación micorrízica (sin y con HMA), y tres niveles de P (11, 22, y 44 µg P mL⁻¹). En total se tuvieron 24 tratamientos con ocho repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos se analizaron con el programa SAS mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey, P≤0.05).

7. RESULTADOS

7.1 Experimento 1. Evaluación y selección de cepas bacterianas aisladas de meliponidos e inoculadas en plantas de lechuga.

La inoculación foliar con la bacteria S38 (*Pantoea anthophila*) produjo el valor significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) más alto de la medición de la eficiencia PSII (Fv/Fm) en comparación con la inoculación foliar de las bacterias T83 (*Pantoea anthophila*) y 15 (*Serratia nematodiphila*) (Figura 7A). El resto de los tratamientos inoculados con las bacterias en las hojas, no mostraron diferencias significativas con el control (Figura 7A); Por su parte, la inoculación radical con la bacteria 18 (*Staphylococcus arlettae*) mostró diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) en la eficiencia del PSII con respecto a la inoculación con la bacteria T38 (*Pantoea anthophila*) (Figura 7B). No se observaron diferencias significativas entre el resto de los tratamientos (Figura 7B).

El valor más alto del índice de verdor (Unidades SPAD) se obtuvo con la inoculación foliar de la cepa T38 (*Pantoea anthophila*); aunque todos los tratamientos inoculados mostraron mayor efecto significativo que el control (Figura 8A). La cepa T31 (*Sinorhodobacter* sp.) inoculada en raíz, produjo el valor más alto; sin embargo, todos los tratamientos bacterianos mostraron mayor efecto significativo (Tukey, $\alpha=0.05$) que el control (Figura 8B).

La inoculación foliar con T38 (*Pantoea anthophila*) produjo mayor peso seco foliar, y el valor más bajo se obtuvo con la cepa T31 (*Sinorhodobacter* sp.); sin embargo, todos los tratamientos inoculados mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto al control (Figura 9A). Todos los tratamientos inoculados en raíz mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) en el peso seco foliar en comparación con el control (Figura 9B); el valor más alto se obtuvo con la cepa 15 (*Serratia amrcescens*), y el más bajo con T31 (*Sinorhodobacter* sp.) (Figura 9B).

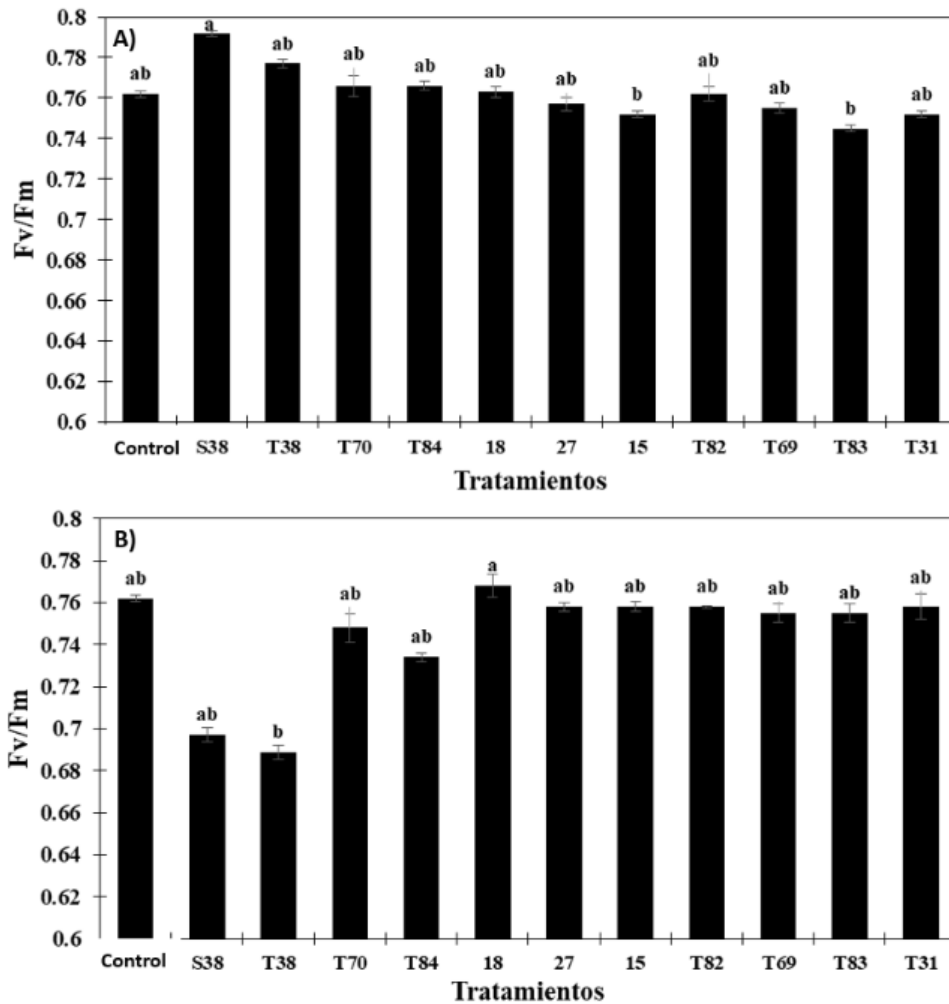


Figura7. Eficiencia del fotosistema II (Fv/Fm) en plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

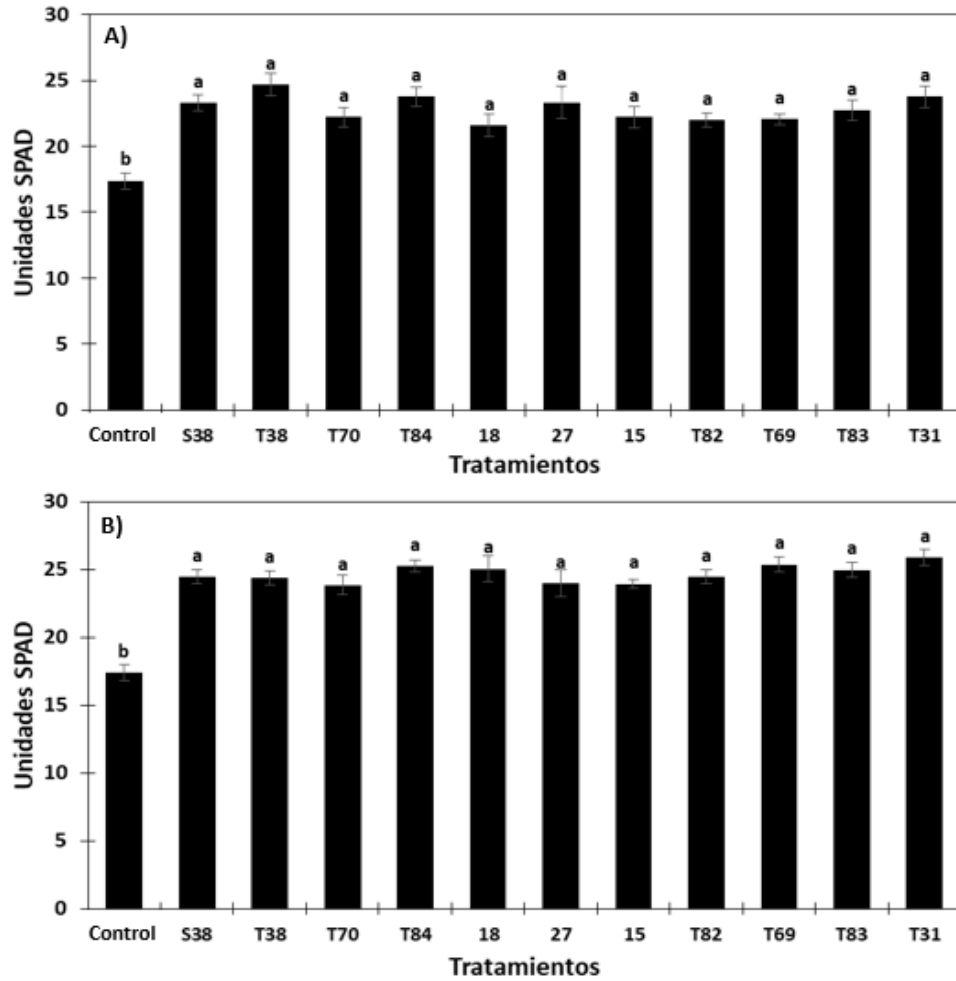


Figura 8. Índice de verdor (Unidades SPAD) de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

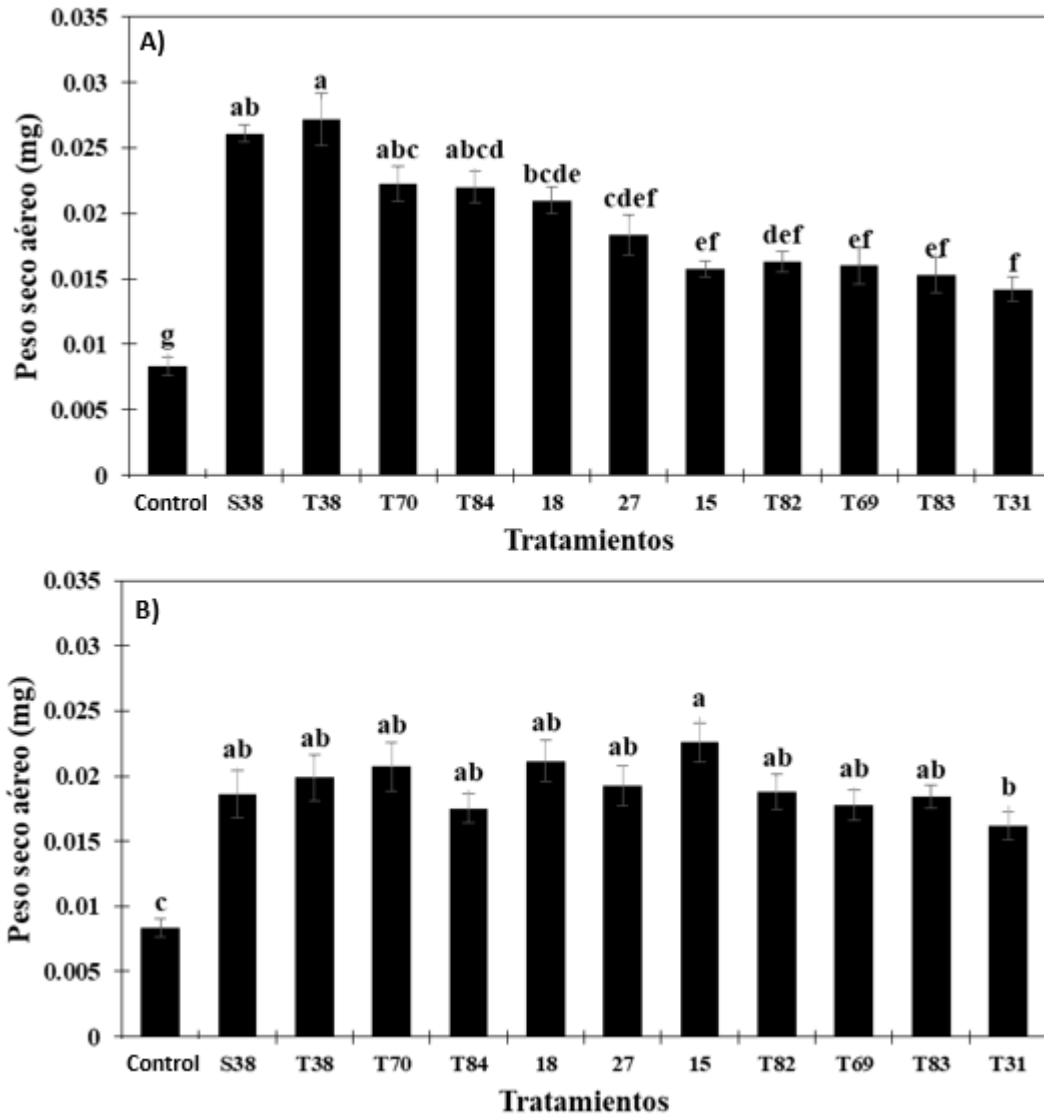


Figura 9. Peso seco foliar de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

El mayor valor del peso seco radical se obtuvo con la inoculación foliar de la cepa 18 (*Staphylococcus arlettae*) la cual mostró diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) con las cepa 15 (*Serratia nematodiphila*) y T69 (*Bacillus* sp); no obstante, todos los tratamientos bacterianos mostraron diferencias significativas con el control (Figura 10A). La inoculación de la cepa T82 (*Pseudomonas psychrotolerans*) en raíz mostró diferencias significativas del peso seco radical (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto al control (Figura 10B); en los tratamientos bacterianos, la cepa T84 (*Pantoea anthophila*) mostró el valor más bajo (Figura 10B).

La inoculación foliar de la cepa T38 (*Pantoea anthophila*) produjo significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayor peso seco total con respecto a las cepas 15 (*Serratia nematodiphila*), T69 (*Bacillus* sp.), T83 (*P. anthophila*) y T31 (*Sinorhodobacter* sp.), y con el control (Figura 11A). Por su parte, la inoculación en raíz con la cepa 15 (*Serratia nematodiphila*) produjo el mayor valor de peso seco, aunque todos los tratamientos bacterianos mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) en comparación con el control (Figura 11B).

Todos los tratamientos inoculados de manera foliar mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) en el área foliar de las plantas en comparación con el control (Figura 12A); el mayor valor se obtuvo con la inoculación de la cepa T38 (*Pantoea anthophila*) el cual mostró diferencias significativas con la cepa T31 (*Sinorhodobacter* sp.) (Figura 12A). Por su parte, la inoculación en raíz de la cepa 15 (*Serratia nematodiphila*) registró significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) el mayor valor del área foliar con respecto a la cepa T31 (*Sinorhodobacter* sp.); sin embargo, todos los tratamientos bacterianos inoculados en raíz, mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto al control (Figura 12B).

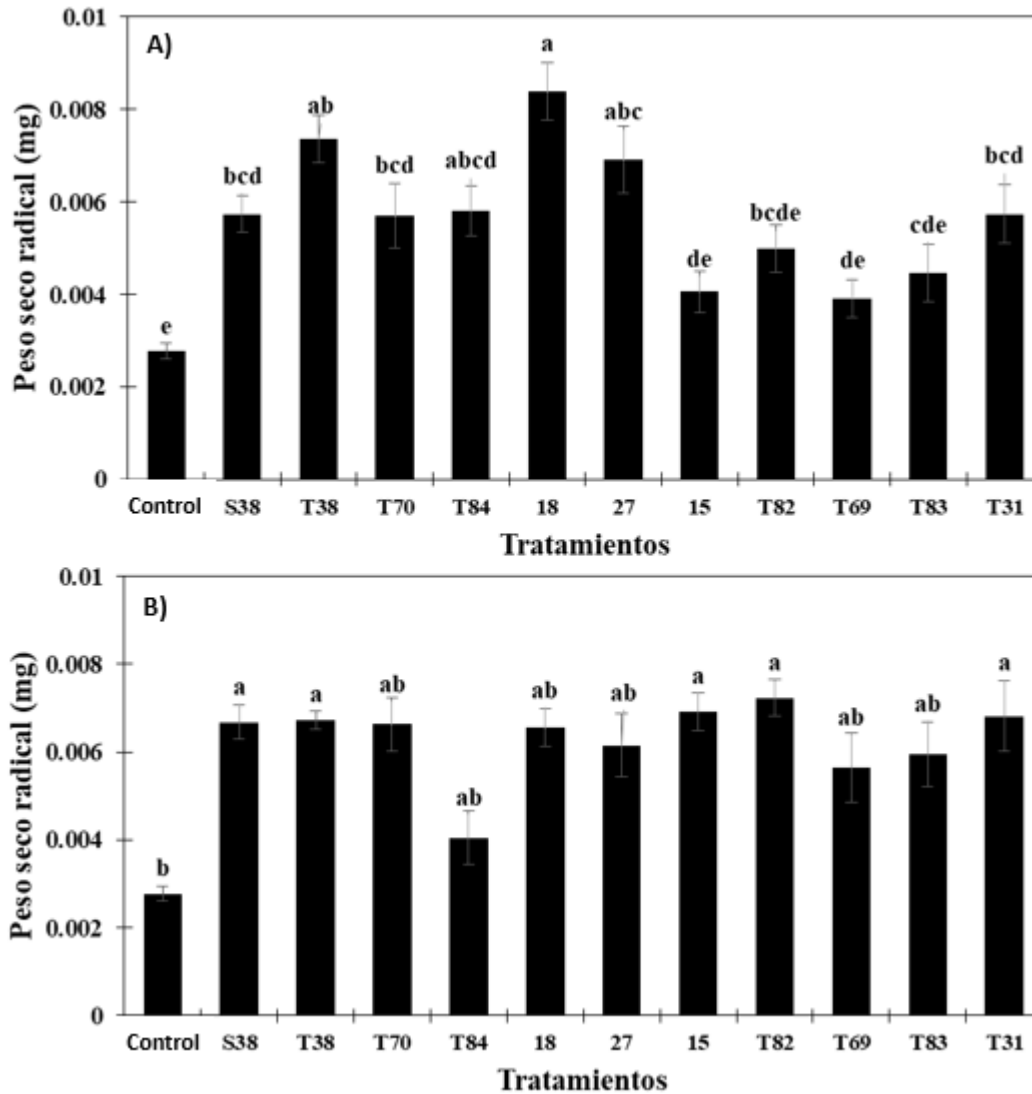


Figura 10. Peso seco radical de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

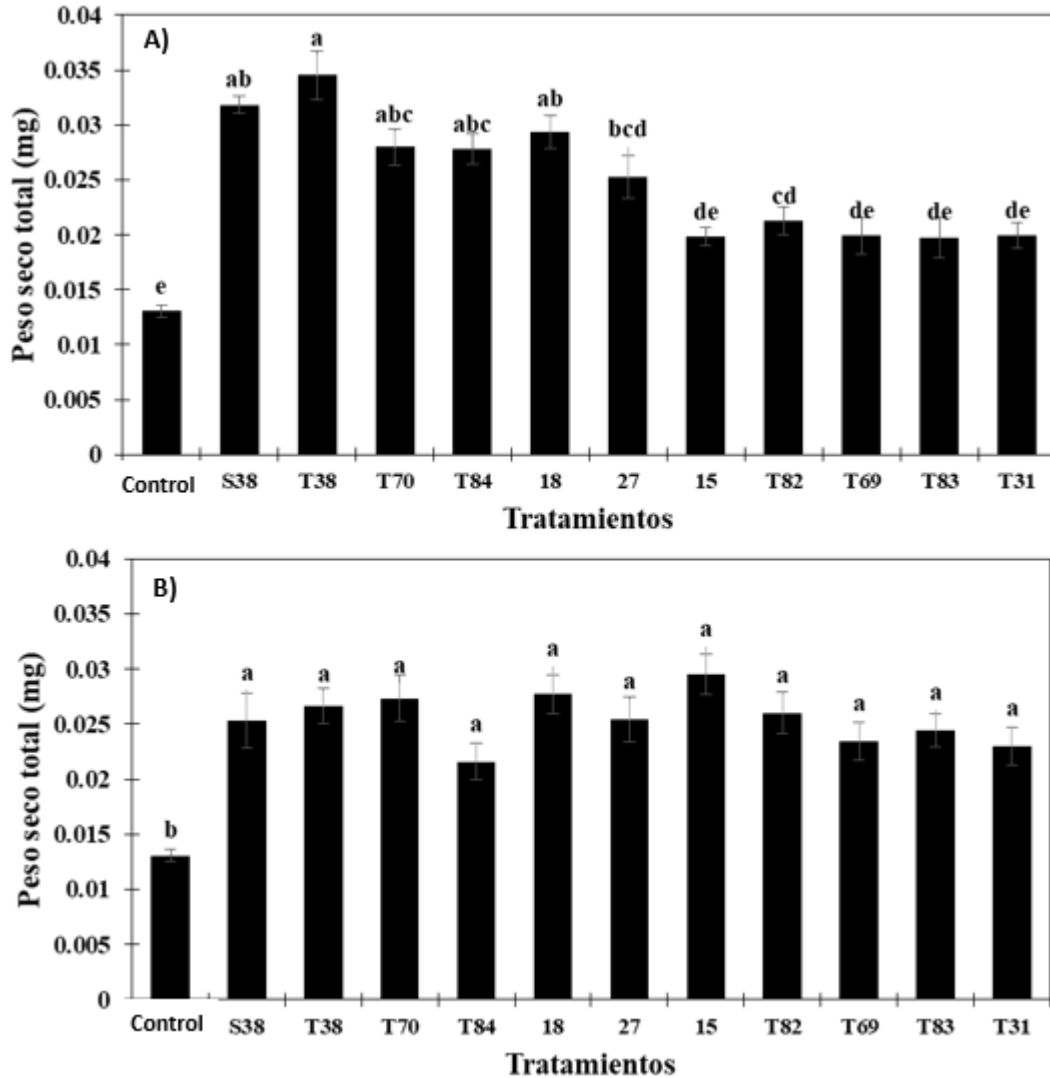


Figura 11. Peso seco total de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

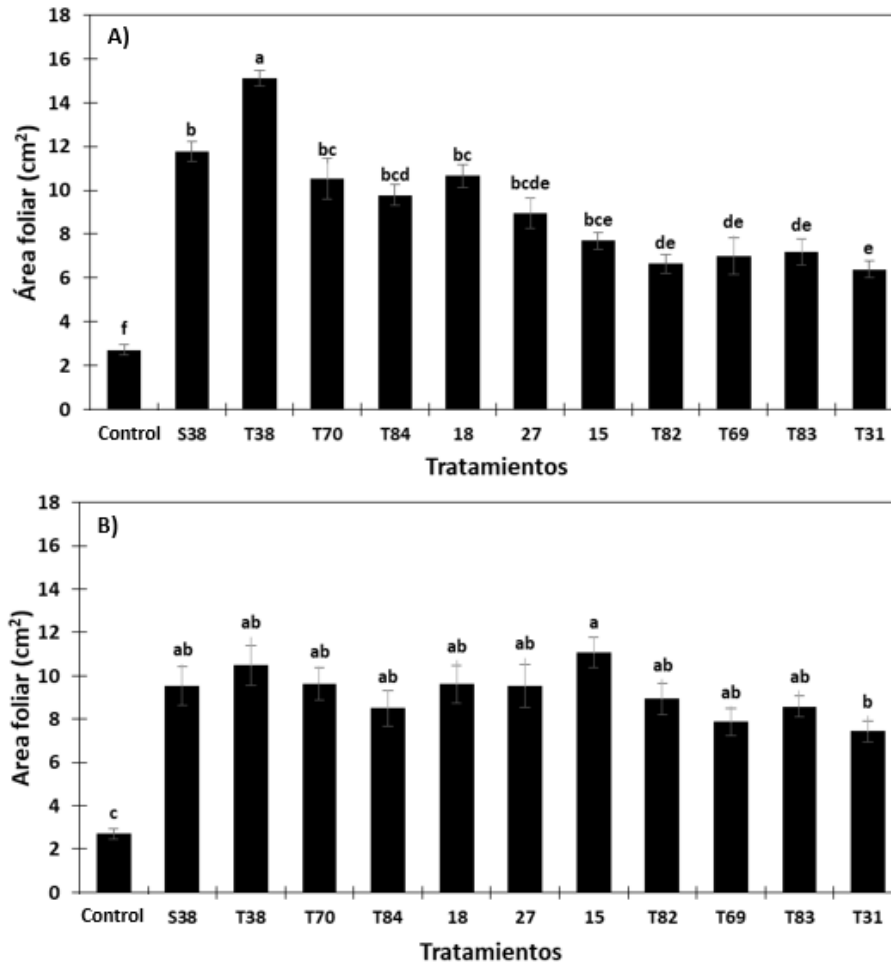


Figura 12. Área foliar de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parris, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

El área foliar específica de las plantas control fue significativamente mayor (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto a todos los tratamientos con la inoculación bacteriana de forma foliar (Figura 13A). Por su parte, la inoculación de las bacterias en raíz, mostró el mismo efecto que la inoculación foliar, es decir, las plantas control tuvieron significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayor área foliar específica que los tratamientos inoculados (Figura 13B).

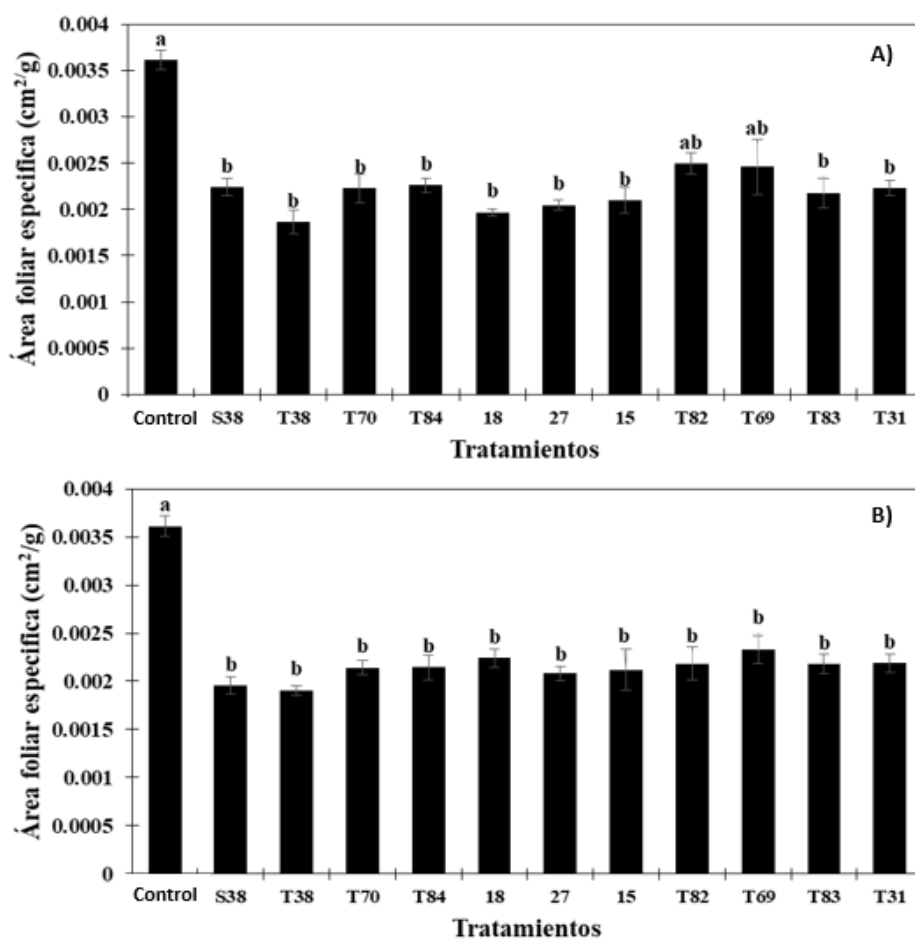


Figura 13. Área foliar específica de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con bacterias aisladas de abejas sin aguijón, A) inoculación foliar, y B) inoculación radical, después de 25 días de crecimiento en invernadero. Letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=10.

7.2 Experimento 2. Efecto de cepas bacterianas seleccionadas y aisladas de meliponidos, combinadas con hongos micorrízicos arbusculares y con tres dosis de fertilización con fósforo, en plantas de lechuga.

En esta investigación se evaluó de forma separada, el efecto independiente de cada uno de los tres factores considerados (inoculación bacteriana, inoculación de HMA, y aplicación de fertilización fosfatada), y aplicados en plantas de lechuga en invernadero. Los resultados de los efectos independientes de estos tres factores, a los 35 días después de la inoculación y aplicación de las dosis de P, se describen a continuación.

Con respecto al factor independiente de la inoculación bacteriana, las plantas inoculadas mostraron mayor respuesta significativa en todas las variables con respecto al control. De manera particular, la inoculación individual de *S. nematodiphila* o su combinación con *P. anthophila*, produjo mayor respuesta en las variables evaluadas (Cuadro 5).

Para el factor independiente de la aplicación de las dosis de fósforo, la dosis de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ resultó en general, en incrementos significativos en las variables evaluadas en comparación con las dosis de 11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ (Cuadro 6). No obstante, la aplicación de 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ aumentó significativamente la colonización micorrízica en comparación con las otras dos dosis de fósforo (Cuadro 6).

La inoculación con HMA como factor independiente, solo mostró diferencias significativas en el peso seco foliar y en el peso seco total; las plantas inoculadas con HMA mostraron mayor respuesta en estas dos variables en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 7). Para el resto de las variables no se observaron diferencias significativas por la inoculación de los HMA (Cuadro 7).

Cuadro 5. Efecto de la inoculación bacteriana como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga, después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero.

Efecto de la inoculación bacteriana	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (mg)	Peso seco radical (mg)	Peso seco total (mg)	Índice de verdor (Unidades SPAD)	Área foliar (cm ²)	Colonización micorrízica (%)
Control	3.24 b ± 0.1	0.190 c ± 0.01	0.04 c ± 0.001	0.229 c ± 0.01	26.62 b ± 0.4	77.06 c ± 4.43	19.31 b ± 4.8
<i>S. nematodiphila</i>	5.41 a ± 0.1	0.302 a ± 0.01	0.05 ab ± 0.002	0.357 a ± 0.01	31.34 a ± 0.5	130.4 ab ± 4	19.58 ab ± 4.8
<i>P. anthophila</i>	5.12 a ± 0.1	0.261 b ± 0.007	0.05 b ± 0.001	0.311 b ± 0.007	30.92 a ± 0.4	120.17 b ± 3	20.62 ab ± 5
Combinación	5.56 a ± 0.1	0.304 a ± 0.01	0.05 a ± 0.001	0.360 a ± 0.01	31.05 a ± 0.5	134.96 a ± 4.01	21.33 a ± 5.2
Significancia	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
C.V.	19.28	25.01	23.28	22.29	10.62	20.48	19.01
DSM	0.4	0.03	0.006	0.03	1.6	12.4	3.3

Medias ± error estándar. Letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). n= 48. C.V.=Coeficiente de variación. DSM=Diferencia significativa mínima. S=*Serratia*. P=*Pantoea*.

Cuadro 6. Efecto de la aplicación de tres dosis de fertilización fosfatada como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga, después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero.

Efecto de la aplicación de fósforo ($\mu\text{g P mL}^{-1}$)	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (mg)	Peso seco radical (mg)	Peso seco total (mg)	Índice de verdor (Unidades SPAD)	Área foliar (cm ²)	Colonización micorrízica (%)
11	4.08 c ± 0.2	0.21 c ± 0.009	0.04 b ± 0.001	0.25 c ± 0.01	27.88 b ± 0.5	102.56 b ± 5.2	19.62 b ± 0
22	5.46 a ± 0.1	0.31 a ± 0.01	0.05 a ± 0.001	0.36 a ± 0.01	31.26 a ± 0.4	124.91 a ± 3.4	19.14 b ± 0
44	4.96 b ± 0.1	0.27 b ± 0.01	0.04 b ± 0.001	0.32 b ± 0.01	30.82 a ± 0.4	119.52 a ± 3.8	21.87 a ± 0
Significancia	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
CV.	19.28	25.01	23.28	22.29	10.62	20.48	19.01
DSM	0.38	0.2	0.004	0.02	1.33	9.85	2.6

Medias ± error estándar. Letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). n= 64. C.V.=Coeficiente de variación. DSM=Diferencia significativa mínima.

Cuadro 7. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como factor independiente, en el crecimiento de plantas de lechuga, después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero.

Efecto de la aplicación de HMA	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (mg)	Peso seco radical (mg)	Peso seco total (mg)	Índice de verdor (Unidades SPAD)	Área foliar (cm ²)	Colonización micorrízica (%)
Con	4.92 a ±0.13	0.27 a ±0.009	0.05 a ± 0.001	0.32 a ±0.009	29.71 a ± 0.3	116.47 a ±3.09	40.42 a ± 1.07
Sin	4.75 a ± 0.16	0.25 b ± 0.01	0.04 a ± 0.001	0.31 b ±0.01	30.25 a ±0.4	114.87 a ±4.04	0 b ± 0
Significancia	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C V.	19.28	25.01	23,28	22.29	10.62	20.48	19.01
DSM	0.2	0.02	0.003	0.02	0.9	6.7	1.8

Medias ± error estándar. Letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). n= 96. CV.=Coeficiente de variación. DSM= Diferencia significativa mínima.

En el cuadro 8 se muestra la evaluación de la supervivencia de las bacterias inoculadas a las 24 h y 20 d después de la aspersión foliar en comparación con el testigo, y se indica que el promedio de la supervivencia bacteriana de los tratamientos resultó en un alto porcentaje de colonización de las hojas en tratamientos inoculados. Esto denota la persistencia de las cepas en el tejido foliar de las plantas. En las plantas testigo se obtuvieron datos relevantes a la colonización por bacterias que no se inocularon; no obstante, los datos obtenidos 20 días después de la inoculación y en base a las características micromorfológicas de las cepas inoculadas, muestran un proceso de competencia por el área en las hojas por las cepas que se aplicaron, debido a la nula presencia de contaminación en comparación con las plantas control.

A continuación se describen los resultados obtenidos por efecto de la combinación de los tres factores (24 tratamientos), que se aprecian en lo general, en el Cuadro A-02 (Anexo 2 del Apéndice) y en las imágenes A-01 y A-02 (Anexo 3 y 4 del Apéndice).

Cuadro 8. Resultados de la evaluación de la supervivencia bacteriana de plantas inoculadas en hoja.

24 horas después de la inoculación	20 días después de la inoculación Testigo	20 días después de la inoculación plantas inoculadas
4.5 x10 ⁵ UFC mL ⁻¹	2.6 x10 ³ UFC mL ⁻¹	3.7 x 10 ⁴ UFC mL ⁻¹

Con la dosis de 11 µg P mL⁻¹, la inoculación de los microorganismos (solos o combinados) produjo mayor índice de verdor (Tukey, α=0.05) con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana sin HMA (Figura 14A). En la dosis de 22 µg P mL⁻¹ el mayor índice de verdor se obtuvo

al inocular individualmente a *S. nematodiphila*, pero sin mostrar diferencias significativas con los demás tratamientos (Figura 14B). Con 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, el mayor índice de verdor se obtuvo con la inoculación individual de *P. anthophila*, mostrando diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) con las plantas sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 14C).

La variable de peso fresco foliar mostró incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) con la dosis de 11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ y la inoculación de todos los microorganismos (solo o combinados) con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana (Figura 15A). Por su parte, la aplicación de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ produjo significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayor peso fresco con la inoculación individual de *S. nematodiphila*, en comparación con el tratamiento sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 15B); el resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 15B). En el caso de la aplicación de la dosis de 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, la inoculación combinada de las bacterias sin HMA produjo incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto a los tratamientos sin inoculación bacteriana y sin HMA (Figura 15C). El resto de los tratamientos inoculados con los microorganismos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 15C).

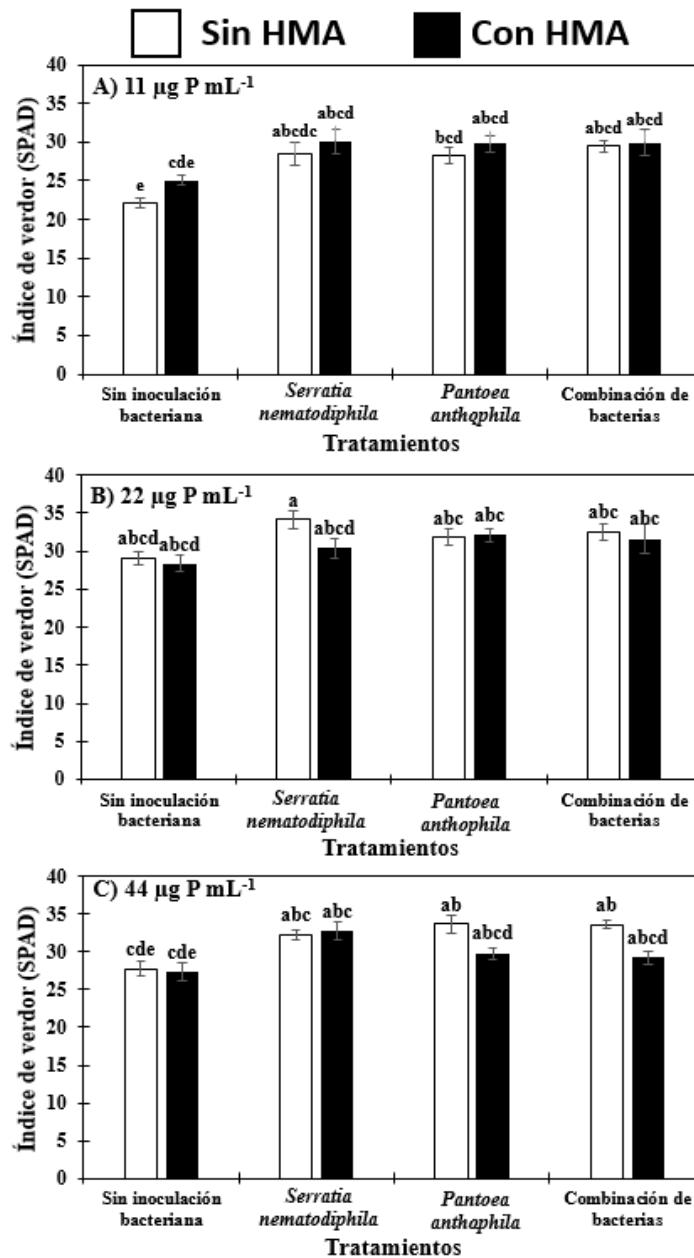


Figura 14. Índice de verdor (SPAD) en hojas de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

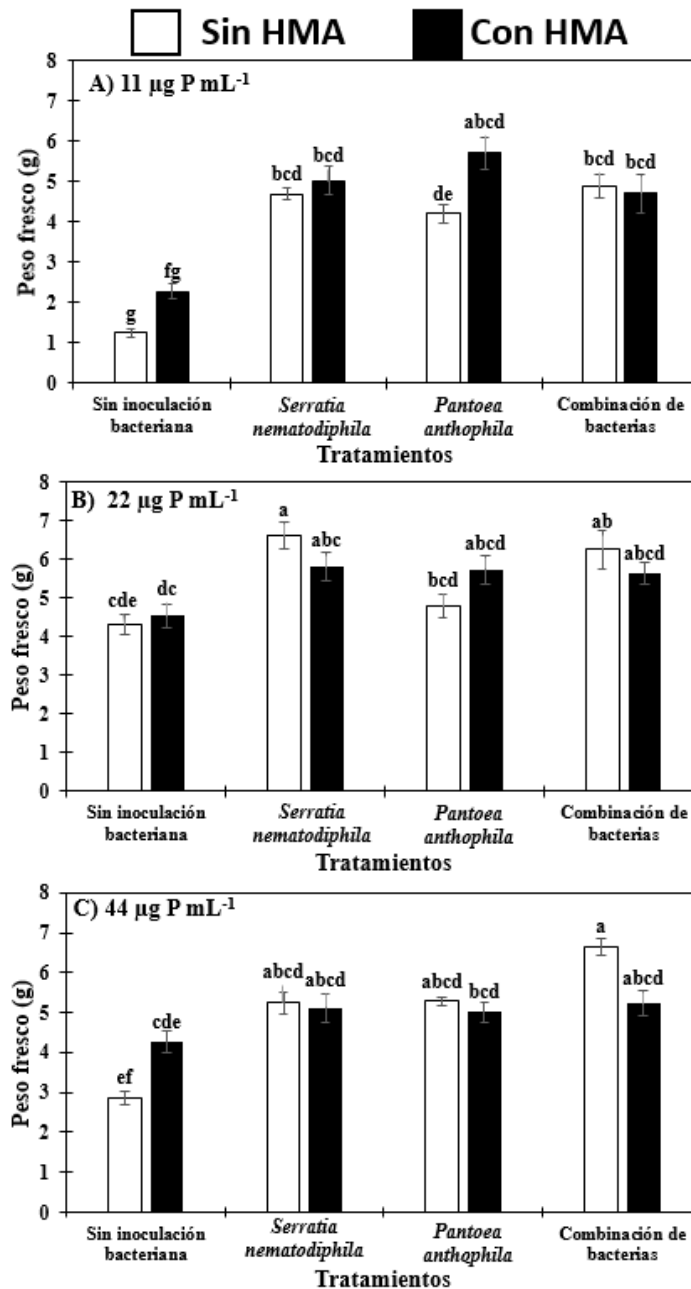


Figura 15. Peso fresco de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

La inoculación de las cepas bacterianas (solas o combinadas con HMA) con aplicación de 11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, resultó en incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) en el peso seco de hojas con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana y sin HMA (Figura 16A). Por su parte, en los tratamientos con la dosis de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, la inoculación individual de *S. nematodiphila* aumentó significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) el peso seco foliar, en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana con o sin HMA, y con las plantas con la sola inoculación de *P. anthophila* (Figura 16B). Para el caso de la dosis de 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, todos los microorganismos inoculados (solo o en combinación) incrementaron significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) el peso seco foliar en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana y sin HMA (Figura 16C).

En el caso del peso seco de raíz, todos los microorganismos inoculados (solos o en su combinación) con la aplicación de 11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, produjeron incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto a los tratamientos sin inoculación de bacterias con o sin HMA; se destaca el efecto obtenido en las plantas con la sola inoculación de *P. anthophila* con HMA, y en las plantas con la combinación con ambas bacterias sin HMA (Figura 17A). En la dosis de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ el peso seco de raíz con mayor incremento significativo (Tukey, $\alpha=0.05$) se obtuvo con la inoculación individual de *S. nematodiphila* con respecto al resto de los tratamientos (Figura 17B). En general, la aplicación de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ produjo mayor peso de raíz de las plantas con respecto a las plantas con la dosis de 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ (Figura 17B y C). No obstante, con esta última dosis de P, la inoculación combinada de las bacterias sin HMA produjo incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 17C). El resto de los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 17C).

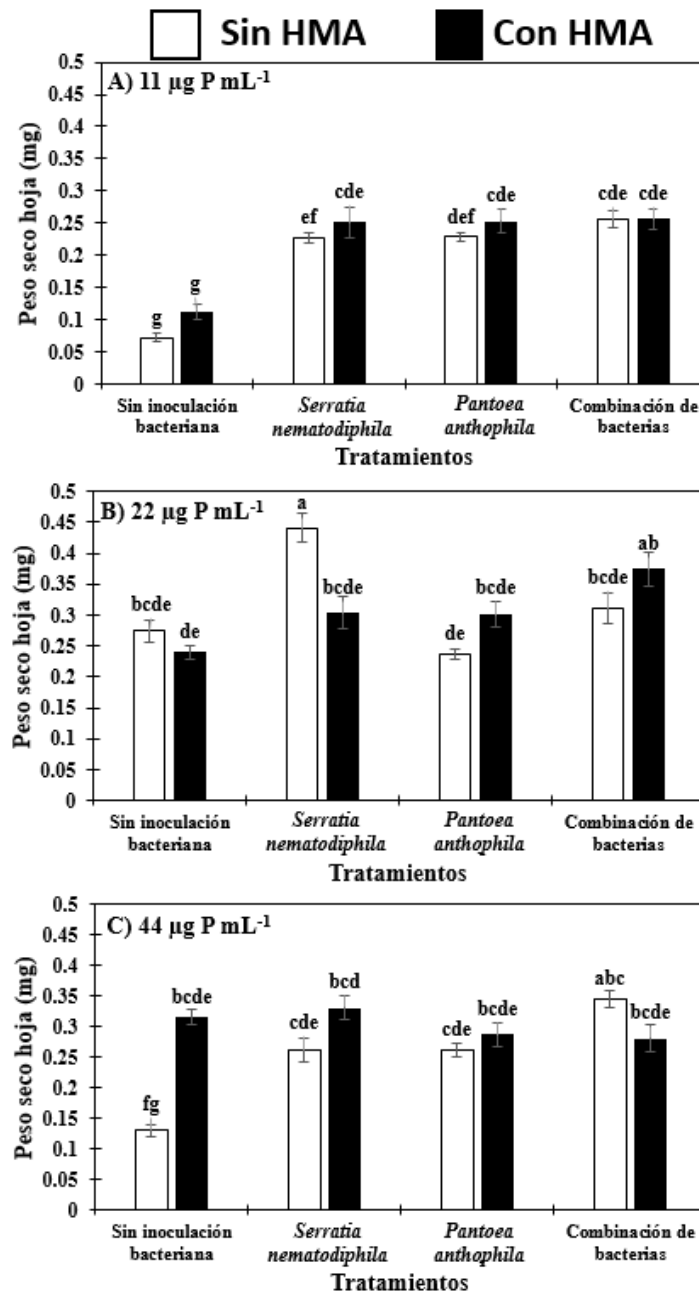


Figura 15. Peso seco de hojas de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

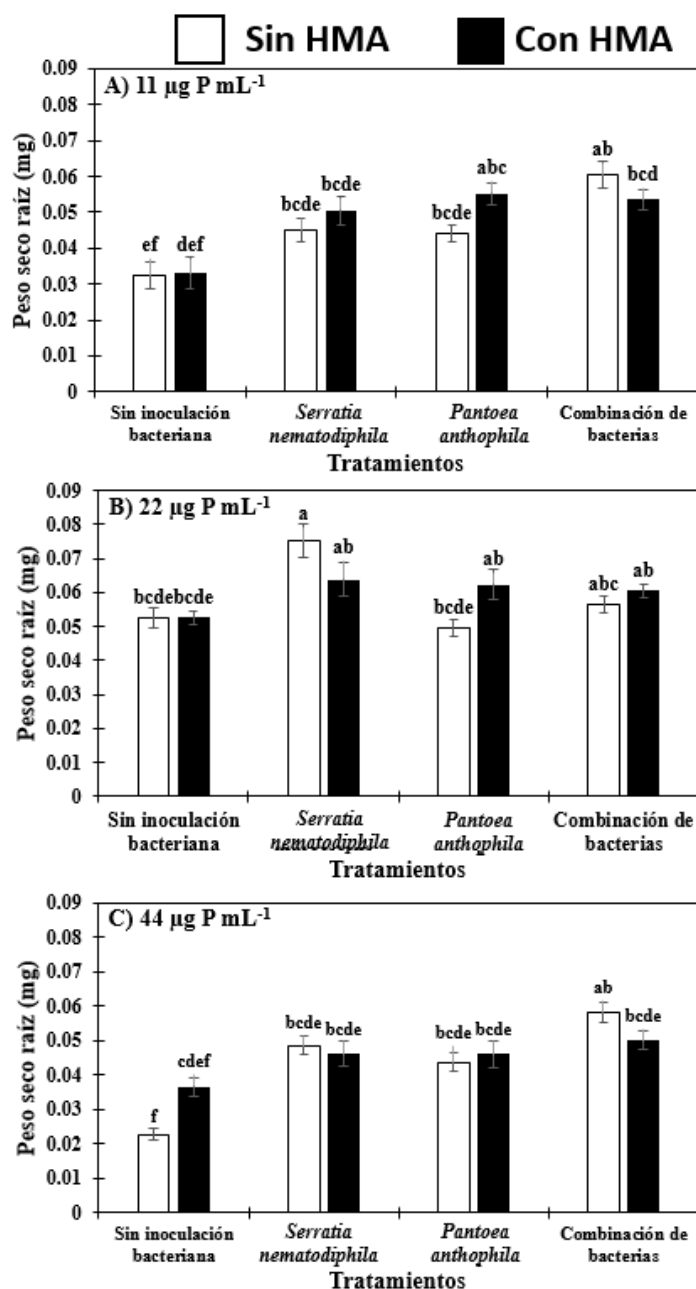


Figura 16. Peso seco radical de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, $n=8$

En peso seco total de las plantas, con la dosis de $11 \mu\text{g P mL}^{-1}$, fue significativamente mayor (Tukey, $\alpha=0.05$) con la inoculación de las bacterias (solas o en su combinación con HMA) con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 18A). Por su parte, en con la dosis de $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$ el mayor peso total se obtuvo con la inoculación individual de *S. nematodiphila*, mostrando diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) con el resto de los tratamientos, con excepción del tratamiento con la doble inoculación de las bacterias con HMA (Figura 18B). En el caso de la dosis de $44 \mu\text{g P mL}^{-1}$, las plantas inoculadas de manera individual o combinada de los microorganismos benéficos, mostraron incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) en el peso seco total, con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana y sin HMA (Figura 18C).

La inoculación de las cepas bacterianas, solas o en combinación con los HMA, en las plantas con aplicación de la dosis de $11 \mu\text{g P mL}^{-1}$, resultó en incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) en el área foliar de las plantas de lechuga, con respecto a las plantas sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 19A). Por su parte, con la dosis de $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$ las plantas inoculadas individualmente con *S. nematodiphila* mostraron mayor área foliar, cuyos valores fueron significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) diferentes únicamente con los tratamientos sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 19B). En la dosis de $44 \mu\text{g P mL}^{-1}$, la mayor área foliar se obtuvo en el tratamiento con la doble inoculación sin HMA, el cual mostró diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) respecto a los tratamientos sin inoculación bacteriana (con y sin HMA), y con la inoculación individual de las bacterias con HMA (Figura 19C). En esta dosis de P, las plantas con bacterias tuvieron menor área foliar al combinarlas con HMA; sin embargo, sin la inoculación bacteriana, los HMA produjeron mayor área foliar (no significativa) que su contraparte sin HMA (Figura 19C).

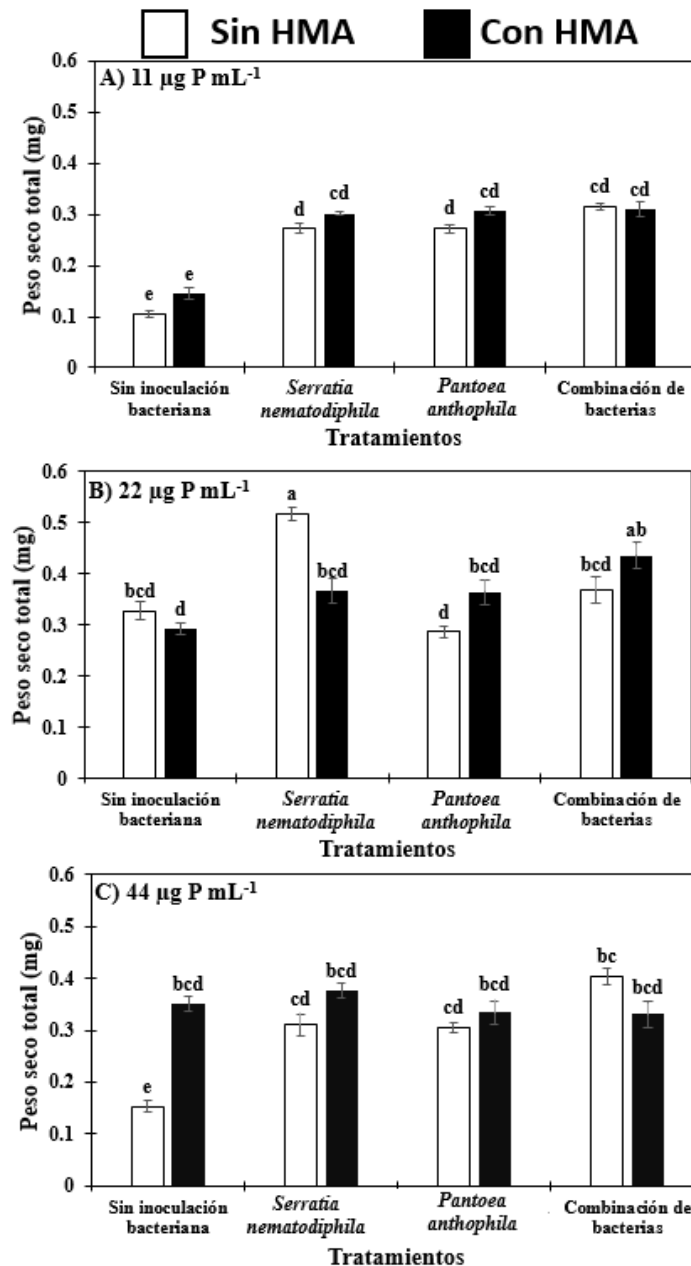


Figura 17. Peso seco total de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

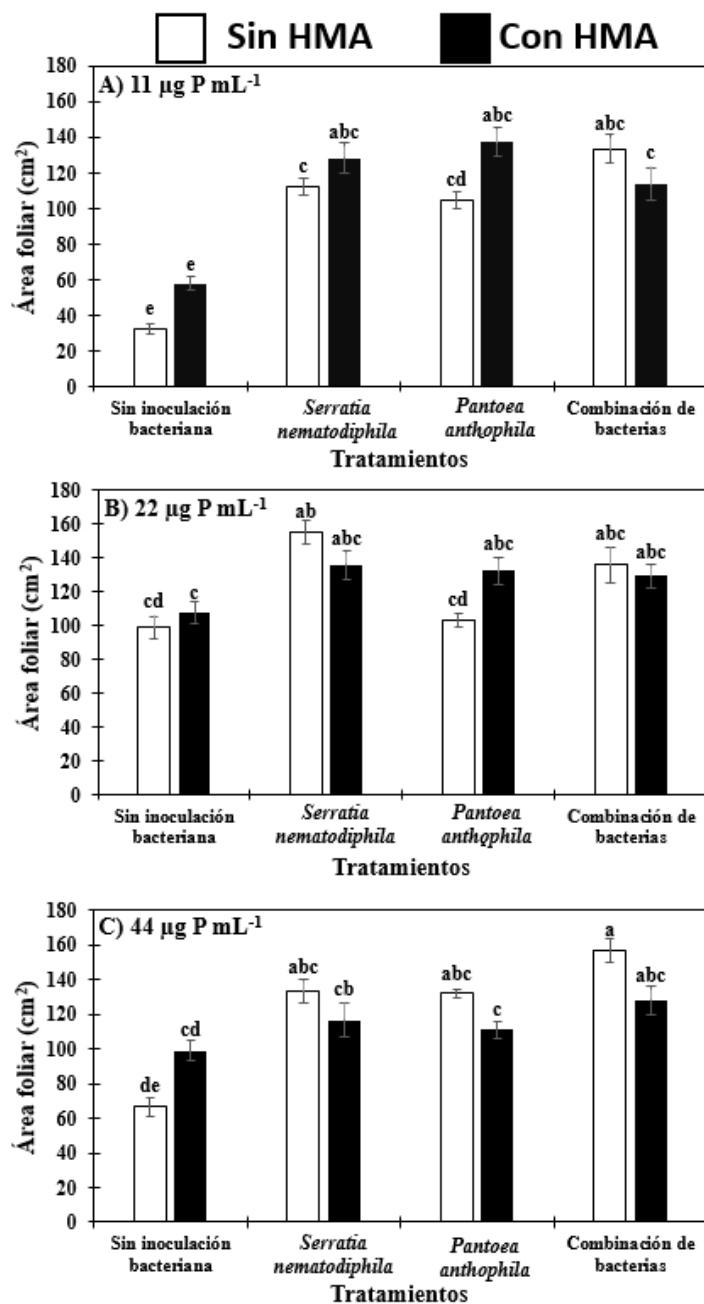


Figura 18. Área foliar de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

No se observaron diferencias significativas en el área foliar específica de las plantas en todos los tratamientos con la aplicación de la dosis de $11 \mu\text{g P mL}^{-1}$, no obstante, los valores más altos se obtuvieron con la sola inoculación de HMA, y con inoculación de *P. anthophila* con HMA (Figura 20A). Similar efecto se obtuvo con la dosis de $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$, cuyos tratamientos con o sin la inoculación de los microorganismos (solos o en combinación) no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 20B). Por su parte, en la dosis de $44 \mu\text{g P mL}^{-1}$, se observó que las plantas sin bacterias con HMA y las plantas con la inoculación de *P. anthophila* o *S. nematodiphila* en combinación con HMA, mostraron valores significativamente más bajos que sus contrapartes sin HMA (Figura 20C). Lo anterior denota que las plantas con HMA mostraron hojas más gruesas con la dosis de $44 \mu\text{g P mL}^{-1}$ (Figura 20C), con respecto a las hojas de las plantas de todos los tratamientos con la aplicación de 11 o $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$ (Figura 20A y B).

La inoculación de bacterias (solas o combinadas con HMA), en la dosis de $11 \mu\text{g P mL}^{-1}$, resultó en mayor número de estomas por unidad de área, siendo significativamente mayor (Tukey, $\alpha=0.05$) al número de estomas de los tratamientos sin inoculación bacteriana con o sin HMA (Figura 21A). En el caso de la dosis de $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$, la inoculación individual de *P. anthophila* produjo incrementos significativos (Tukey, $\alpha=0.05$) en el número de estomas con respecto a los tratamientos sin bacterias, con o sin HMA; el resto de los tratamientos no tuvieron diferencias significativas entre sí (Figura 21B). En la dosis de $44 \mu\text{g P mL}^{-1}$, en general, los tratamientos inoculados con las dos bacterias y el tratamiento de *P. anthophila* con HMA, mostraron significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayor número de estomas con respecto a los tratamientos sin inoculación bacteriana, con o sin HMA (Figura 21C).

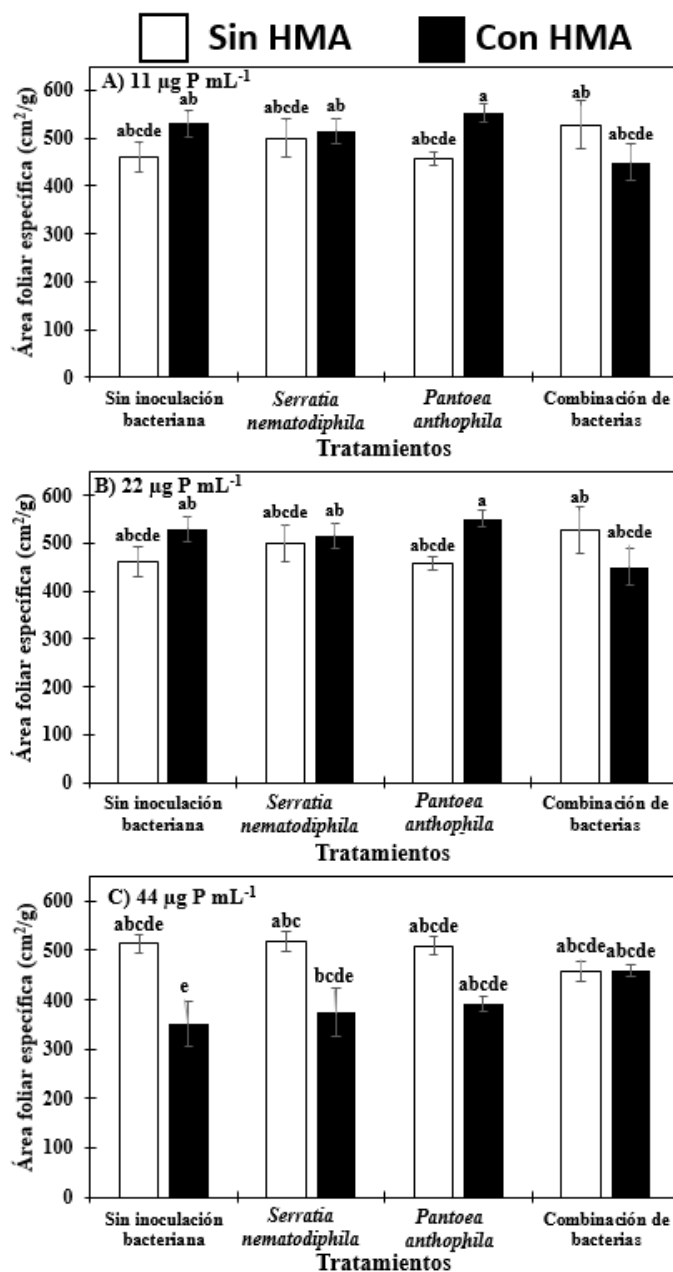


Figura 19. Área foliar específica de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 μg P mL⁻¹), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, α=0.05). Medias ± error estándar, n=8.

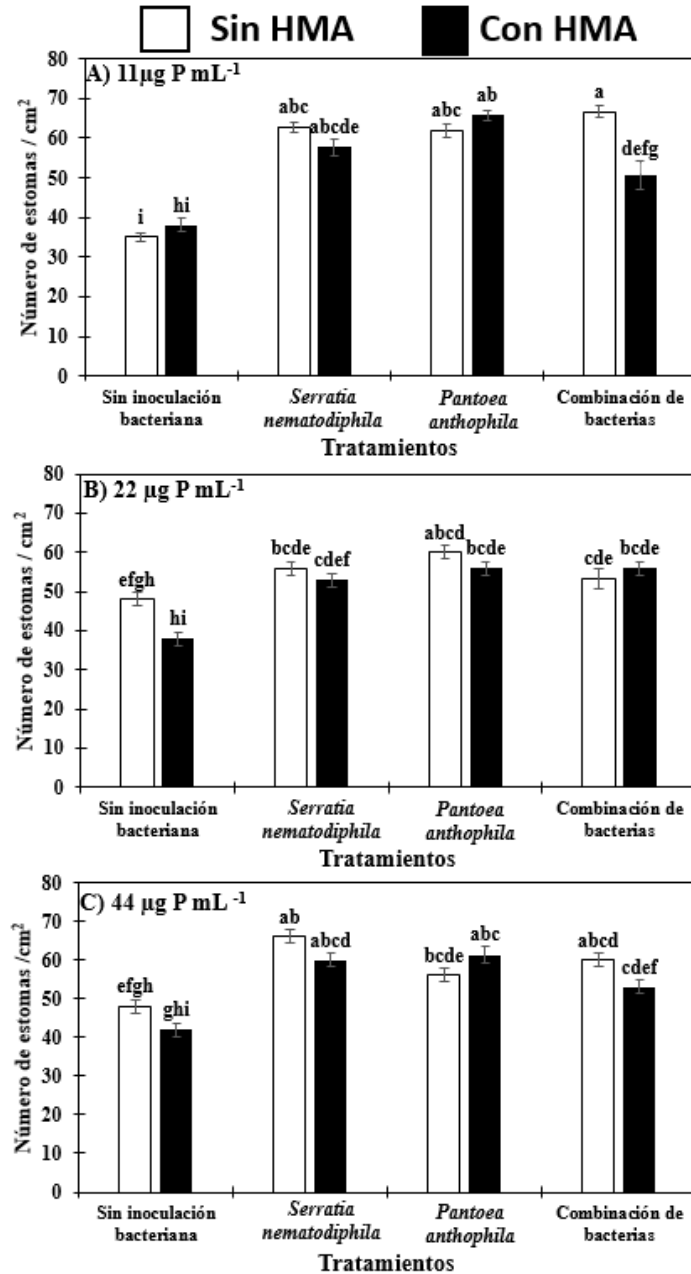


Figura 20. Número de estomas en hojas de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

Con respecto a la colonización micorrízica, las plantas inoculadas con HMA con la dosis de 11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ mostraron el mayor valor de colonización en combinación con las bacterias; en general, todos los tratamientos mostraron diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) en comparación con las plantas micorrizadas sin la inoculación bacteriana (Figura 22A). Para el caso de la dosis de 22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 22B). Por su parte, en la dosis de 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, el mayor valor de colonización se obtuvo con la inoculación de *P. anthophila*, y en la inoculación individual de HMA; sin embargo, todos los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 22C).

8. DISCUSIÓN

Los microorganismos están relacionados con procesos importantes en el ambiente que benefician de manera directa o indirecta a las plantas, tales como la liberación de nutrientes, fertilidad y formación del suelo (Galvez y Burbano, 2015; García *et al.*, 2016; Veturi y Keel, 2016). Las plantas por su parte, liberan exudados radicales que ayudan a los microorganismos a sobrevivir en diferentes ambientes (Feijoo, 2016), cuya distribución y abundancia son afectados por factores físicos, químicos y biológicos (Robledo, 2017). A su vez los microorganismos influyen en procesos metabólicos de las plantas, y contribuyen en su crecimiento y protección contra patógenos (Pérez *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2018).

La lechuga al ser una planta hortícola de rápido crecimiento y fácil manejo, es un cultivo factible de producirlo con la aplicación de biofertilizantes. Algunas investigaciones han probado el uso de diferentes géneros bacterianos y su efectividad obteniendo resultados significativos al aumentar el crecimiento de estas plantas (Cerna *et al.*, 2018; Gutierrez *et al.*, 2019).

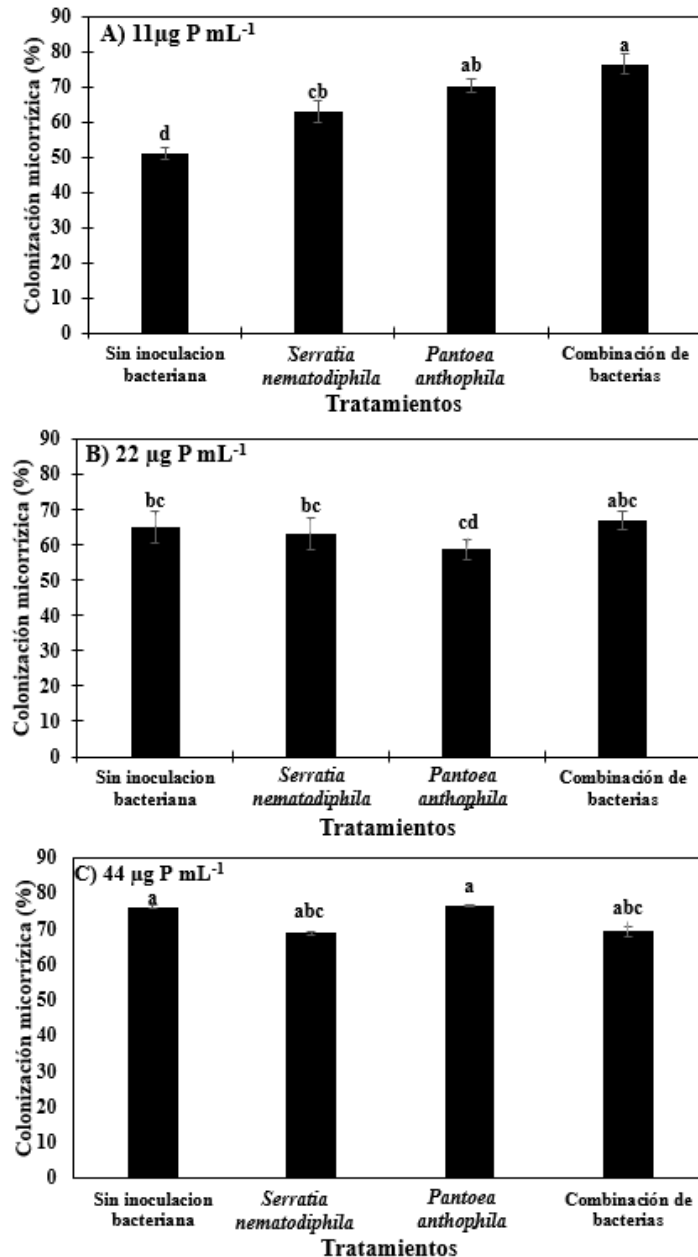


Figura 21. Colonización micorrízica en raíces de plantas de lechuga (*Latuca sativa* L.) variedad Parrish, inoculadas con dos bacterias aisladas de abejas sin aguijón, un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), y la aplicación de tres dosis de fósforo (11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), después de 35 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Letras diferentes sobre las barras en las tres gráficas, son significativamente diferentes entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$). Medias \pm error estándar, n=8.

Uno de los parámetros más importantes a considerar partir del uso de microorganismos como biofertilizantes o mejoradores del crecimiento vegetal es la medición de la eficiencia fotoquímica del PSII es una técnica no invasiva, que detecta cambios fisiológicos en las plantas que se atribuyen a diferentes efectos de estrés, que se reflejan en la funcionalidad del PSII (Zhang *et al.*, 2014). Los parámetros F_o , F_m , F_v , F_v/F_o , y F_v/F_m , miden el grado de severidad del problema que afecta a la planta (Zhu *et al.*, 2010); causado ya sea por factores bióticos o abióticos que dañan química o estructuralmente a las plantas, lo cual suele reflejarse en el estado fisiológico y nutrimental de las mismas debido al daño producido por la fluorescencia de la clorofila (Li *et al.*, 2012; Rattan *et al.*, 2012; Donnini *et al.*, 2013; De Faira *et al.*, 2013).

En la presente investigación en el primer bioensayo, se realizó la evaluación del efecto de la inoculación bacteriana sobre la eficiencia fotosintética de las plantas, los valores más sobresalientes se obtuvieron en las plantas inoculadas en comparación con los controles sin inocular. Los microorganismos también pueden modificar la eficiencia fotosintética aún cuando las plantas no presentan limitación nutrimental en el suelo, por ejemplo, los valores de la eficiencia del PSII pueden aumentar o mantenerse por la actividad benéfica de microorganismos como bacterias promotoras del crecimiento (Angulo *et al.*, 2018). Por el contrario, debido al incremento acelerado del crecimiento vegetal provocado por la interacción microbiana, los nutrientes pueden disminuir rápidamente en el suelo provocando un déficit que se ve reflejado en deficiencias nutrimentales y cambios fisiológicos en las plantas (Elhindi *et al.*, 2017). Por lo anterior, en los resultados obtenidos en esta investigación no se observaron efectos negativos en la eficiencia fotosintética de las plantas de lechuga no inoculadas con microorganismos en comparación con aquellas que si fueron inoculadas, pareciendo no tener un efecto (positivo o negativo) en las plantas por la inoculación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal, sin embargo esto esto

también pudo deberse a una aplicación constante y homogénea de solución nutritiva en ambos tratamientos (con y sin inoculación con bacterias) denotando la aplicación adecuada de nutrientes para el crecimiento vegetal en las condiciones y tiempo del experimento.

Los valores obtenidos del índice de verdor fueron en general mayores, en las plantas con inoculación bacteriana en comparación con las plantas sin la inoculación de bacterias, lo cual se atribuye a los efectos benéficos de las bacterias en el crecimiento vegetal. Esto se debe parcialmente, a la capacidad de aumentar la absorción nutrimental de las plantas, lo cual se ve reflejado en un mayor índice en el crecimiento foliar y concentración de clorofila (Wu *et al.*, 2019). La fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato, son propiedades bioquímicas importantes que tienen efecto en la formación de la clorofila en las plantas, por lo que la inoculación con bacterias con estas propiedades, beneficia considerablemente las concentraciones de clorofila y capacidad fotosintética de las plantas (Panhwar *et al.*, 2011; García *et al.*, 2019).

Los valores de peso fresco, peso seco y área foliar de las plantas inoculadas mostraron resultados sinérgicos en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana. Como se explicó, los diferentes efectos ejercidos por los procesos metabólicos microbianos benefician la liberación y la absorción nutrimental por las plantas. Por lo anterior, la germinación y crecimiento vegetal se ve afectado benéficamente con inoculación microbiana, en comparación con las plantas sin inoculación microbiana (Blanco *et al.*, 2018; Latef *et al.*, 2020).

Los microorganismos benéficos para las plantas provocan cambios fisiológicos y estructurales en las mismas a través de mecanismos moleculares como la producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), la enzima ACC-desminasa, la actividad nitrogenasa, y la solubilización de fosfatos que provocan la elongación celular (Ahemad y Kibret, 2014); por lo tanto, el crecimiento de hojas, tallos y raíces, son beneficiados por el efecto de la inoculación microbiana

(Ahmed y Hasnain, 2014). En el caso de plantas de lechuga, se han reportado resultados sinérgicos (peso fresco, peso seco y área foliar) en su crecimiento cuando son inoculadas con bacterias (Vargas *et al.*, 2001). Algunas investigaciones han reportado estos efectos benéficos incluso en plantas sometidas a condiciones de estrés hídrico o de contaminación (Khalid *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2020).

Para el segundo bioensayo realizado en la presente investigación, la inoculación bacteriana de *P. antophila* y *S. nematodiphila* afectó de forma benéfica el crecimiento de las plantas inoculadas con los microorganismos. Las bacterias son capaces de aumentar la absorción nutrimental como el P y N, los cuales son componentes importantes en las concentraciones de clorofila en las plantas (Wu *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2021), por lo que el índice de verdor de las plantas fue mejorado.

Por otra parte, el peso fresco, peso seco y área foliar, fueron beneficiados sinérgicamente por las bacterias y por los HMA, en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana. La inoculación bacteriana cuenta con mecanismos que promueven la absorción nutrimental y aumentan el crecimiento y tamaño de las plantas (Castillo *et al.*, 2017; Ren *et al.*, 2019), y además, mejoran las condiciones hormonales de las plantas, lo que produce cambios estructurales en la misma (Kudoyarova *et al.*, 2017). Por su parte, la inoculación de HMA en general, no mostró diferencias significativas en comparación con las plantas sin inoculación, pero favoreció el peso seco de las plantas, lo que se debe a la capacidad de este tipo de hongos para aumentar el crecimiento vegetal (Carballar *et al.*, 2018) al mejorar la toma de nutrientes y agua (Bañuelos *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020). Al igual que las bacterias, los HMA cuentan con mecanismos que benefician el crecimiento de las plantas, como el aumento de la producción de fitohormonas como el ácido jasmónico, el ácido salicílico, así como AIA, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido

abscísico, entre otros (Ferlian *et al.*, 2018), y estas fitohormonas suelen incrementar cuando las plantas micorrizadas se encuentran en condiciones de estrés (Medina, 2016; Quiroga *et al.*, 2020).

Por otro lado, el número de estomas y la colonización micorrízica mostraron diferencias significativas en las plantas con la aplicación a $11 \mu\text{g P mL}^{-1}$ en comparación con las plantas sin inoculación bacteriana ni micorrízica, y con las otras dos dosis de fertilización. La colonización micorrízica beneficia la estabilidad de la membrana celular y liberación de electrólitos por las hojas a través de la producción de fitohormonas, por lo que se beneficia la resistencia a sequía (Santander *et al.*, 2017; Santander *et al.*, 2019; Quiroga *et al.*, 2020). Este proceso se realiza a través de la liberación de agua por los estomas, los cuales están influenciados por fitohormonas como el ácido abscísico el cual aumenta significativamente cuando la planta es colonizada por HMA los cuales estimulan el aumento del número de estomas y la resistencia a sequía de las plantas (Ouledali *et al.*, 2019).

Por su parte, la aplicación de diferentes dosis de P en las plantas, mostró diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. En general, se observó mejor aprovechamiento con la dosis $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$. Se ha demostrado que las concentraciones de P influyen directamente en el crecimiento de las plantas, por lo que este elemento puede favorecer el crecimiento vegetal o provocar problemas por toxicidad (Bañuelos *et al.*, 2017; AL-Mharib *et al.*, 2019). La fertilización adecuada con P, puede aumentar el rendimiento del grano y la biomasa vegetal (Li *et al.*, 2020). Por el contrario, la deficiencia de este elemento puede alterar procesos metabólicos y causar la acumulación de metabolitos como por ejemplo: citrato, isocitrato, 1-5-oxoprolina, succinato e histamina, las cuales están relacionadas como respuesta de la planta a cambios en el ambiente que provocan periodos de estrés en la misma, así mismo, pueden ser usados como marcadores moleculares para detectar de forma directa, las deficiencias de P en las plantas (Gao *et al.*, 2020).

En el caso del efecto de la aplicación de P y de las bacterias en plantas de lechuga resultó en aumentos significativos en las variables evaluadas. Al respecto, la combinación de bacterias solubilizadoras de fosfato y la aplicación de fuentes de fósforo inorgánico puede aumentar el crecimiento foliar de las plantas y las concentraciones de clorofila (Wu *et al.*, 2019). Por su parte, la aplicación combinada de bacterias puede aumentar sinérgicamente el contenido de clorofila en comparación con su inoculación individual (Neelipally *et al.*, 2020). Este efecto microbiano puede presentarse entre microorganismos de la misma especie, e incluso si se inocula de manera conjunta con bacterias y HMA (García *et al.*, 2019).

Los mejores efectos en el crecimiento vegetal se obtuvieron al inocular de forma combinada, bacterias y HMA, lo cual se atribuye a sus propiedades para aprovechar la aplicación de P (Velásquez *et al.*, 2017; Harikumar, 2017). Los HMA y las bacterias solubilizadoras de P presentan relaciones específicas, que en conjunto, aumentan el aprovechamiento del P, ya sea por la secreción de fosfatasas o bien, por la liberación de ácidos orgánicos a partir de sales poco solubles (Ordoñez *et al.*, 2016; Battini *et al.*, 2017).

Por su parte, los HMA son capaces de aprovechar la liberación controlada de sustancias orgánicas por las hifas, contribuyendo en la proliferación de bacterias alrededor de éstas, y con ello promover de forma directa, la liberación de ácidos orgánicos o fosfatasas para la mineralización de P, y con ello, favorecer la translocación de este nutriente hacia la planta (Zhang *et al.*, 2016). El movimiento de P a través del hongo hacia la planta, aún no está establecido; sin embargo, algunos trabajos de laboratorio reportan relaciones aún más específicas, a través de las cuales las plantas micorrizadas son beneficiadas (Ezawa y Saito, 2018).

En esta investigación se probaron dos tipos de inoculación bacteriana, tanto en hojas como en raíz, lo que produjo beneficios en el crecimiento vegetal. Al respecto, las comunidades bacterianas

se encuentran en diferentes partes de una planta, ya sea en forma externa (epífita) o interna (endófita) (Pfeilmeier *et al.*, 2016). En la filósfera existe un conjunto de relaciones microbianas que crecen en ella, encontrándose bacterias patógenas que reducen el crecimiento de las plantas, o bien, microorganismos benéficos que protegen a la planta de diferentes enfermedades, ya que reducen el crecimiento de patógenos al competir por nutrientes y espacio, y liberando metabolitos o enzimas antimicrobianas (Legein *et al.*, 2020).

La promoción del crecimiento vegetal puede deberse a la producción de fitohormonas como el AIA, que también es producido por las bacterias en las hojas, o beneficiando principalmente el crecimiento de la raíz (Dubey *et al.*, 2017; Senthilkumar y Krishnamoorthy, 2017). Algunas investigaciones reportan el efecto benéfico de la producción de AIA por bacterias inoculadas en hojas y con influencia positiva sobre la colonización con rizobios en la raíz, observando por el contrario la disminución de la colonización por rizobios cuando las plantas fueron inoculadas en las hojas con bacterias genéticamente modificadas en las que se suprimieron genes que codifican la producción de AIA (Puente *et al.*, 2018).

Por su parte Fukami *et al.* (2017) probaron un proceso similar al inocular de forma foliar *Azospirillum brasilense* en plantas de maíz; a pesar de encontrar poca supervivencia de células bacterianas a las 24 h de su aplicación, se detectaron concentraciones significativas de diferentes metabolitos secundarios en diferentes áreas de las plantas, de los cuales destacan el ácido indol-3-acético, indol-3-etanol, ácido indol-3-láctico y ácido salicílico, así como genes relacionados con el estrés oxidativo (*APX1*, *APX2*, *CAT1*, *SOD2*, *SOD4*) y con la defensa vegetal (*PR1*, *prp2* y *prp4* relacionados con la patogénesis) demostrando así que la inoculación foliar favorece el crecimiento de las plantas en comparación con los testigos. La expresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo se detectaron en mayor proporción en hojas, y en menor cantidad en las raíces; por el

contrario, los genes relacionados con la patogenicidad se concentraron más en raíces en comparación con las hojas.

Por su parte, la tolerancia al estrés hídrico también es otro beneficio de la inoculación bacteriana en las hojas, esto se debe a la acumulación de fitohormonas, agua, azúcares totales, proteínas, prolina, y a la expresión de genes específicos relacionados con el estrés hídrico (*LEA*, *RAB16B*, *HSP70*, *SNAC1* y *bZIP23*) además de la acumulación de elementos como calcio (Ca) y potasio (K) (Devarajan *et al.*, 2021), los cuales están relacionados con la movilidad del agua en la planta (Wang *et al.*, 2018).

La bacteria *P. antophila* ha sido reportada por Egamberdieva, (2008) demostrando que su inoculación beneficia el crecimiento y la nutrición de las plantas, favoreciendo su supervivencia en condiciones salinas. Los datos concuerdan con los obtenidos en este trabajo debido a que las plantas de lechuga inoculadas con esta cepa también mostraron mejor respuesta en todas las variables. También algunas especies del género *Pantoea* sp. tienen propiedades benéficas para las plantas relacionadas con la inhibición de algunas bacterias y hongos fitopatógenos (Smits *et al.*, 2010), con la promoción de la deformación y crecimiento de pelos radicales (Verma *et al.*, 2018), con la producción de sideróforos (Campestre *et al.*, 2016), y con la solubilización de fosfato y zinc (Da Silva *et al.*, 2015).

Xie *et al.* (2017) reportan que *P. agglomerans* aumenta el crecimiento y el vigor de plantas de mora, y promueve la inhibición y la protección contra el tizón bacteriano. Por el contrario, existen reportes de la inoculación foliar de *P. agglomerans* y *P. anthophila*, que confirman que estas cepas causan la enfermedad del tizón del algodón, siendo el primer reporte que relaciona directamente a estas bacterias como agentes causales de dicha enfermedad (Tufail *et al.*, 2020). En contraste, la presente investigación muestra resultados significativamente diferentes, ya que en las plantas de

lechuga se obtuvieron efectos benéficos en la promoción del crecimiento, sin mostrar ningún síntoma de enfermedad.

Por otra parte, la cepa *Serratia nematodiphila*, tiene propiedades importantes para las plantas. Estudios recientes confirman la capacidad de esta cepa para promover el crecimiento vegetal a través de diferentes mecanismos como la producción de auxinas, la solubilización de P, y la fijación de nitrógeno (Asaf *et al.*, 2017). Por otra parte, también posee alto potencial para inhibir el crecimiento de diferentes fitopatógenos como *Fusarium* sp. y *Alternaria solani*, principalmente, lo cual se relaciona con la capacidad de producir celulasas o sideróforos (Dastager *et al.*, 2011; Mendez *et al.*, 2021).

Además, *S. nematodiphila* puede disminuir la toxicidad en plantas por elementos como el cadmio (Cd), ya que este elemento reduce significativamente el crecimiento y la concentración de pigmentos fotosintéticos (Chen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). Así mismo, esta especie bacteriana está relacionada con el aumento de la adaptación de las plantas, al aumentar o disminuir las concentraciones de algunas fitohormonas como por ejemplo el ácido jasmónico y ácido salicílico que promueven la adaptación a climas fríos (5 °C) y el crecimiento vegetal ante estas condiciones (Kang *et al.*, 2015).

La aplicación combinada de microorganismos promueve mejores efectos en las plantas en comparación con su inoculación individual (Blanco *et al.*, 2018). Algunos reportes comprobaron que la inoculación de *S. marcescens* en combinación con HMA en suelos contaminados con hidrocarburos, aumentaron la actividad antioxidante, la biomasa vegetal, y la degradación de hidrocarburos, y con ello contribuyeron al mejoramiento del suelo, en la reducción de contaminantes y en el aumento de poblaciones microbianas (Dong *et al.*, 2014). Por el contrario, algunos reportes confirman efectos negativos de la cepa *S. marcescens* causantes de la enfermedad

de vid amarilla en cucurbitáceas, la cual se transmite por la picadura de chinches infectadas, y que se disemina a través del floema (Bruton *et al.*, 2003).

En general, las bacterias aisladas de ASA mejoraron el crecimiento de plantas de lechuga en condiciones de invernadero. La combinación de bacterias y HMA indujeron efectos positivos en comparación con su inoculación individual. Más aun, la inoculación foliar de las bacterias mostró resultados iguales o mejores en comparación con su inoculación en raíz. También, las dosis de P aplicadas produjeron efectos benéficos en el crecimiento vegetal. A pesar de que las bacterias probadas no fueron aisladas de la rizósfera, éstas presentaron características que las hacen promisorias para su aplicación en invernadero.

9. CONCLUSIONES

La inoculación con bacterias aisladas de abejas sin aguijón produjo efectos benéficos en plantas de lechuga en invernadero, por lo que se demostró su efectividad biológica para uso como inoculante bacteriano.

En el primer bioensayo, la inoculación foliar de cepas bacterianas benefició el crecimiento de las plantas, mostrando resultados iguales o mayores en algunas ocasiones, en comparación con la inoculación de las mismas bacterias en la raíz de plantas de lechuga. Todas las bacterias promovieron el crecimiento de las plantas de lechuga en el primer bioensayo, en ambos tipos de inoculación, de las cuales destacan *P. anthophila* en inoculación foliar y *S. nematodiphila* en inoculación radical.

En el segundo bioensayo, la combinación de dos bacterias *P. anthophila* (T38) y *S. nematodiphila* (15) con HMA (*Claroideoglossum clarideum* y *Funneliformis mosseae*) resultó en

efectos benéficos en todas las variables, obteniendo resultados mayores en la aplicación de la fertilización con P a $22 \mu\text{g P mL}^{-1}$.

Las dosis de P aplicadas en el experimento beneficiaron el crecimiento vegetal y la efectividad de los microorganismos inoculados, en algunos tratamientos se refleja el efecto del aumento de P en las variables evaluadas. No se mostraron diferencias significativas en el efecto de la aplicación de HMA, por lo que las plantas inoculadas obtuvieron resultados similares en el crecimiento en comparación con las plantas sin la inoculación de HMA.

De acuerdo con los datos obtenidos en ambos experimentos, se aprueba la hipótesis general planteada en esta investigación, debido a que las bacterias aisladas de abejas sin aguijón en combinación con HMA y con fertilización fosfatada, mejoraron el crecimiento de las plantas de lechuga en condiciones de invernadero.

10. LITERATURA CITADA

- Acevedo F. E., L. J. Rivera., S. H. Chung., S. Ray, and G. W. Felton. 2015. Cues from chewing insects—the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*. 26: 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029>
- Acevedo, F. E., M. Peiffer., C. W. Tan., B. A. Stanley., A. Stanley., J. Wang, and G. Felton. 2017. Fall armyworm-associated gut bacteria modulate plant defense responses. *Molecular plant-microbe interactions*. 30 (2), 127-137. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-16-0240-R>
- Aguilera P., F. J., y A. U. Ferrufino. 2004. Cómo criar abejas melíferas sin aguijón. Asociación Ecológica del Oriente (ASEO), Unión Mundial para la Naturaleza (UICN). P. 140.

- Ahemad, M., and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26 (1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmed A., and S. Hasnain. 2014. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polis Journal of microbiology* 63:261–266
- Al-Ghamdi, A., A. A. Al-Abbadi., K. A. Khan., H. A. Ghramh., A. M. Ahmed, and M. J. Ansari. 2020. In vitro antagonistic potential of gut bacteria isolated from indigenous honey bee race of Saudi Arabia against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 825-833. doi.org/10.1080/00218839.2019.1706912
- Al-Ghamdi, A., S. A. Mohammed., M. J. Ansari, and N. Adgaba. 2019. Comparison of physicochemical properties and effects of heating regimes on stored *Apis mellifera* and *Apis florea* honey. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 845–848. <https://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.06.002>
- AL-Mharib, M. Z., A. M. Attalah, and A. B. Ali. 2019. Effect of adding humic acid and phosphate fertilizer levels on growth and yield of lettuce. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 12(4), 12-15. DOI: 10.9790/2380-1204011215
- Álvarez, S. J. M., F. Giampieri., A. Brenciani., L. Mazzoni., M. Gasparrini., A. M. González-Paramás, and S. Afrin. 2018. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polifloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. *LWT*, 87, pp.272-279. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.079>
- Angeles, N. J. G, y A. T. Cruz. 2015. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 929-942.

- Angulo-Castro. A., R. Ferrera-Cerrato., A. Alarcón., J. J. Almaraz-Suárez., J. Delgadillo-Martinez., M. Jiménez-Fernández, y O. García-Barradas. 2018. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema ii en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annuum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrícicos arbusculares. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(2), 178-188. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.011>
- Arias, J. P. 2019. Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. *Revista Digital Universitaria*, 20(1). DOI: <http://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a2>
- Asaf, S., M. A. Khan., A. L. Khan., M. Waqas., R. Shahzad., A. Y. Kim, and I. J. Lee. 2017. Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 31-38. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1274060>
- ASU. (2018). Abeja Bonanza Historia de las abejas melíferas. 18 de febrero del 2021, de Arizona State University Sitio web: <https://askabiologist.asu.edu/colonia-de-las-abejas>
- Ávalos G. A, y U. E. Perez. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*. 2(3): 119-145.
- Ayala R., V. H. González, and M. S. Engel. 2013. Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): diversity, distribution, and indigenous knowledge. In *Pot-Honey* (pp. 135-152). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_9
- Baldo J. H, and M. E. Clarck. 2008 *Wholbachia*, mastermanipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*. 6 (10). 741-751.

- Bañuelos, J., C. W. Sangabriel., M. E. Gavito., A. D. Trejo., S. Camara., O. R. Medel, and Y. A. Carreon. 2017. Effect of different phosphorus levels on avocado inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(7), 1509-1520.
- Baqueiro, C. S. 2020. Meliponinos de la reserva de la biósfera de los petenes y diversidad microbiana de *Scaptotrigona pectoralis* y *Frieseomelitta nigra*. (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados Campus Campeche, México.
- Baqueiro L, y G. Stamatti. 2007. Cria y manejo de abejas sin aguijón. Ediciones del subtrípico. Argentina. ISBN 978-987-23533-2-2 pp. 12-15.
- Barth, O. M., A. D. S. De Freitas, and B. Vanderborght. 2020. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 1005-1010. doi.org/10.1080/00218839.2020.1714863
- Battini F., M. Gronlund., M. Agnolucci., M. Giovannetti, and I. Jakobsen. 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Scientific Reports* 7: 4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>
- Bigurra, Q. U., V. R. Mendoza., T. V. Robledo, y J. J. R. Paredes. 2020. Cinética de crecimiento in vitro de *Brevibacillus brevis* en diferentes medios de cultivo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(2). <https://doi.org/10.19136/era.a7n2.2310>
- Blanco, E. L., Y. Castro., A. Olivo., R. Skwierinski, y F. M. Barrios. 2018. Germinación y crecimiento de plántulas de pimentón y lechuga inoculadas con rizobios e identificación molecular de las cepas. *Bioagro*, 30(3), 207-218.
- Boekhout. T. 2005. Gut feeling for yeasts. *Nature* 443:449-451. <https://doi.org/10.1038/434449a>

- Bonfante, P., and A. Genre. 2015. Arbuscular mycorrhizal dialogues: do you speak ‘plantish’ or ‘fungish’?. *Trends in plant science*, 20(3), 150-154.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.12.002>
- Bozzetta, J. L. R., J. Y. Q. Sotelo, Y. M. D. C. R. Canales, y M. Y. R. Canales. 2018. Aislamiento de microorganismos celulolíticos del intestino de *Kaloterms* SP “Termita” degradadores de extracto de chala y alfalfa. *Big bang faustiniano*, 6(2).
<https://doi.org/10.51431/bbf.v6i2.154>
- Brune, A., and M. Ohkuma. 2010. Role of the termite gut microbiota in symbiotic digestion. *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (Bignell DE, Roisin Y y Lo N, eds), pp. 439–475.
- Bruton, B. D., F. Mitchell., J. Fletcher., S. D. Pair., A. Wayadande., U. Melcher, and T. W. Popham. 2003. *Serratia marcescens*, a phloem-colonizing, squash bug-transmitted bacterium: causal agent of cucurbit yellow vine disease. *Plant Disease*, 87(8), 937-944.
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.937>
- Campestre, M. P., L. N. Castagno, M. J. Estrella, and O. A. Ruiz. 2016. *Lotus japonicus* plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe²⁺ bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *Journal Plant Physiology*, 192, 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.001>
- Cantúa A. J. A., O. A. Flores, y J. H. Valenzuela. 2019. Compuestos orgánicos volátiles de plantas inducidos por insectos: situación actual en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(3), 729-742. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.678>
- Carballar-Hernández. S., L. V. Hernández-Cuevas., M. N. Montaña., R. Ferrera-Cerrato, and A. Alarcón. 2018. Species composition of native arbuscular mycorrhizal fungal consortia

- influences growth and nutrition of poblano pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Applied Soil Ecology*, 130, 50-58. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.022>
- Cárdenas S. E., 1999. Diagnostico de virus mediante inclusiones virales, microscopía electronica y rango de hospedantes. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Mexico. ISBN 868-839-280-4
- Carreón A. Y., T. E. Jerónimo., M. D. L. Á. Beltrán., T. M. Martínez., A. D. Trejo, y M. E. Gavito. 2014. Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotro. *Revista Mexicana de Micología*, 37, 29-39.
- Castillo, A. C., R. Garruña., J. J. Zúñiga, and A. A. Guzmán. 2017. PGPR inoculation improves growth, nutrient uptake and physiological parameters of *Capsicum chinense* plants. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 86, 199-204.
- Cauich K., R. J. C. Ruiz Ruiz., E. Ortiz Vázquez, and C. M. R. Segura. 2015. Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432-1442. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>.
- Cerna Y, T., A. E. Salinas., y B. E. Soriano. 2018. Sinergismo entre *Azotobacter chroococcum* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Lactuca sativa* lechuga. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 519-526. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.04.07>
- Chapman R. F., S. J. Simpson, and A. E. Douglas. 2013. *The Insects: Structure and Function*, 5th edn. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 33-40. ISBN 0 521-57048 4
- Chávez N. J. C., R. C. Silva., E. H. Huamán, y C. M. Oliva. 2017. Aplicación de abonos orgánicos y biofertilizante en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.), distrito de

- Chachapoyas. *Revista de Investigación en Agroproducción Sustentable*, 1(1), 38-46.
<http://DOI:10.25127/aps.2017.348>
- Chen, L., S. Luo., X. Xiao., H. Guo., J. Chen., Y. Wan, and G. Zeng. 2010. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied soil ecology*, 46(3), 383-389.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.003>
- Chu Y. F., J. Sun., X. Wu., and R. H. Liu. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23): 6910–6916.
<https://doi.org/10.1021/jf020665f>
- Chung, S. H., E. D. Scully., M. Peiffer., S. M. Geib., C. Rosa., K. Hoover, and G. W. Felton. 2017. Host plant species determines symbiotic bacterial community mediating suppression of plant defenses. *Scientific reports*, 7, 39690. <http://org/doi.10.1038/srep39690>
- Claus, D., and R. Berkeley. 1984. Genus *Bacillus* Cohn 1872. *In*: Sneath, Mair, Sharpe y Holt (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams y Wilkin, Baltimore, USA. Vol. 2, p. 1104-1331.
- Colman D. R., E. C. Toolson, and V. C. D. Takacs. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol Ecol* 21: 5124–5137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05752.x>
- Conrath, U. 2011. Molecular aspects of defence priming. *Trends in plant science*, 16(10), 524-531.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.004>
- Corrales, L. C., D. M. A. Romero., J. A. B. Macías, y A. M. C. Vargas. 2015. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-82.

- Da Silva, J.F., R. R. Barbosa., A. N. de Souza., O. V. daMotta., G. N. Teixeira., V. S. Carvalho., A. L. deSouza, and F. G. A. deSouza. 2015. Isolation of *Pantoea ananatis* from sugarcane and characterization of its potential for plant growth promotion. *Genetics and Molecular Research*. 14 (4), 15301–15111. [http:// DOI](http://DOI) <http://dx.doi.org/10.4238/2015.November.30.6>
- Daniels, B. A., y H. D. Skipper. 1972. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. En. N. C. Schenck (Ed), *Methods and principles of mycorrhiza research*, American phytopathological Society, St. Paul, pp 29-35.
- Dastager, S. G., C. K. Deepa, and A. Pandey. 2011. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 259-265. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0454-z>
- De Faria, A. P., J. P. Lemos., L. V. Modolo, and M. G. C. França. 2013. Electrolyte leakage and chlorophyll a fluorescence among castor bean cultivars under induced water deficit. *Acta physiologiae plantarum*, 35(1), 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1054-3>
- De Moraes, C. A. R., B. P. Costa., M. C. Sampaio., M. M. Kashiwaqui., J. H. S. Caetano., V. F. Guimarães, and T. N. Alves. 2018. Production of Lettuce Seedlings with Association of Diazotrophic Bacteria and Humic Acids. *American Journal of Plant Sciences*, 9(5), 946-957. [http:// DOI: 10.4236/ajps.2018.95072](http://DOI:10.4236/ajps.2018.95072)
- Delory, B. M., P. Delaplace., M. L. Fauconnier, and P. D. Jardin. 2016. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions?. *Plant and Soil*, 402(1), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2823-3>
- Devarajan, A. K., G. Muthukrishanan., J. Truu., M. Truu., I. Ostonen., P. Panneerselvam, and S. K. Gopalasubramanian. 2021. The Foliar Application of Rice Phyllosphere Bacteria

- induces Drought-Stress Tolerance in *Oryza sativa* (L.). *Plants*, 10(2), 387.
<https://doi.org/10.3390/plants10020387>
- Devi, E. L., S. Kumar., T. B. Singh., S. K. Sharma., A. Beemrote., C. P. Devi, and S. H. Wani. 2017. Adaptation strategies and defence mechanisms of plants during environmental stress. In *Medicinal plants and environmental challenges* (pp. 359-413). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_20
- Dong, R., L. Gu., C. Guo., F. Xun, and J. Liu. 2014. Effect of PGPR *Serratia marcescens* BC-3 and AMF *Glomus intraradices* on phytoremediation of petroleum contaminated soil. *Ecotoxicology*, 23(4), 674-680. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1200-3>
- Donnini, S., L. Guidi., E. Degl'Innocenti, and G. Zocchi. 2013. Image changes in chlorophyll fluorescence of cucumber leaves in response to iron deficiency and resupply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(5), 734-742. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200479>
- Dubey, G., B. Kollah., U. Ahirwar., A. Mandal., J. K. Thakur., A. K. Patra, and S. R. Mohanty. 2017. Phylloplane bacteria of *Jatropha curcas*: diversity, metabolic characteristics, and growth-promoting attributes towards vigor of maize seedling. *Canadian journal of microbiology*, 63(10), 822-833. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0189>
- Duca, D., J. Lorv., C. L. Patten., D. Rose., and B. R. Glick. 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 85-125.
<https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
- Dussaubat, C., J. L. Brunet., M. Higes., J. K. Colbourne., J. Lopez., J. H. Choi., M. R. Martin., C. Botias., M. Cousin., C. McDonnell., M. Bonnet., L. P. Belzunces., R. F. Moritz., Y. L. Conte., and C. Alaux. 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema*

- ceranae in the honey bee *Apis mellifera*. PLoS One 7: e37017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037017>
- Egamberdieva, D. 2008 Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. Turkish Journal of Biology, 32(1):9–15
- Elhindi, K. M., A. S. El-Din, and A. M. Elgorban. 2017. The impact of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating salt-induced adverse effects in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Saudi journal of biological sciences, 24(1), 170-179.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.010>
- El-Nakhel, C., A. Pannico., M. C. Kyriacou., M. Giordano., S. De Pascale, and Y. Roupael. 2019. Macronutrient deprivation eustress elicits differential secondary metabolites in red and green-pigmented butterhead lettuce grown in a closed soilless system. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(15), 6962-6972. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9985>
- Elzeini, H. M., A. R. A. Ali., N. F. Nasr., Y. E. Elenany, and A. A. M. Hassan. 2020. Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. Journal of Apicultural Research, 1-9.
doi.org/10.1080/00218839.2020.1746019
- Engel, P., and N. A. Moran. 2013. The gut microbiota of insects diversity in structure and function. FEMS microbiology reviews, 37(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Engel, P., V. G. Martinson, and N. A. Moran. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 109: pp. 11002-11007. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202970109>
- Euán, J. J. G. Q. 2005. Biología y uso de las abejas sin aguijón de la península de Yucatán, México (Hymenoptera, Meliponini). UADY. (16). p. 17-22.

- Ezawa, T., and K. Saito. 2018. How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. *New Phytologist*, 220(4), 1116-1121. <https://doi.org/10.1111/nph.15187>
- FAO. (2020). Producción Anual de lechuga. 10 de febrero del 2021, de Food and Agriculture Organization of the United Nations Sitio web: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Feijoo, M. A. L. 2016. Microorganismos eficientes y sus beneficios para los agricultores. *Revista Científica Agroecosistemas*, 4(2), 31-40.
- Felton, G. W, S.H. Chung, M. G. E. Hernández, J. Louis, M. Peiffer and D. Tian. 2014. Herbivore oral secretions are the first line of protection against plant-induced defences. *Annual Plant Reviews* 47: 37–76. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0506>
- Ferlian, O., A. Biere, P. Bonfante, F. Buscot, N. Eisenhauer, and I. Fernandez. 2018. Growing research networks on mycorrhizae for mutual benefits. *Trends Plant Sci.* 23, 975–984.
- Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum*, 8(2), 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.08.008>
- Fukami, J., F. J. Ollero., M. Megías and M. Hungria. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Expr* 7, 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- Fukatsu, T., and T. Hosokawa. 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 389–396. [http://doi: 10.1128/AEM.68.1.389-396.2002](http://doi:10.1128/AEM.68.1.389-396.2002)

- Gálvez, Z. Y. A., y V. E. M. Burbano. 2015. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas, 12(21), 67-79. <https://doi.org/10.22490/24629448.997>
- Gao, H., H. Mao, and I. Ullah. 2020. Analysis of metabolomic changes in lettuce leaves under low nitrogen and phosphorus deficiencies stresses. Agriculture, 10(9), 406. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090406>
- García, C. L., S. Dattamudi., S. Chanda, and K. Jayachandran. 2019. Effect of salinity stress and microbial inoculations on glomalin production and plant growth parameters of snap bean (*Phaseolus vulgaris*). Agronomy, 9(9), 545. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090545>
- García, K., J. S. D. Doidy., D. Zimmermann., D. Wipf, and P. E. Courty. 2016. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. Trends in plant science, 11: 937-950. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.010>
- García, M. O., I. C. Barreto., Y. R. Rocafull., R. O. Gallego, y O. Martínez. 2016. Variación de la concentración de microorganismos en distintos suelos de cuba. Cruzamiento natural en el complejo de especies de *capsicum* en cuba. Natural crossing in the Capsicum complex in Cuba, 40(1), 2.
- García, R. A., N. C. Lovaisa, y E. L. Ulla. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fosfatos del Noroeste Argentino y su efecto en la promoción de crecimiento en maíz (*Zea mays* L.). Revista agronómica del noroeste argentino, 35(1), 13-28.
- Gastón, M. M. L., E. Fernández., M. C. Cardozo, y M. M. Collavino. 2017. Bacterias endofíticas aisladas de hojas y raíces de árboles de paraíso (*Melia azedarach*) con potencial actividad promotora del crecimiento vegetal. Agrotecnia, (25), 44.

- Genaro, J. A., y W. Lóriga. 2018. *Melipona beecheii* Bennett (Hymenoptera: Apidae): origen, estudios y meliponicultura en Cuba. *Insecta Mundi*. pp. 1-18.
- Gerdemann, J. W. and T. H. Ncolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogene species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, vol.46 pp. 235-244.
- Gutiérrez, C. A., J. H. Huerta., L. R. Hernández., y A. G. Franco. 2019. Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en lechuga (*Lactuca sativa* L.) bajo sistema aeropónico. *Revista Mexicana de Fitosanidad*, 3(1), 1-10. ISSN: 2448-9093
- Guzmán, C., C. Balboa., R. Vandame., M. L. Albores, y A. J. González. 2011. Manejo de las abejas nativas sin aguijón en México: *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*. El Colegio de la Frontera Sur. México. p. 15-23.
- Hammer T. J., and M. D. Bowers. 2015. Gut microbes may facilitate insect herbivory of chemically defended plants. *Oecologia* 179: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3327-1>
- Harikumar, V. S. 2017. Biometric parameters of field grown sesame influenced by arbuscular mycorrhizal inoculation, rock phosphate fertilization and irrigation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20(2).
- Heil, M., and W. G. Land. 2014. Danger signals damaged-self recognition across the tree of life. *Frontiers in Plant Science* 5: 578. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00578>
- Hewitt E. J. (1966) The composition of nutrient solution. In: *Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition*. E. J. Hewitt (ed). Commonwealth Agricultural Bureau, United Kingdom. pp: 187-246.
- Hidalgo, R. B., J. L. Romalde, y S. Prado. 2016. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. *Caracterización y patogénesis*. *Revista AquaTIC*, (36).

- Hongoh, Y. 2010. Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74: 1145–1151. <https://doi.org/10.1271/bbb.100094>
- Ismail, H., and B. Mirza. 2015. Evaluation of analgesic, antiinflammatory, anti-depressant and anti-coagulant properties of *Lactuca sativa* (CV. Grand Rapids) plant tissues and cell suspension in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1): 199. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0742-0>
- Ismail, H., E. Dilshad., M. T. Waheed, and B. Mirza. 2017. Transformation of lettuce with rol ABC genes: extracts show enhanced antioxidant, analgesic, antiinflammatory, antidepressant, and anticoagulant activities in rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(3): 1179– 1198. DOI 10.1007/s12010-016-2277-3
- Jung, S. C., M. A. Martinez., R. J. A. Lopez, and M. J. Pozo. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of chemical ecology*, 38(6), 651-664. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0134-6>
- Kang, S. M., A. L. Khan., M. Y. Y. Waqas., M. Hamayun., G. J. Joo, and I. H. Lee. 2015. Gibberellin-producing *Serratia nematodiphila* PEJ1011 ameliorates low temperature stress in *Capsicum annuum* L. *European Journal of Soil Biology*, 68, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2015.02.005>
- Kapheim, K. M., V. D. Rao., C. J. Yeoman., B. A. Wilson., B. A. White., N. Goldenfeld, and G. E. Robinson. 2015. Caste-specific differences in hindgut microbial communities of honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one*, 10(4), e0123911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123911>
- Kaygusuz, H., F. Tezcan., F. B. Erim., O. Yildiz., H. Sahin., Z. Can, and S. Kolayli. 2016. Characterization of Anatolian honeys based on minerbioactive components and principal

- component analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 273-279.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.005>
- Khalid, M., M. Bilal., D. Hassani., H. M. Iqbal., H. Wang, and D. Huang. 2017. Mitigation of salt stress in white clover (*Trifolium repens*) by *Azospirillum brasilense* and its inoculation effect. *Bot Stud* 58(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0160-8>
- Khan, K. A., A. A. Al-Ghamdi., H. A. Ghramh., M. J. Ansari., H. Ali., S. A. Alamri, and M. Hafeez. 2020. Structural diversity and functional variability of gut microbial communities associated with honey bees. *Microbial pathogenesis*, 138, 103793.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103793>
- Khan, S., D. Somerville., M. Frese, and M. Nayudu. 2020. Environmental gut bacteria in European honey bees (*Apis mellifera*) from Australia and their relationship to the chalkbrood disease. *Plos one*, 15(8), e0238252.doi.org/10.1371/journal.pone.0238252
- Khiyami. M., and E. Alyamani. 2008. Aerobic and facultative anaerobic bacteria from gut of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *African Journal of Biotechnology* 7 (10): 1432-1437. ISSN 1684–5315
- Kikuchi Y y I. Yumoto. 2013. Efficient colonization of the environmentally transmitted Burkholderia symbiont in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Appl Environ Microbiol*, Epub ahead of print. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>
- Kikuchi, Y., T. Hosokawa, and T. Fukatsu. 2011. Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4075–4081. [http://doi: 10.1128/AEM.00358-11](http://doi:10.1128/AEM.00358-11)
- Kim, M. J., Y. Moon., J. C. Tou., B. Mou, and N. L. Waterland. 2016. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.03.004>

- Koch, H., and P. H. Schmid-. 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19288-19292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110474108>
- Koch, H., D. P. Abrol., J. Li, and H. P. Schmid. 2013. Diversity and evolutionary patterns of bacterial gut associates of corbiculate bees. *Molecular Ecology*, 22: 2028–2044. <https://doi.org/10.1111/mec.12209>
- Kolsch, E. G., and B. V. Pedersen. 2010. Can the tight co-speciation between reed beetles (Col., Chrysomelidae, Donaciinae) and their bacterial endosymbionts, which provide cocoon material, clarify the deeper phylogeny of the hosts? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.10.038>
- Krishnan, M., C. Bharathiraja., J. Pandiarajan., V. A. Prasanna., J. Rajendhran, and J. Gunasekaran. 2014. Insect gut microbiome—An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S16-S21. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C95>
- Kudoyarova, G. R., L. B. Vysotskaya., T. N. Arkhipova., L. Y. Kuzmina., N. F. Galimsyanova., L. V. Sidorova, and S. Y. Veselov. 2017. Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta physiologiae plantarum*, 39(11), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9>
- Lamichhane, J. R., P. Debaeke., C. Steinberg., M. P. You., M. J. Barbetti, and J. N. Aubertot. 2018. Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. *Plant and soil*, 432(1), 1-28. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3780-9>

- Laredo, A. E. I., J. L. Martínez., A. Iliná., C. L. Guillen, and C. F. D. Hernández. 2017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(3), 673-683. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i3.40>
- Latef, A. A. H. A., M. F. A. Alhmad., M. Kordrostami., A. B. O. Baker, and A. Zakir. 2020. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1293-1306. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10065-9>
- Lee, S., and J. Lee. 2015. Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: Types and characteristics of hydroponic food production methods. *Scientia Horticulturae*, 195: 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.011>
- Legein, M., W. Smets., D. Vandenheuevel., T. Eilers., B. Muyshondt., E. Prinsen, and S. Lebeer. 2020. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>
- León, G. C. G., M. R. Guzmán, and A. M. D. Salas. 2018. Efecto de las plantas arvenses sobre la abundancia y diversidad de insectos del follaje. *Jóvenes en la ciencia*, 4(1), 66-70. ISSN 2395-9797.
- Li, X., N. Bu., Y. Li., L. Ma., S. Xin., and L. Zhang. 2012. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 213, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.052>
- Li, Z., F. Guo., T. J. Cornelis., Z. Song., X. Wang, y B. Delvaux. 2020. Combined silicon-phosphorus fertilization affects the biomass and phytolith stock of rice plants. *Frontiers in plant science*, 11, 11: 67. <http://doi10.3389/fpls.2020.00067>

- Llonín, D., y N. Medina. 2002. Nutrición mineral con N, P y K en la simbiosis hongos micorrizógenos-tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en ferralsols. Cultivos Tropicales, 23 (4). 83-88. ISSN: 0258-5936
- López, H. E. F. 2015. Apoideos de México: Generalidades. *Dugesiana*, 2(2), 29-44. <https://doi.org/10.32870/dugesiana.v2i2.3733>
- Mahmoudi, H., J. Huang., M. Y. Gruber., R. Kaddour., M. Lachaal., Z. Ouerghi, and A. Hannoufa. 2010. The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 5122-5130. <https://doi.org/10.1021/jf904274v>
- Mangmang, J. S., R. Deaker, and G. Rogers. 2016. Inoculation effect of *Azospirillum brasilense* on basil grown under aquaponics production system. *Organic agriculture*, 6(1), 65-74. <http://doi10.1007/s13165-015-0115-5>
- Mantilla, C. L., y R. C. A. Pineda. 2013. Bacterias celulolíticas aisladas del intestino de termitas (*Nasutitermes nigriceps*) con características probióticas y potencial en la degradación del pasto. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 8-16. ISSN: 0123-3475
- Martínez, M., M. F. Leonel, J. C. Espinoza, F. López, y D. Torrez. 2011. Abejas Maliponas. En *Meil de abejas Meliponas y Africanizadas. La culcumecca: INPRHU- SOMOTO*. p. 8-21.
- Martinson, V. G., B. N. Danforth., R. L. Minckley., O. Rueppell., Tingek, and N. A. Moran. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol* 20: 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>
- Martinson, V. G., J. Moy, and N. A. Moran. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honey bee worker. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2830-2840. <http://doi:10.1128/AEM.07810-11>

- Medina, G. L. R. 2016. La agricultura, la salinidad y los hongos micorrízicos arbusculares: una necesidad, un problema y una alternativa. *Cultivos tropicales*, 37(3), 42-49. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.1117.9765>
- Méndez, S. E. W., R. O. Gómez., R. C. Sánchez., J. R. Folch., V. V. M. Hernández., L. E. Villar, and V. A. Wong. 2021. *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Archives of Microbiology*, 203(2), 549-559. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>
- Menezes, C., G. C. Venturieri., N. A. Volleto., C. F. A. F. León, and F. V. L. Imperatriz. 2013. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. *Pot-Honey A legacy of stingless bees*, ed. Vit, Patricia., Roubik, David W., Pedro, Silvia R.M. Springer. New York, USA. 153-172. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_10
- Michener, C. D. 2013. The Meliponini. *Pot-Honey A legacy of stingless bees*, ed. Vit, Patricia., Roubik, David W., Pedro, Silvia R.M. Springer. New York, USA. 3-18. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_1
- Mohammad, A. 2013. Traditional use of kahu (*Lactuca scariola* L.) - a review. *Glob J Res Med Plants Indig Med* 2(6): 465– 474. ISSN 2277-4289.
- Mohammad, S. M., N. K. Mahmud, and N. Zawawi. 2020. Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. *Journal of Apicultural Research*, 60(1), 172-187. doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152
- Monroy, C. A., A. Z. T. Marin, and G. A. Giraldo. 2017. Efecto de diferentes cortes en lechuga Batavia (*Lactuca sativa* L). *Alimentos Hoy*, 25(40), 77-86.

- Morais, P. B., T. P. S. Sao., and C. A. Rosa. 2013. Microorganisms Associated with Stingless Bees. *Pot-Honey: A legacy of stingless bees*, ed. Vit, Patricia., Roubik, David W., Pedro, Silvia R.M. Springer. New York, USA. 173-186.
- Morales-Gumán, G., A. Alarcón., R. Ferrera-Cerrato., M. D. C. Rivera-Cruz., L. G. Torres-Bustillos, y M. Mendoza-López. 2020. Efecto de bacterias emulsificantes en la atenuación de la fitotoxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado. *Revista de Biología Tropical*, 68(2), 692-703. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v68i2.39327>
- Moran, N.A., A. K. Hansen., J. E. Powell., and Z. L. Sabree. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One* 7: 36393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393>
- Moreno, R. A., V. C. mendoza., R. carrillo., J. Luis., A. J. vásquez y P. R. Cano. 2018. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1): 68–83.
- Nates, P. G. 2005. Abejas corbiculadas de Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. p. 156. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Neelipally, R. T. K. R., A. O. Anoruo, and S. Nelson. 2020. Effect of Co-Inoculation of Bradyrhizobium and Trichoderma on Growth, Development, and Yield of *Arachis hypogaea* L. (Peanut). *Agronomy*, 10(9), 1415. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091415>
- Nikoh, N., T. Hosokawa., K. Oshima., M. Hattori, and T. Fukatsu. 2011. Reductive evolution of bacterial genome in insect gut environment. *Genome Biol Evol* 3: 702–714. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr064>

- Noguez, I. J. A., C. M. C. A. González., G. R. Carrillo., G. M. A. Martínez, y H. J. C. Mendoza. 2017. Caracterización de bacterias promotoras de crecimiento de plantas y su tolerancia a elementos potencialmente tóxicos. *Agroproductividad*, 10(4).
- Nweze, J. A., J. I. Okafor., E. I. Nweze, and J. E. Nweze. 2017. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: a comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. *BMC research notes*, 10(1), 566. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2884-2>
- Nyholm S. V., and J. Graf. 2012. Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 10: 815–827. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2894>
- Olanrewaju, O. S., B. R. Glick, and O. O. Babalola. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Oldroyd, G. E. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>
- Oliver, K. M., and A. J. Martinez. 2014. How resident microbes modulate ecologically important traits of insects. *Current Opinion in Insect Science* 4: 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.001>
- Ordoñez, Y. M., B. R. Fernandez., L. S. Lara., A. Rodriguez., V. D. Uribe, and I. R. Sanders. 2016. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. *PloS one*, 11(6), e0154438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154438>

- Ouledali, S., M. Ennajeh., A. Ferrandino., H. Khemira., A. Schubert, and F. Secchi. 2019. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on the control of stomata functioning by abscisic acid (ABA) in drought-stressed olive plants. *South African Journal of Botany*, 121, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.10.024>
- Panhwar, Q. A., O. Radziah., A. R. Zaharah., M. Sariah, and I. M. Razi. 2011. Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. *Journal of environmental biology*, 32(5), 607. ISSN 02548704.
- Perea, V. Y. S., G. R. Carrillo, y C. M. C. A. González. 2017. Fitorremediación asistida por microorganismos: énfasis en bacterias promotoras del crecimiento de plantas. *Agroproductividad*, 10(4). ISSUE 4, p.34-40.
- Pérez, U. M. R., Y. Zapata, y J. Córdoba. 2015. Efecto de la inoculación simple y combinada con Hongos Formadores de Micorriza Arbuscular (HFMA) y Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) en plántulas micropropagadas de mora (*Rubus glaucus* L.). *Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 16: 95-103.
- Pfeilmeier, S., D. L. Caly, and J. G. Malone. 2016. Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1298–1313. doi: 10.1111/mpp.12427 <https://doi.org/10.1111/mpp.12427>
- Pieterse, C. M., C. Zamioudis., R. L. Berendsen., D. M. Weller., S. C. V. Wees, and P. A. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52. pp. 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

- Pinto, R., L. Ludueña., S. Anzuay., T. Taurian, y J. Angelini. 2017. Cambio en la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares asociados a la planta del maní (*Arachis hypogaea* L.) Luego de la aplicación de Agroquímicos. *Agrotecnia*, (25), 9.
- Priya, N. G., A. Ojha., M. K. Kajla., A. Raj, and R. Rajagopal. 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PloS one*, 7(1), e30768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030768>
- Puente, M. L., J. L. Gualpa., G. A. López., R. M. Molina., S. M. Carletti., and F. D. Cassán. 2018. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. *Symbiosis*, 76(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>
- Quiroga, G., G. Erice., R. Aroca., A. M. Zamarreño., M. J. M. García, y L. J. M. Ruiz. 2020. Radial water transport in arbuscular mycorrhizal maize plants under drought stress conditions is affected by indole-acetic acid (IAA) application. *Journal of plant physiology*, 246, 153115. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153115>
- Ramirez-Gama R. M., G. Suzuki-Reyes, y M. C. Urzua-Hernández. 2020. Técnicas de cuantificación y aislamiento de microorganismos del suelo y la rizósfera: Bacterias, Hongos, Actinobacterias y otros grupos microbianos. En Ferrera-Cerrato, R., J. Delgadillo-Martinez, A. Alarcón., J. Alvarado-López., J. Pérez-Moreno., y J. J. Almaraz-suarez. 2020. (Primera edición) *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas, principios y tecnicas para su investigacion*. (pp. 14-15). Montecillo, Mexico: Colegio de postgraduados.
- Ramírez, P. J. 2018. ¿Cómo transportan polen las abejas?. 10 de febrero del 2021, de 2018 Sitio web: <https://www.abejasmiel.com/2017/03/05/como-transportan-las-abejas-el-polen/>

- Rattan, K. J., W. D. Taylor, and R. E. Smith. 2012. Nutrient status of phytoplankton across a trophic gradient in Lake Erie: evidence from new fluorescence methods. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences*, 69(1), 94-111. <https://doi.org/10.1139/f2011-135>
- Raymann, K., and N. A. Moran. 2018. The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current opinion in insect science*, 26, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
- Ren, X. M., S. J. Guo., W. Tian., Y. Chen., H. Han., E. Chen, and Z. J. Chen. 2019. Effects of plant growth-promoting bacteria (PGPB) inoculation on the growth, antioxidant activity, Cu uptake, and bacterial community structure of rape (*Brassica napus* L.) grown in Cu-contaminated agricultural soil. *Frontiers in microbiology*, 10, 1455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01455>
- Rivero, J., J. Gamir., R. Aroca., M. J. Pozo, and V. Flors. 2015. Metabolic transition in mycorrhizal tomato roots. *Frontiers in Microbiology*, 6, 598. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00598>
- Robinson, C. J., P. Schloss., Y. Ramos., K. Raffa, and K. Handelsman. 2010. Robustness of the bacterial community in the cabbage white butterfly larval midgut. *Microbial ecology*, 59:199–211. DOI 10.1007/s00248-009-9595-8
- Robledo, D. A. O. 2017. Biopelículas fototróficas, ¿qué longitudes de onda lumínica favorecen su desarrollo y diversidad? Ejemplo de enseñanza de fundamentos de ecología microbiana desde una práctica sencilla de laboratorio escolar. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 14(3). <http://dx.doi.org/10.25267>
- Robles, G. M. A., A. J. Aguilar., L. M. Gutiérrez., F. F. Rodríguez., R. M. J. Morales., M. P. J. Guerrero, y S. C. L. Del-Toro. 2016. Identificación cualitativa de metabolitos secundarios

- y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri pittier*)/qualitative identification of secondary metabolites and cytotoxicity determination of tempisque extracts. *Biotecnia*, 18(3), 3-8. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v18i3.328>
- Rodríguez, M. A., L. C. Ladeira, and M. Arrobas. 2018. Azotobacter-enriched organic manures to increase nitrogen fixation and crop productivity. *European Journal of Agronomy*, 93, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.01.002>
- Romero, F. P., I. Beltrán., L. J. Mendoza., G. B. Estrada., and R. Bonilla. 2021. Phosphorus nutrition and growth of cotton plants inoculated with growth-promoting bacteria under low phosphate availability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.618425>
- Ruyter, S. C., S. Al-Babili., S. V. D. Krol, and H. Bouwmeester. 2013. The biology of strigolactones. *Trends in plant science*, 18(2), 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.10.003>
- Ryu, J. H., M. E. Ha, and W. J. Lee. 2010. Innate immunity and gutmicrobe mutualism in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* 34: 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.11.010>
- Salazar, J. D. G., R. Quiñones, y P. Jiménez. 2016. Aislamiento de Microorganismos del Tracto Digestivo de Larvas de Coleópteros y Lepidópteros Detritívoros y Evaluación, In Vitro, de su Efecto Antagónico en una Cepa de *Fusarium oxysporum*. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 5(1-2), 106-113. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2124>
- Salem, H., E. Kreutzer., S. Sudakaran, and M. Kaltenpoth. 2012. Actinobacterias essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environ Microbiol*, doi: 10.1111/1462-2920.12001. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12001>

- Sánchez, D., and R. Vandame. 2013. Stingless Bee Food Location Communication: From the Flowers to the Honey Pots. In: Pot-Honey. Springer, New York, NY. pp 187-199
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_12
- Sanda, N. B. 2016. Una forma de manipulación reproductiva y biología de *Wolbachia pipientis*. Revista de biología experimental, 4, 2. ISSN: 0373-5680
- Santander, C., M. Sanhueza., J. Olave., F. Borie., A. Valentine, and P. Cornejo. 2019. Arbuscular mycorrhizal colonization promotes the tolerance to salt stress in lettuce plants through an efficient modification of ionic balance. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 19(2), 321-331. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00032-z>
- Santander, C., R. Aroca., L. J. M. Ruiz., J. Olave., P. Cartes., F. Borie, and P. Cornejo. 2017. Arbuscular mycorrhiza effects on plant performance under osmotic stress. Mycorrhiza, 27(7), 639-657. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0784-x>
- Selosse, M. A., A. Bessis, and M. J. Pozo. 2014. Microbial priming of plant and animal immunity: symbionts as developmental signals. Trends in Microbiology, 22(11), 607-613.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.003>
- Senthilkumar, M., and R. Krishnamoorthy. 2017. Isolation and characterization of tomato leaf phyllosphere Methylobacterium and their effect on plant growth. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(11), 2121-2136.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas>
- Shapira, M. 2016. Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. Trends in ecology y evolution, 31(7), 539-549. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006>
- Sharon, G., D. Segal., J. M. Ringo., A. Hefetz., R. J. Zilber y E. Rosenberg. 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the

- National Academy of Sciences, 107(46), 20051- 20056.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009906107>
- Shikano, I., Q. Pan., K. Hoover., and G. W. Felton. 2018. Herbivore-induced defenses in tomato plants enhance the lethality of the entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Journal of chemical ecology*, 44(10), 947-956. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0987-4>
- Shittu, H. O., E. aisagbonhi, and O. H. Obiazikwor. 2019. Plants'innate defence mechanisms against phytopathogens. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 314-319. <http://doi10.15414/jmbfs.2019.9.2.314-319>
- SIAP. (2020). Producción Mensual Agrícola. 10 de febrero del 2021, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Sitio web: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- Smits, T. H., F. Rezzonico., C. Pelludat., A. Goesmann., J. E. Frey, and B. Duffy. 2010. Genomic and phenotypic characterization of a nonpigmented variant of *Pantoea vagans* biocontrol strain C9-1 lacking the 530-kb megaplasmid pPag3. *FEMS Microbiology Letters*, 308(1), 48-54. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01994.x>
- Stecher, B., and W. D. Hardt. 2011. Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current opinion in microbiology*, 14(1), 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.003>
- Stoll, A., V. Olalde, y J. Bravo. 2018. Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal andinas sobre el crecimiento de plántulas de lechuga bajo condiciones industriales. *Biotecnología y Sustentabilidad*, 1(1).
- Subovsky, M. J., A. E.Castillo., Á. S. López, y N. Cano. 2016. Importancia de la calidad de la miel. *Agrotecnia*, (9), 25-28. <http://dx.doi.org/10.30972/agr.09470>

- Sugio, A., G. Dubreuil., D. Giron, and J. C. Simon. 2014. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *Journal of experimental botany*, 66(2), 467-478. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru435>
- Syed, Y. S. N., F. Huyop., R. I. R. Kamarulzaman, and R. A. Wahab. 2018. Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 395-405. doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047
- Taha, E. K. A., S. Al-Kahtani, and R. Taha. 2020. Comparison of the physicochemical characteristics of sidr (*Ziziphus* spp.) honey produced by *Apis florea* F. and *Apis mellifera* L. *Journal of Apicultural Research*, 1-8. doi.org/10.1080/00218839.2020.1746036
- Tarpy, D. R., H. R. Mattila, and I. L. Newton. 2015. Development of the honey bee gut microbiome throughout the queen-rearing process. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3182-3191. [http://10.0.4.104/AEM.00307-15](http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00307-15)
- Terrestre, M., C. C. Almirón., V. Felipe., N. Mielnichuk., M. I. Bianco., A. A. Vojnov, y P. M. Yaryura. 2017. Aislamiento y selección de bacterias con potencial biocontrol y promoción del crecimiento vegetal en cultivos hortícolas. *Agrotecnia*, (25), 38.
- Trinidad, C. J. R., E. G. Rincón., A. E. E. Quiñones., L. A. P. Arce, y L. N. E. Leyva. 2019. Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(2), 304-317. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-1>
- Tsuzuki, S., Y. Handa., N. Takeda, and M. Kawaguchi. 2016. Strigolactone-induced putative secreted protein 1 is required for the establishment of symbiosis by the arbuscular

- mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(4), 277-286. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-15-0234-R>
- Tufail, M. R., A. Fayyaz., S. Sarfraz., M. Waqas., M. Z. Ahmad., A. Hameed, and A. Abbas. 2020. First Report of *Pantoea* Leaf Blight of Cotton Caused by *Pantoea* spp. in Punjab, Pakistan. *Plant Disease*, 104(5), 1534-1534
- Tugizimana, F., M. I. Mhlongo., L. A. Piater, and I. A. Dubery. 2018 Metabolomics in plant priming research: the way forward? *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1759. <https://doi.org/10.3390/ijms19061759>
- Tyc, O., C. Song., J. S. Dickschat., M. Vos, and P. Garbeva. 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in microbiology*, 25(4), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
- Vamosi, J., T. Knight., J. Steets., S. Mazer., M. Burd, and T. Ashman. 2006. Pollination decays in biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 956-961 <https://doi.org/10.1073/pnas.0507165103>
- Vargas, P. D., Cerrato, R. F., Suárez, J. A., y González, G. A. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana*, 19(4), 327-335. E-ISSN: 2395-8030
- Velázquez, M. S., M. N. Cabello., L. A. Elíades., M. L. Russo., N. Allegrucci, and S. Schalamuk. 2017. Combination of phosphorus solubilizing and mobilizing fungi with phosphate rocks and volcanic materials to promote plant growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Revista Argentina de microbiología*, 49(4), 347-355. <http://doi10.1016/j.ram.2016.07.005>
- Venturi, V., and C. Keel. 2016. Signaling in the rhizosphere. *Trends in plant science*, 21(3), 187-198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>

- Verma, S. K., K. Kingsley., M. Bergen., C. English., M. Elmore., N. R. Kharwar, and J. F. White. 2018. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. *Plant Soil* 422, 223–238. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3339-1>
- Villanueva, G. R., D. Roubik, and U. W. Colli. 2005. Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatan peninsula. *Bee World*, 86(2):35–41. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11099651>
- Vivaldo, G., E. Masi., C. Taiti., G. Caldarelli, and S. Mancuso. 2017. The network of plants volatile organic compounds. *Scientific Reports*. 7:1-18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10975-x>
- Wang, J., M. Yang., Y. Song., F. E. Acevedo., K. Hoover., R. Zeng, and G. W. Felton. 2018. Gut-Associated Bacteria of *Helicoverpa zea* Indirectly Trigger Plant Defenses in Maize. *Journal of chemical ecology*, 44, 690-699. <https://doi.org/10.1007/s10886-018-0970-0>
- Wang, X., L. Hao., B. Zhu, and Z. Jiang. 2018. Plant calcium signaling in response to potassium deficiency. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3456. <https://doi.org/10.3390/ijms19113456>
- Wang, Y., S. Luo., J. Chen., X. Xiao., L. Chen., Y. Zeng, and Y. He. 2012. Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chemosphere*, 89(6), 743-750. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.005>
- Wielkopolan, B., and S. A. Obrepalska. 2016. Three way interaction among plants, bacteria, and coleopteran insects. *Planta*, 244, 313-332. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2543-1>

- Wier, A. M., S. V. Nyholm, and M. J. Mandel. 2010. Transcriptional patterns in both host and bacterium underlie a daily rhythm of anatomical and metabolic change in a beneficial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2259-2264. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909712107>
- Wu, F., J. Li., Y. Chen., L. Zhang., Y. Zhang., S. Wang, and J. Liang. 2019. Effects of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Growth, Photosynthesis, and Nutrient Uptake of *Camellia oleifera* Abel. *Forests*, 10(4), 348. <https://doi.org/10.3390/f10040348>
- Xie, J., P. Shu., G. Strobel., J. Chen., J. Wei., Z. Xiang., and Z. Zhou. 2017. *Pantoea agglomerans* SWg2 colonizes mulberry tissues, promotes disease protection and seedling growth. *Biological Control*, 113, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.010>
- Xu, J. C., L. M. Huang., C. Chen., J. Wang, and X. X. Long. 2019. Effective lead immobilization by phosphate rock solubilization mediated by phosphate rock amendment and phosphate solubilizing bacteria. *Chemosphere*, 237, 124540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124540>
- Yadav, A. N., P. Verma., B. Singh., V. S. Chauhan., A. Suman, and A. K. Saxena. 2017. Plant growth promoting bacteria: biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. *Adv Biotechnol Microbiol*, 5(5), 1-16.
- Yang, Q., S. Ravnskov, and M. A. Neumann. 2020. Nutrient uptake and growth of potato: Arbuscular mycorrhiza symbiosis interacts with quality and quantity of amended biochars. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 183(2), 220-232. <https://doi.org/10.1002/jpln.201900205>
- Younus, I., H. Ismail., C. B. Rizvi., E. Dilshad., K. Saba., B. Mirza, and K. Tahir. 2019. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of in vitro and field-grown Iceberg

- lettuce extracts. *Journal of Pharmacy y Pharmacognosy Research*, 7(5), 343-355. ISSN 0719-4250
- Yurrita, C. L., H. M. A. Ortega, and R. Ayala. 2017. Distributional analysis of *Melipona* stingless bees (Apidae: Meliponini) in Central America and Mexico: setting baseline information for their conservation. *Apidologie*, 48(2), 247-258.
- Zamudio, F., and N. Hilgert. 2012. Descriptive attributes used in the characterization of stingless bees (Apidae: Meliponini) in rural populations of the Atlantic forest (Misiones-Argentina). *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 8(1), 1-11. P. 8-9. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-8-9>
- Zhang, L., M. Xu., Y. Liu., F. Zhang., A. Hodge, and G. Feng. 2016. Carbon and phosphorus exchange may enable cooperation between an arbuscular mycorrhizal fungus and a phosphate-solubilizing bacterium. *New Phytologist*, 210(3), 1022-1032. <https://doi.org/10.1111/nph.13838>
- Zhang, M., S. Tang., X. Huang., F. Zhang., Y. Pang., Q. Huang, and Q. Yi. 2014. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 107, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.05.005>
- Zheng, H. S., I. L. Margaret., P. M. Sea., V. S. Erick., and N. A. Moran. 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47(11), 317-325. <https://doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x>
- Zhu, X. C., F. B. Song., and H. W. Xu. 2010. Arbuscular mycorrhizae improves low temperature stress in maize via alterations in host water status and photosynthesis. *Plant and Soil*, 331(1), 129-137. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0239-z>

Zuñiga, A. Z. 2017. Diversidad de Hongos Asociados a Insectos en Primavera y verano en Charco Azul, Xichú, parte de la Sierra Gorda de Guanajuato. Jóvenes Investigadores, 3(1), pp. 192-195.
<http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3412>

APÉNDICE

ANEXO 1

**Cuadro A-01. Preparación de solución Long Ashton modificada
(Modificada para aplicar 11, 22 y 44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$)**

Reactivo	Stock g L⁻¹	mL L⁻¹
KNO ₃	80 g	5 mL
MgSO ₄	73.6 g	5 mL
Ca(NO ₃) ₂	188.8 g	5 mL
		1.34 mL (11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$)
NaH ₂ PO ₄	36.8 g	2.68 mL (22 $\mu\text{g P mL}^{-1}$)
		5.36 mL (44 $\mu\text{g P mL}^{-1}$)
Micronutrientes		
MnSO ₄	1.6 g	
CuSO ₄	0.25 g	
ZnSO ₄	0.2 g	
H ₃ BO ₃	3.1 g	1 mL
NaCl	5 g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.088 g	
Citrato Férrico		
FeC ₆ H ₅ O ₇	4 g	
H ₃ C ₆ H ₅ O ₇	4 g	5 mL
Ajustar pH a 5.8		

ANEXO 2.

Cuadro A-02. Efecto de la aplicación de abejas aisladas de meliponidos, hongos micorrízicos arbusculares y tres dosis de fertilización fosfatada en plantas de lechuga en condiciones de invernadero a los 35 días.

		Tratamientos	Peso fresco foliar (g)	Peso seco foliar (mg)	Peso seco radical (mg)	Peso seco total (mg)	SPAD (Unidades)	Área Foliar (cm ²)	Colonización micorrízica (%)
11 µg P mL ⁻¹	Sin HMA	Sin inoculación bacteriana	1.2 g ± 0.12	0.07 g ± 0.007	0.03 ef ± 0.003	0.11 e ± 0.006	22.1 e ± 0.8	32.35 e ± 3.1	0 ± 0
		<i>S. nematodiphila</i>	4.6 bcd ± 0.14	0.22 ef ± 0.007	0.04 bcde ± 0.003	0.27 d ± 0.009	28.3 abcd ± 1	112.54 c ± 4.5	0 ± 0
		<i>P. anthophila</i>	4.2 de ± 0.22	0.22 def ± 0.006	0.04 bcde ± 0.002	0.27 d ± 0.007	28.3 bcd ± 1	104.66 cd ± 5.1	0 ± 0
		Combinación de bacterias	4.8 bcd ± 0.29	0.25 cde ± 0.01	0.06 ab ± 0.003	0.31cd ± 0.006	29.4 abcd ± 1	133.46 abc ± 8.1	0 ± 0
	Con HMA	Inoculación individual de HMA	2.2 fg ± 0.18	0.11 g ± 0.01	0.03 def ± 0.004	0.14 e ± 0.01	25 cde ± 1	57.85 e ± 3.6	51 d ± 1.8
		<i>S. nematodiphila</i>	5 bcd ± 0.35	0.25 cde ± 0.02	0.05 bcde ± 0.003	0.31cd ± 0.002	30 abcd ± 1.3	128.41 abc ± 8.5	62.8 cd ± 3.2
		<i>P. anthophila</i>	5.7 abcd ± 0.38	0.25 cde ± 0.01	0.05 abc ± 0.002	0.31cd ± 0.008	29.7 abcd ± 0.8	137.51 abc ± 8.1	70.2 ab ± 1.8
		Combinación de bacterias	4.7 bcd ± 0.47	0.25 cde ± 0.01	0.05 bcd ± 0.002	0.32 cd ± 0.01	29.9 abcd ± 1.8	113.76 c ± 9.4	76.3 a ± 2.8
22 µg P mL ⁻¹	Sin HMA	Sin inoculación bacteriana	4.3 cde ± 0.26	0.27bcde ± 0.01	0.05 bcde ± 0.002	0.32bcd ± 0.01	29.1 abcd ± 0.9	98.76 cd ± 6.2	0 ± 0
		<i>S. nematodiphila</i>	6.6 a ± 0.33	0.44 a ± 0.02	0.07 a ± 0.005	0.51 a ± 0.01	34.1 a ± 0.6	155.59 ab ± 7.1	0 ± 0
		<i>P. anthophila</i>	4.7 bcd ± 0.31	0.23 de ± 0.008	0.04 bcde ± 0.002	0.28 d ± 0.01	31.7 abc ± 1.1	103.5 cd ± 4.1	0 ± 0
		Combinación de bacterias	6.2 ab ± 0.51	0.31bcde ± 0.02	0.05 abc ± 0.002	0.36bcd ± 0.02	32.5 abc ± 0.5	135.81 abc ± 10	0 ± 0
	Con HMA	Inoculación individual de HMA	4.5 dc ± 0.31	0.24 de ± 0.01	0.05 bcde ± 0.001	0.29 d ± 0.01	28.3 abcd ± 1.1	107.78 c ± 6.8	65.1 bc ± 4.3
		<i>S. nematodiphila</i>	5.8 abc ± 0.37	0.31bcde ± 0.02	0.06 ab ± 0.004	0.36bcd ± 0.02	30.4 abcd ± 1.2	136.11 abc ± 8.6	63.1 bc ± 4.6
		<i>P. anthophila</i>	5.7 abcd ± 0.36	0.31bcde ± 0.02	0.06 ab ± 0.004	0.36bcd ± 0.02	32.1 abc ± 0.7	132.49 abc ± 7.7	58.7 cd ± 2.8
		Combinación de bacterias + HMA	5.6 abcd ± 0.27	0.37 ab ± 0.02	0.06 ab ± 0.002	0.43 ab ± 0.02	31.6 abc ± 0.8	129.3 abc ± 6.8	67 abc ± 2.6

44 µg P mL ⁻¹	Sin HMA	Sin inoculación bacteriana	2.8 ef ± 0.16	0.13 fg ± 0.009	0.02 f ± 0.001	0.15 e ± 0.01	27.75 cde ± 0.9	66.68 de ± 5.2	0 ± 0
		<i>S. nematodiphila</i>	5.2 abcd ± 0.26	0.26 cde ± 0.01	0.04 bcde ± 0.002	0.31 cd ± 0.02	32.2 abc ± 0.6	133.53 abc ± 7	0 ± 0
		<i>P. anthophila</i>	5.2 abcd ± 0.09	0.26 cde ± 0.01	0.04 bcde ± 0.002	0.31cd±0.009	33.7 ab ± 1.1	132.04 abc ± 2.6	0 ± 0
		Combinación de bacterias	6.6 a ± 0.21	0.34 abc ± 0.01	0.05 ab ± 0.002	0.41 bc ± 0.01	33.6 ab ± 0.5	157.04 a ± 6.7	0 ± 0
	Con HMA	Inoculación individual de HMA	4.2 cde ± 0.26	0.31bcde±0.01	0.03 cdef ± 0.002	0.35bcd±0.01	27.3 cde ± 1.1	99 cd ± 5.6	76 a ± 2.5
		<i>S. nematodiphila</i>	5.1 abcd ± 0.36	0.33 bcd ± 0.02	0.04 bcde ± 0.003	0.37bcd±0.01	32.8 abc ± 1.2	116.63 bc ± 9.5	68.7 abc ± 1
		<i>P. anthophila</i>	5.1 bcd ± 0.24	0.28bcde±0.01	0.04 bcde ± 0.003	0.33bcd±0.02	29.8 abcd ± 0.7	110.86 c ± 4.8	76.2 a ± 2.3
		Combinación de bacterias + HMA	5.2 abcd ± 0.31	0.28bcde±0.02	0.04 bcde ± 0.002	0.33bcd±0.02	29.2 abcd ± 0.8	127.94 abc ± 7.8	69.1 abc ± 1.5
		Sig.	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
		C V.	17.72	21.26	22.36	18.66	10.52	18.64	16.91
DSM	1.5	0.1	0.02	0.1	5.8	39.7	10.4		

Medias ± error estándar. Letras idénticas en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). n= 192. Sig= Significancia. C.V.=Coeficiente de variación. DSM= Diferencia significativa mínima. S= *Serratia*. P=*Pantoea*. HMA=Hongos micorrízicos arbusculares.

ANEXO 3.

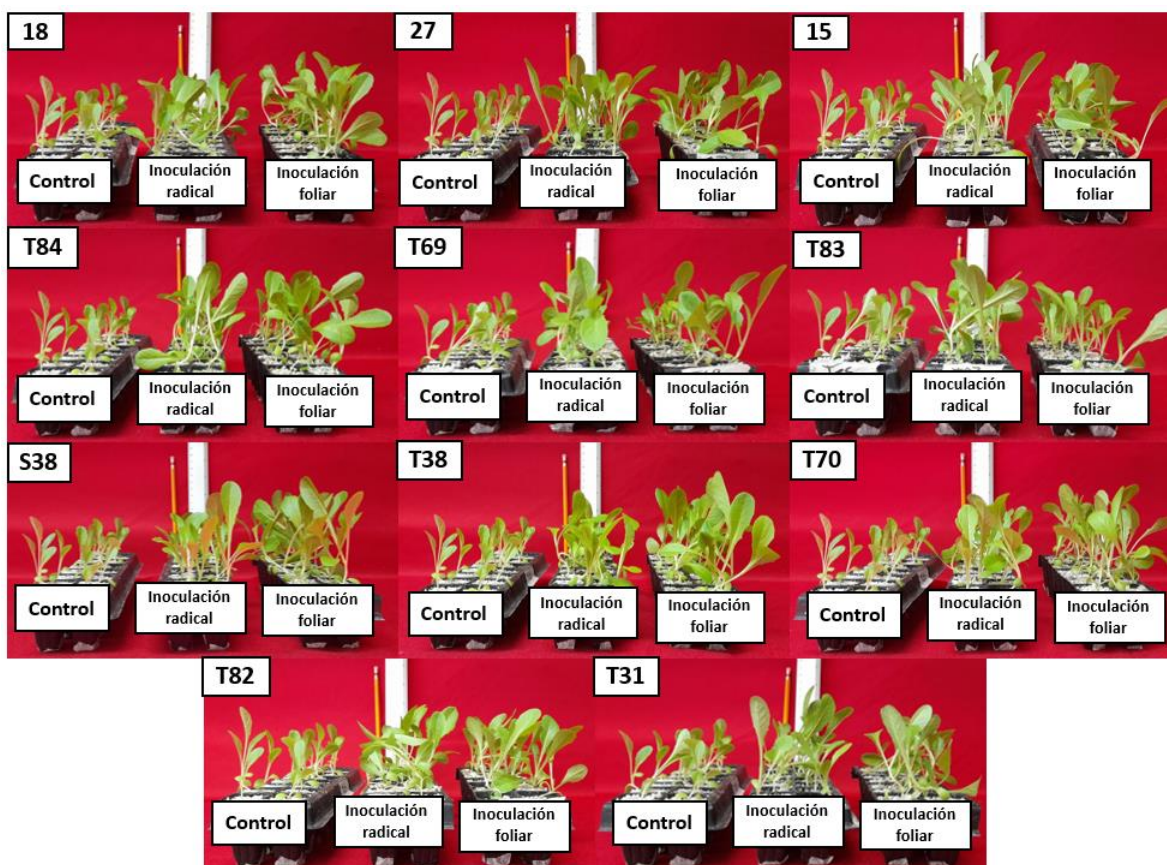


Figura A-01. Plantas de lechuga del experimento 1. Inoculación de 11 bacterias aisladas de abejas sin aguijón [*Pantoea anthophila* (S38), *P. anthophila* (T38), *P. anthophila* (T83), *P. anthophila* (T84), *Bacillus* sp. (T69), *Bacillus* sp. (T70), *Pseudomonas psychrotolerans* (T82), *Sinorhodobacter* sp. (T31), *Serratia nematodiphila* (15), *Staphylococcus arlettae* (18), y *Staphylococcus kloosii* (27)], en condiciones de invernadero, con temperatura máxima de 35 °C y mínima de 10 °C, y humedad relativa del 75%, después de 20 días de crecimiento.

ANEXO 4.

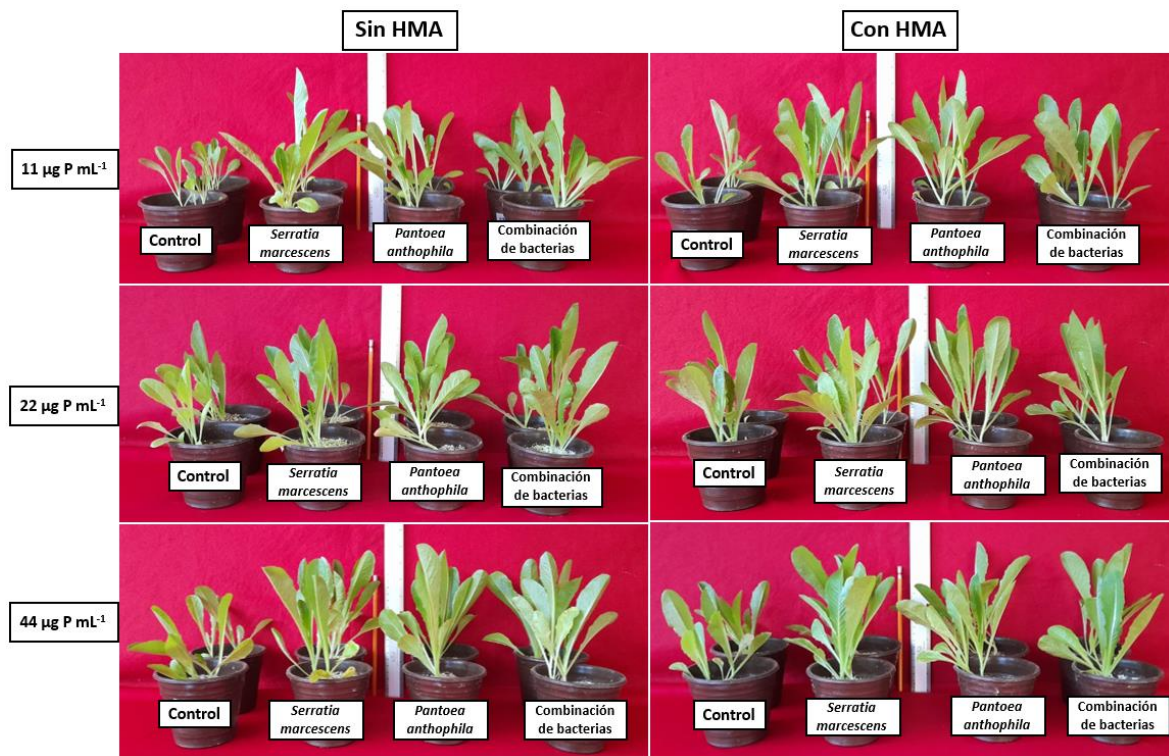


Figura A-02. Plantas de lechuga del experimento 2. Inoculación de dos bacterias seleccionadas [*Pantoea anthophila* y *Serratia nematodiphila*] aisladas de abejas sin aguijón, hongos micorrízicos arbusculares (*Claroideoglomus claroideum* y *funneliformis mosseae*) y tres dosis de fertilización fosfatada (11, 22 y 44 µg P mL⁻¹), en condiciones de invernadero, con temperatura máxima de 35 °C y mínima de 10 °C, y humedad relativa del 80%, después de 20 días de crecimiento.