



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Selección de cepas nativas de bacterias  
aerobias formadoras de endospora como  
promotoras de crecimiento vegetal con énfasis  
en su capacidad antagonistas contra  
*Xanthomonas campestris* pv. *vitians* del  
cultivo de lechuga**

Laura Karina Benavides Rodríguez

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Posgrado Interfacultades de Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2019



**Selección de cepas nativas de bacterias  
aerobias formadoras de endospora como  
promotoras de crecimiento vegetal con énfasis  
en su capacidad antagonistas contra  
*Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* del  
cultivo de lechuga**

Laura Karina Benavides Rodríguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de  
*Magister en Ciencias – Microbiología*

**Director:**

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Codirectora:

Ph.D. Celsa García Domínguez

Línea de Investigación:

Microbiología ambiental Grupo de Investigación: Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Posgrado de Interfacultades de Microbiología  
Bogotá, Colombia  
2019



## **Agradecimientos**

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, su amor, por ser el bastón y guía para este proceso, por sus consejos, sus sonrisas, su crianza, soy quién soy gracias al trabajo hecho por ustedes.

A la Universidad Nacional de Colombia, por acogerme y recibirme en sus instalaciones, por mostrarme una perspectiva diferente de mi carrera enseñándome a amarla, por ser la mejor institución que he pisado.

Al instituto de Biotecnología y todos sus integrantes, por demostrarme que no solo somos un instituto sino además una familia, presta a ayudar, enseñar, divertir y crecer. A Socorro, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, por mostrarme que la vida es un campo de batalla que podemos vencer con energía y amor.

Al Grupo de investigación en Microbiología Agrícola por ser mi segundo hogar, por permitirme conocer a personas y amigos maravillosos, por el crecimiento y las alegrías que me dieron, por las enseñanzas y el amor. Los llevaré siempre en mi corazón.

Al Dr Daniel Uribe Velez, porque más allá de ser un director, fue un guía y un amigo, que siempre quiso enseñarnos más, mostrarnos más, gracias por su cariño, por su humanidad, por su dedicación a esta linda labor, eternamente agradecida.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, funcionarios, profesores, a la Doctora Adriana Gonzalez, fueron parte clave en este proceso de aprendizaje e investigación

A la Dra. Celsa García por su guía, consejos, conocimientos y a su grupo de investigación en *Plasmodiophora brassicae*, especialmente a Fabian Padilla, sin el apoyo y colaboración de todos, este logro jamás habría sido posible.

A mi compañero y amigo Germán Andrés, por el trabajo realizado en conjunto, indispensable para este proyecto, por los frutos de días de trabajo y todo lo aprendido en el proceso, pero especialmente por su amistad, su legado y su alegría.

A toda mi familia, amigos y pareja, por ser, por estar, por las risas y los momentos compartidos dentro y fuera de esta institución.

## Resumen

La producción de lechuga en el mundo ha venido presentando un aumento progresivo, dado el auge que ha tenido el consumo de vegetales por su papel en la prevención de enfermedades. Colombia no se ha quedado atrás aumentando la producción en los últimos años convirtiéndose en una fuente de empleo significativa para el sector rural. Sin embargo, la dinámica de producción ha llevado al uso intensivo de suelos, generando problemáticas ambientales, lo que se ve representado en una disminución en el rendimiento y pérdidas económicas, razón por la cual, nuevas alternativas biológicas están siendo estudiadas con el fin de mitigar el impacto de la explotación de los suelos y uso desmesurado de productos químicos. Por tanto, este estudio evaluó de manera *in vitro* e *in vivo* cincuenta aislamientos de bacterias aerobias formadoras de endospora (BAFEs) como promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de lechuga haciendo énfasis en su capacidad para promover en presencia de roca fosfórica y en su actividad antagónica frente al aislamiento LC100 de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*). De los cincuenta aislamientos evaluados, doce cepas presentaron actividad promotora destacándose el aislamiento 4p-03 que en presencia de roca fosfórica arrojó valores de peso seco de raíz y vástago 100% mayores al control, once cepas tuvieron actividad antagonista *in vitro* y cinco *in vivo* destacándose los aislamientos 7p-03 y 2p-03 con una reducción promedio en la severidad de la enfermedad del 25%. Se observó una interacción entre los aislamientos cuando fueron aplicados en una misma planta disminuyendo el efecto promotor, pero mitigando los impactos de la enfermedad.

**Palabras claves:** lechuga, roca fosfórica, BAFEs, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, promoción, antagonismo



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Objetivos</b> .....	<b>5</b>
1.1 Objetivo general.....	5
1.2 Objetivos específicos .....	5
<b>2. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
2.1 <i>Lactuca sativa</i> .....	7
2.2 <i>Xanthomonas sp.</i> .....	18
2.3 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal .....	23
2.4 Bacterias aerobias formadoras de endospora (BAFEs) .....	31
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	<b>34</b>
3.1 Evaluación de los aislamientos de BAFEs como promotoras de crecimiento vegetal .....	34
3.1.2.1 Preparación de inóculos .....	38
3.1.2.2 Solubilización de fosfato .....	38
3.1.2.3 Producción de compuestos indólicos.....	39
3.2 Caracterización de los aislamientos de BAFEs según su actividad antagónica frente a <i>Xanthomonas campestris pv vitians</i> .....	40
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>47</b>
4.1 Caracterización de la actividad promotora de crecimiento bajo ensayos de invernadero.....	47
4.2 Caracterización de actividades relacionadas con promoción de crecimiento <i>in vitro</i> .....	60
4.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico.....	60
4.3 Caracterización de la actividad antagónica de las BAFEs frente a <i>Xanthomonas campestris pv. vitians</i> .....	68
4.3.1 Aislamiento e identificación de <i>Xanthomonas campestris pv. vitians</i> .....	68
4.3.2 Actividad antagónica <i>in vitro</i> .....	73
4.4 Identificación molecular.....	83
<b>5. Conclusiones y recomendaciones</b> .....	<b>97</b>

X Selección de cepas nativas de bacterias aerobias formadoras de endospora como promotoras de crecimiento vegetal con énfasis en su capacidad antagonistas contra *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* del cultivo de lechuga

---

5.1 Conclusiones.....	97
5.2 Recomendaciones.....	98
<b>Bibliografía .....</b>	<b>99</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Producción mundial (millones de toneladas) área cosechada mundial (ton/Ha) de lechuga (Tomada de FAOFAST,2019)	9
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de participación de continentes en producción de lechuga (Tomada de FAOFAST, 2019)	9
<b>Figura 3.</b> Área cosechada y producción de lechuga en Colombia (Agronet, 2019) Los departamentos de mayor producción son Cundinamarca, Antioquia y Nariño, (Figura 4), con una participación para el año 2016 del 55%, 20% y 19%, respectivamente (Agronet - MINAGRICULTURA, 2017).	11
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de participación en la producción de lechuga por departamentos en Colombia (Agronet - MINAGRICULTURA, 2017).	11
<b>Figura 5.</b> Rendimiento del cultivo de lechuga en Colombia (Tomada de Agronet 2019).	12
<b>Figura 6.</b> Estados de desarrollo de la lechuga. (Modificado de Antúnez.,2017).	13
<b>Figura 7.</b> Fertilización en la corona después del primer deshierbe (Jaramillo et al., 2016).	15
<b>Figura 8.</b> Población bacteriana de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vitians</i> cepa L7R a $1 \times 10^5$ UFC/mL en tejidos foliares de lechuga, frijol, cilantro, tomate, remolacha, pimentón. Evaluación por dos semanas después de una infiltración (modificada de Robinson et al., 2006)	21
<b>Figura 9.</b> Mecanismos utilizados por las PGPR para mejorar el crecimiento vegetal (Modificada de Nadeem et al., 2013).	25
<b>Figura 10.</b> Mecanismos más importantes de control biológico en plantas, mediados por rizobacterias. (a) Antibiosis, la rizobacteria coloniza el sistema radicular y produce antibióticos que no permiten la colonización del patógeno (estrellas rojas), (b) ISR resistencia sistémica inducida, protección de otras partes de la planta no afectadas directamente por el patógeno por activación de genes, (c) competencia por nutrientes y nichos (tomada de Lugtenberg & Kamilova, 2009)	28

- Figura 11.** Vías de transducción de señales que conducen a la resistencia sistémica adquirida (SAR) inducida por patógenos y la resistencia sistémica inducida (ISR) mediada por rizobacterias en *Arabidopsis thaliana* (Modificada de Beneduzi et al., 2012). 30
- Figura 12.** Ensayo #1, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianzas de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 48
- Figura 13.** Ensayo #2, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 49
- Figura 14.** Ensayo #3, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 50
- Figura 15.** Ensayo # 4, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 51
- Figura 16.** Ensayo # 5, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 52
- Figura 17.** Variables de respuesta longitud raíz (A) y longitud vástago (B) de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de 100% de fósforo soluble inorgánico en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aplicado en solución de Hoagland. R1 repetición 1, R2 repetición 2 en el tiempo. Se observa la desviación estándar del

promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 54

**Figura 18.** Variables de respuesta peso seco raíz (A) y peso seco vástago (B) de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de 100% de fósforo soluble inorgánico en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aplicado en solución de Hoagland. R1 repetición 1, R2 repetición 2 en el tiempo. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 55

**Figura 19.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 56

**Figura 20.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo soluble y 100% de fósforo como roca fosfórica. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 57

**Figura 21.** Síntomas de deficiencia de fósforo en plantas de lechuga fertilizadas con solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo más roca fosfórica. A) coloración purpura en vástago B) enanismo (planta del lado izquierdo tratada con la cepa 4p-03, planta del lado derecho control con ADE) 58

**Figura 22.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización con solución de Hoagland con 100% de fósforo soluble en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se observa la desviación estándar del promedio de 15 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 59

**Figura 23.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización con solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo soluble más roca fosfórica (4,96g/planta). Se observa la desviación estándar del promedio de 15 repeticiones por

- tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 60
- Figura 24.** Valores en  $\text{mg.L}^{-1}$  de solubilización de fosfato tricálcico, utilizando el método analítico Spectroquant® Fosforo de Merck. Control + (*Pseudomonas fluorescens* Pfls 095), Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ) 61
- Figura 25.** Valores en  $\mu\text{g.mL}$  de producción de ácido indol acético (AIA). Control + (*Azospirillum brasilensis*). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 62
- Figura 26.** Porcentaje de eficiencia de mineralización de ácido fítico. Control + (*Pseudomonas fluorescens* Pfls 095), Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 63
- Figura 27.** Halos de mineralización de ácido fítico de BAFEs en medio NBRIP después de cinco días de incubación 63
- Figura 28.** Peso fresco de plantas de lechuga a los 2, 5 y 8 días después de la inoculación con *Bacillus subtilis* (Tomada de Arkhipova et al., (2005) 65
- Figura 29.** Sintomatología presuntiva de BLS en hoja de lechuga crespas recolectadas de Marengo en Mosquera- Cundinamarca. 68
- Figura 30.** Colonias aisladas de síntomas presuntivos de BLS de hojas de lechuga crespas en medio MMG. 69
- Figura 31.** Producción de pigmentos amarillos en medio YDCA después de incubación a  $28^\circ\text{C}$  por 48h. A). LC100 B). LC100A C). LB103 70
- Figura 32.** Progreso de la enfermedad BLS sobre hojas de lechuga variedad Paris Island después de la inoculación con el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv *vitiens*, 71
- Figura 33.** Árbol de distancia filogenética basado en secuencias de 16s rRNA de los géneros *Xanthomonas* sp y *Pseudomonas* sp, se ubican los aislamientos LC100, LC100A y LB103. Herramienta de construcción estadístico Neighbor- joining. 72
- Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se observa la amplificación del gen de 700pb que codifica para una Glicosil Hidrolasa de *X. campestris* pv *vitiens* con los primers 9308B. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb Invitrogen; Línea 2: aislamiento LC100; Línea 3: aislamiento LB103; Línea 4: control negativo, *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* VAR 226 72

- Figura 35.** Halos de inhibición en cm de los aislamientos de BAFEs sobre la cepa LC100. Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 73
- Figura 36.** Halos de inhibición en cm los aislamientos de BAFEs sobre la cepa LC100 medida en cm de halos de inhibición. Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 73
- Figura 37.** Halos de inhibición de BAFEs sobre los aislamientos A). LC100 y B). LB103 en medio LB después de 24 horas de incubación. 74
- Figura 38.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de porcentaje de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv *vitians* en plantas de lechuga, a). 2p-03, b). 2p-04, c). 4p-03, d). 4p-07, e). 5p-01, f). 5p-03, g). 6p-06, h). 6p-07, i). 5p-10, j). 7p-03, k). 7p-10, l). Control de la enfermedad. 76
- Figura 39.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv *vitians* en plantas de lechuga, a). 2p-03, b). 2p-04, c). 4p-03, d). 4p-07, e). 5p-01, f). 5p-03, g). 6p-06, h). 6p-07, i). 5p-10, j). 7p-03, k). 7p-10, l). Control de la enfermedad 78
- Figura 40.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv *vitians* en plantas de lechuga, a). 7p-10, b). 2p-03, c). 7p-03, d). 6p-06, e). Control de la enfermedad. 79
- Figura 41.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv *vitians* en plantas de lechuga, a). 7p-10, b). 2p-03, c). 7p-03, d). 6p-06, e). Control de la enfermedad. 80
- Figura 42.** Árbol de distancia filogenética del género *Bacillus*. Se observa la división del grupo subtilis y grupo cereus. Se incluye la especie *Pseudomonas fluorescens* como el outgroup. 85
- Figura 43.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como

- roca fosfórica, se incluye el control 100% que corresponde a solución de Hoagland con una dosis de fósforo al 100%. Se observa la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 87
- Figura 44.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observan los tratamientos correspondientes a cada aislamiento de BAFEs (4p-03 y 2p-03) y el control. Se incluye la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 88
- Figura 45.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observan los tratamientos correspondientes a cada aislamiento de BAFEs y Xcv (4p-03, 2p-03 y LC100) y el control. Se incluye la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ). 92
- Figura 46.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 4p-03+2p-03, b). 4p-03, c). 2p-03, d). Control de la enfermedad. 94
- Figura 47.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 4p-03+2p-03, b). 4p-03, c). 2p-03, d). Control de la enfermedad 95

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Taxonomía del género <i>Lactuca</i> L.	8
<b>Tabla 2.</b> Área, siembra y producción de hortalizas en Colombia	10
<b>Tabla 3.</b> PGPR y su potencial en la agricultura	24
<b>Tabla 4.</b> Diferencia porcentual promedio en la enfermedad y el rendimiento en relación con un control no tratado en experimentos de campo usando cepas de PGPR y pesticidas para controlar las enfermedades de los cultivos.	30
<b>Tabla 5.</b> Efecto Biofertilizante de <i>Bacillus</i> spp. en cultivos de plantas.	32
<b>Tabla 6.</b> Colección de cepas de suelo rizosférico de cultivos de papa criolla	35
<b>Tabla 7.</b> Composición solución de Hoagland	37
<b>Tabla 8.</b> Diseño factorial para la evaluación de la interacción de los aislamientos.	45
<b>Tabla 9.</b> Perfil bioquímico de los aislamientos LC100, LC100A y LB103. K: reacción alcalina.	69
<b>Tabla 10.</b> Efecto en la incidencia y severidad de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación foliar con los aislamientos de BAFEs	75
<b>Tabla 11.</b> Valores de incidencia y severidad de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación foliar con los aislamientos de BAFEs seleccionados	79
<b>Tabla 12.</b> Géneros de los aislamientos seleccionados según Identificación molecular	74
<b>Tabla 13.</b> Valores de incidencia, severidad y AUDPC de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación con los aislamientos de BAFEs 4p-03 y 2p-03.	93



## Introducción

La producción de lechuga a nivel mundial viene presentando un incremento debido a la importancia y al efecto positivo que ha tenido el consumo de vegetales en la salud humana, dado su aporte en vitaminas, minerales y sustancias antioxidantes (Galieni et al., 2015; Noumedem et al., 2017). La producción mundial de lechuga para el año 2017 fue de 25.400 millones de toneladas, siendo China el mayor productor, seguido por Estados Unidos (FAOFAST, 2019; Noumedem et al., 2017).

Colombia no se ha quedado atrás y cultivos como los de lechuga han sido impulsados por estas nuevas dinámicas agrícolas, aumentando su área de siembra y su producción anual, superando la tasa de crecimiento promedio (ASOHOFRUCOL, 2007). Para el año 2017 la producción total de lechuga alcanzó las 86.597 toneladas y un área cosechada total de 3988.83 hectáreas, siendo Cundinamarca el mayor productor (Agronet, 2019).

El aumento en la demanda de consumo de esta hortaliza ha llevado al uso intensivo de los suelos y a la aplicación constante de fertilizantes y pesticidas, generando fuertes repercusiones ambientales y disminución de la calidad nutricional y fertilidad de los suelos, por fenómenos como: pérdida de materia orgánica, afectación en el equilibrio de la microbiota, contaminación de suelos y afluentes de agua, entre otros, llevando adicionalmente a un detrimento en la productividad y rendimiento de los cultivos, por la baja concentración de nutrientes en el suelo y la sensibilidad a enfermedades (Hernández et al., 2016; Neocleous y Savvas, 2019).

En los últimos años, en Colombia se ha observado una disminución en el rendimiento del cultivo de lechuga, siendo para el año 2014 de 18.56 ton/Ha y para el año 2017 de 16,2ton/Ha. Los cultivos de hortalizas en Colombia se caracterizan por una baja implementación de ciencia y tecnología, uso constante de fertilizantes y pesticidas y baja incorporación de materiales vegetales resistentes, lo que afecta visiblemente su

rendimiento, generando además sobrecostos en la producción, por el uso continuo de insumos externos (Velásquez et al., 2014).

El cultivo de lechuga en comparación con otras hortalizas es especialmente sensible a concentraciones de fósforo y potasio debido al ciclo corto de este cultivo y a la baja disponibilidad de estos elementos en el suelo (López et al., 2003; Martínez y Garcés, 2012; Neocleous y Savvas, 2019). Adicionalmente, se puede ver afectado por la aparición de patógenos como virus, hongos y bacterias, causando alteraciones en el funcionamiento y características de las plantas, manifestándose mediante la aparición de manchas, pudrición, deformaciones y muerte (Złotek y Gawlik-Dziki, 2015; CORPOICA, 2010). Por este motivo se hace necesaria la búsqueda de alternativas a los productos de origen químico que permitan suplir los requerimientos nutricionales, disminuir la contaminación ambiental, mejorar las condiciones del suelo y proteger las plantas a enfermedades, mejorando la productividad.

Diversos estudios se han enfocado en la evaluación y desarrollo de alternativas de manejo integrado, sugiriendo algunas prácticas como la rotación de cultivos, el uso de variedades mejoradas, el uso de materiales orgánicos o la aplicación de productos biológicos a base de microorganismos (Hernández et al., 2016; Kanwa, 2011; Olbert et al., 2018). Respecto al uso de microorganismos, se sabe que las poblaciones microbianas del suelo están involucradas en una serie de actividades metabólicas y biológicas que mejoran y favorecen el establecimiento de las plantas. Dentro de estos microorganismos podemos resaltar algunos hongos involucrados en procesos de formación de micorrizas o bacterias benéficas también conocidas como PGPR dentro de las que cuales encontramos bacterias del género *Bacillus*, las cuales participan en procesos indispensables para la salud de la planta, como: control biológico de patógenos, formación de sideróforos, solubilización de fósforo, producción de fitohormonas, inducción de resistencia, entre otras (Beneduzi, 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Teniendo en cuenta estas alternativas y las problemáticas asociadas al rendimiento y productividad del cultivo de lechuga en Colombia, este trabajo se planteó evaluar el efecto de bacterias aerobias formadoras de endospora (BAFEs) en la promoción de crecimiento de plantas de lechuga con énfasis en el control de *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*, una bacteria fitopatógena, que no se encuentra reportada en el país pero que

durante el inicio de este proyecto fue aislada de cultivos de lechuga ubicados en el Centro Agropecuario Marengo de la Universidad Nacional de Colombia en Mosquera-Cundinamarca, y que, de no ser controlada a tiempo, puede generar fuertes repercusiones económicas, como se ha visto en otros países de América (Robinson et al.,2006).



# 1. Objetivos

## 1.1 Objetivo general

Seleccionar cepas nativas de bacterias aerobias formadoras de endospora con potencial como promotoras de crecimiento vegetal con énfasis en su capacidad antagonista frente al patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* del cultivo de lechuga.

## 1.2 Objetivos específicos

- Seleccionar cepas nativas de BAFES por su potencial de promoción de crecimiento vegetal sobre plantas de lechuga.
- Caracterizar bajo condiciones *in vitro* los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de las cepas nativas de BAFES seleccionadas.
- Evaluar la capacidad antagónica de cepas nativas de BAFES frente a *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.
- Evaluar bajo condiciones de invernadero, la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas nativas de BAFES seleccionadas con y sin la presencia del patógeno de lechuga *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.



## **2. Marco teórico**

### **2.1 *Lactuca sativa***

#### **2.1.1 Origen y generalidades**

La lechuga (*Lactuca sativa*) es una hortaliza de hoja, perteneciente a la familia Asteraceae, la cual comprende más de 2,300 especies de plantas (Noumedem et al., 2017). El género *Lactuca* contiene aproximadamente 100 especies, las cuales se encuentran distribuidas en Europa, Norte América, África y Asia (Vries, 1997).

Se cree que el origen de la lechuga se concentró en Asia, en la región entre Egipto e Irán, sin embargo, los primeros registros de este vegetal se observaron en murales y pinturas de tumbas egipcias hacia los años 2.500-2.600 AC, quienes lo cultivaban especialmente para la obtención de aceite de semilla. La primera variedad sembrada se cree muy similar a la variedad romana actual, pero una versión más grande, de aproximadamente 76cm de altura. De Egipto se introdujo en Grecia, y posteriormente en continentes como América en donde fue introducida por Cristóbal Colón (Vries, 1997; Noumedem et al., 2017).

Este vegetal consta de un área foliar, la cual representa la mayor parte de su peso, compuesto principalmente por agua, tiene una raíz en forma pivotante densa y superficial, sus hojas son comúnmente verdes, lisas o corrugadas, aunque algunas variedades presentan tonalidades violetas y rojizas. Posee un tallo corto y cilíndrico, las flores están dispuestas en racimos con presencia de 10 a 25 floretes, las cuales permanecen abiertas por un periodo de tiempo corto (Santos et al., 2009).

En Estados Unidos se reporta un consumo per cápita estimado de 11.7 Kg/año siendo el tercer vegetal más importante en este país, a nivel mundial ha tenido un auge entre la población, debido a los valores nutricionales e importancia medicinal que se le han atribuido (Galieni et al., 2015; Gurdon et al., 2019).

La lechuga es una fuente rica en vitaminas como la vitamina A, C y K, proporciona aportes de ácido fólico, fósforo, sodio y potasio y varios fitoquímicos, especialmente polifenoles que cumplen un papel importante en la salud humana, como prevención de enfermedades cardiovasculares (Galieni et al., 2015; Noumedem et al., 2017; Złotek y Gawlik-Dziki, 2015).

## 2.1.2 Taxonomía y clasificación

La especie *L. sativa* se caracteriza por una alta diversidad genética, producto de su carácter filogenético y el fuerte proceso de domesticación (Noumedem et al., 2017). *Lactuca sativa* se clasifica en la sección *Lactuca*, subsección *Lactuca L. serriola L.*, proveniente de *L. serriola*, su pariente silvestre más cercano. Se compone de una especie de lechuga silvestre y aproximadamente 100 *Lactuca* spp. provenientes en su mayoría de Asia y África. La clasificación comprende siete grupos o morfotipos (tabla 1), dentro de los cuales la lechuga es sin duda uno de los morfotipos comestibles más diversos, que se divide por sus características fenotípicas en: Butterhead, Cos o Romanas, Latin, Crisphead, Cutting y Stalk lechuga (Vries, 1997; Lebeda et al., 2014; Noumedem et al., 2017).

**Tabla 1.** Taxonomía del género *Lactuca* L.

Sección	Subsección	Especie	Biología
<i>Lactuca L.</i>	<i>Lactuca L.</i>	<i>L. aculeata</i> , <i>L. altaica</i> , <i>L. dregeana</i> , <i>L. lívida</i> , <i>L. saligna</i> , <i>L. sativa</i> , <i>L. serriola</i> , <i>L. virosa</i>	Anual, hibernación anual, bianual
	<i>Cyanicae DC.</i>	<i>L. perennis</i> , <i>L. tenerrima</i>	Perenne
<i>Phaenixopus (Cass.) C.B Benth</i>		<i>L. viminea</i>	Perenne
<i>Mulgedium (Cass.) C.B Clarke</i>		<i>L. tatarica</i> , <i>L. sibirica</i> , <i>L. taraxacifolia</i>	Perenne
<i>Lactucopsis (Schultz Bip. Ex Vis. Et Paneie) Rouy</i>		<i>L. quercina</i>	Perenne
<i>Tuberosae Boiss</i>		<i>L. indica</i>	Perenne
<i>Micranthae Boiss</i>		<i>L. undulata</i>	Perenne
<i>Sororiae Franchet</i>		<i>L. sororia</i>	Perenne
Grupos (Geografía)			
Norte América		<i>L. biennis</i> , <i>L. canadensis</i> , <i>L. floridana</i> , <i>L. graminifolia</i>	Bianual
Africa		<i>L. capensis</i> , <i>L. dregeana</i> , <i>L. homblei</i>	Anual, perenne

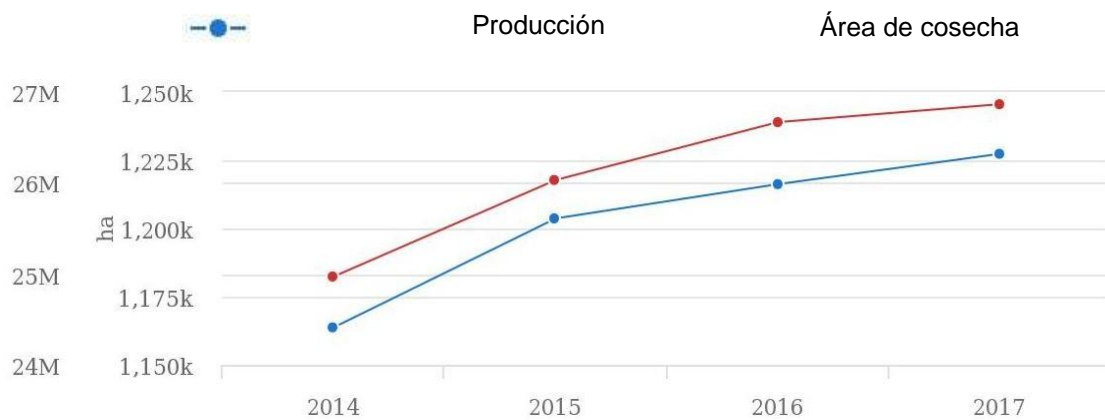
(Modificada de Lebeda et al., 2014)

## 2.1.3 Producción

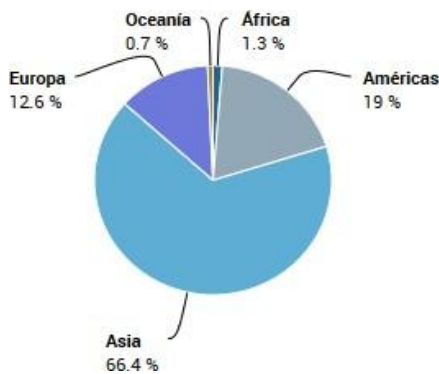
### 2.1.3.1 Producción mundial

La producción mundial de lechuga para el año 2017 fue de 25.400 millones de toneladas, presentando un aumento respecto a años anteriores (figura 1). La producción la lidera China, seguido de Estados Unidos, razón por la cual Asia y América son los continentes con mayor participación, seguidos por Europa (figura 2) (FAOFAST, 2019; Noumedem et al., 2017).

El rendimiento de producción por área de siembra, para el año 2012 fue liderado por India con 63,24ton/Ha, seguido de Estados Unidos, Irán, España y China con un rendimiento de 36,31ton/Ha, 33,53ton/Ha, 26,77ton/Ha y 24,35ton/Ha, respectivamente. El mayor importador de lechuga es Alemania, quien para el año 2012 tuvo una participación de 16,7% de las importaciones mundiales (FAOFAST, 2019; Noumedem et al.,2017).



**Figura 1.** Producción (millones de toneladas) y área de cosecha (ton/Ha) del cultivo de lechuga a nivel mundial área cosechada mundial (ton/Ha) (Tomada de FAOFAST,2019).



**Figura 2.** Porcentaje de participación de continentes en producción de lechuga (Tomada de FAOFAST, 2019).

### 2.1.3.2 Producción nacional

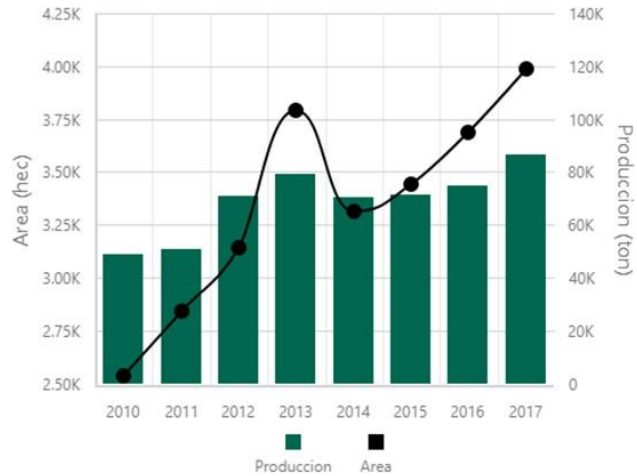
La producción de hortalizas en Colombia es una actividad fundamental en el sector agropecuario debido a su implicación en la generación de empleos directos e indirectos (FINAGRO, 2014). Para el año 2013 las exportaciones de hortalizas incrementaron en un 28%, siendo la lechuga quien mayor espacio de crecimiento presentó debido a los acuerdos de TLC firmados con Estados Unidos (FINAGRO, 2014). La producción nacional de hortalizas para el año 2016 fue de 417.257 toneladas, en donde las hortalizas de hoja presentan el mayor porcentaje de participación (tabla 2); (DANE, 2016).

**Tabla 2.** Área, siembra y producción de hortalizas en Colombia para el año 2016

Cultivo	Área sembrada (Ha)	Participación (%)	Área cosechada (Ha)	Participación (%)	Producción (Ton)	Participación (%)
Hortalizas de hoja	18.510	8,4	17.460	8,2	256.424	12,2
Hortalizas de fruto	11.668	5,3	10.591	5,0	88.886	4,2
Hortalizas de raíz	1.555	0,7	1.931	0,9	32.850	1,6
Hortalizas de bulbo	1.460	0,7	1.394	0,7	14.207	0,7
Hortalizas de flor	1.375	0,6	1.274	0,6	22.859	1,1
Hortalizas de tallo	150	0,1	135	0,1	2.031	0,1

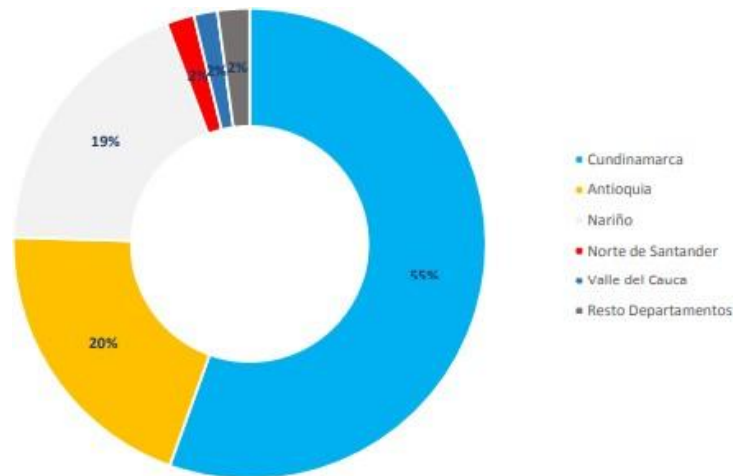
(Modificada de DANE, 2016)

En Colombia la lechuga es una hortaliza de hoja de gran importancia, teniendo en cuenta el área sembrada y el costo de producción (Jaramillo et al., 2016). Para el año 2017 la producción total fue de 86.597 toneladas y un total de área cosechada de 3.988 hectáreas, presentando un aumento progresivo respecto a años anteriores (figura 3).



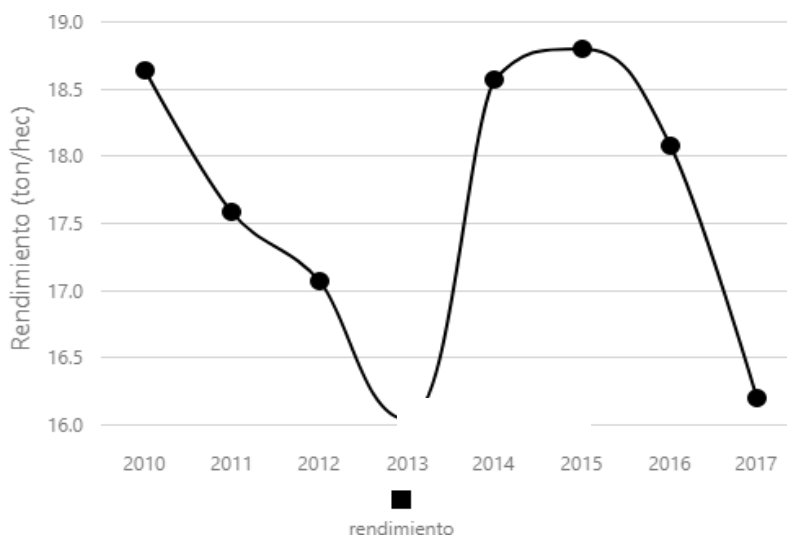
**Figura 3.** Área cosechada y producción de lechuga en Colombia del año 2010 al año 2017 (Agronet, 2019).

Los departamentos de mayor producción son Cundinamarca, Antioquia y Nariño, (Figura 4), con una participación para el año 2016 del 55%, 20% y 19%, respectivamente (Agronet - MINAGRICULTURA, 2017).



**Figura 4.** Porcentaje de participación en la producción de lechuga por departamentos en Colombia (Agronet - MINAGRICULTURA, 2017).

La siembra de hortalizas en Colombia se caracteriza por ser de cultivos dispersos y de tamaños pequeños, con altos costos de producción debido a la baja tecnificación, el bajo uso de variedades mejoradas y el uso continuo de fertilizantes y pesticidas, llevando a sucesos como la susceptibilidad a plagas y enfermedades aumentando la dispersión de éstas y generado disminución de la calidad nutricional de los suelos (ASOHOFrucol & Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Rural., 2009), afectando directamente el rendimiento del cultivo. Para el año 2014, en Colombia el rendimiento del cultivo de lechuga fue de 18.56ton/Ha mientras que para el 2017 disminuyó a 16,2 ton/Ha (Figura 5).



**Figura 5.** Rendimiento del cultivo de lechuga en Colombia (Tomada de Agronet 2019).

### 2.1.3 Condiciones de cultivo

El crecimiento de la lechuga se divide en 4 fases de desarrollo: plántula, roseta, encabezamiento y reproductivo (Tomado de Antúñez., 2017) (Figura 6).



**Figura 6.** Estados de desarrollo de la lechuga. (Modificado de Antúnez, 2017).

El ciclo del cultivo en suelo tiene un tiempo aproximado de 3 meses, el cual inicia con una etapa de plantulación, en donde las semillas son sembradas en bandejas plásticas con sustratos como turba o cascarilla y por lo general se encuentran protegidas de condiciones medio ambientales adversas. Esta fase del ciclo es vital e indispensable para asegurar la supervivencia de las plantas una vez sean trasladadas a suelo, por lo que se debe obtener una lámina foliar suficiente para el proceso de fotosíntesis y raíces compactas y abundantes para la toma de nutrientes y agua (Antúnez., 2017; Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

En plantulación permanecen aproximadamente 30 días, tiempo en el cual ya tienen de 5 a 6 hojas verdaderas, transcurrido este tiempo, las plántulas son transferidas a camas de suelos en donde permanecen de 10 a 12 semanas, en este tiempo, la plántula continúa desarrollando hojas verdaderas hasta formar la roseta y finalmente la formación de cabezas, compactas o sueltas, según la variedad (Antúnez., 2017; Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

La lechuga tiene una alta adaptación a diferentes tipos de suelos, sin embargo, se desarrolla mejor en suelos franco-arcillosos y franco-arenosos, debido a la alta retención de agua. Las condiciones óptimas de pH son entre 6,5 y 7,5. Suele ser un cultivo de clima frío o frío-templado, sin embargo, la temperatura óptima varía dependiendo de la etapa de desarrollo. Para la germinación de la semilla en un período de 2 a 4 días, se requieren rangos de 20 a 26°C, posteriormente en la plantulación y hasta el final del ciclo, la

temperatura óptima oscila entre los 14 y 18° (Antúnez., 2017; Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

Como la mayoría de las hortalizas, la lechuga es un cultivo exigente en requerimientos hídricos. Existen diferentes tipos de riego, por surcos, por goteo, por aspersión o por superficie, sin embargo, los riegos frecuentes y ligeros parecen tener un efecto positivo sobre el rendimiento y la producción, por lo que el método por goteo es el más recomendable para el cultivo, aumentando el rendimiento un 30%, respecto al riego por surcos (Antúnez., 2017; Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

Igualmente es un cultivo exigente en relación con la luminosidad, requiriendo periodos de luz intensa por 12 horas, sin estas condiciones, se generan hojas delgadas y bajas en peso y volumen (Antúnez., 2017; Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

#### **2.1.4 Fertilización**

La fertilización es una de las labores más importantes y determinantes para el desarrollo óptimo de las plantas y para un alto rendimiento. La dosis de fertilización de cualquier cultivo va a depender de las condiciones del sustrato (cantidad de materia orgánica, humedad, pH, drenaje, retención de nutrientes), condiciones medio ambientales y del cultivo (temperatura, densidad de siembra, precipitaciones) y la variedad, por lo que, se recomiendan análisis químicos y físicos del sustrato antes de determinar el régimen de fertilización (Antúnez., 2017; Bogotá, 2015; Jaramillo et al., 2016).

En cultivos de lechuga con rendimientos de 45ton/Ha, se registran cifras de extracción de nutrientes de aproximadamente 100 Kg de N, 50Kg de P, 250 Kg de K, 51 Kg de Ca y 22 Kg de Mg, siendo estos los nutrientes principales e indispensables para este cultivo, sin embargo, no se descarta la aplicación de micronutrientes, según lo obtenido en los análisis de suelos (Jaramillo et al., 2016).

El cultivo de lechuga tiene dos etapas indispensables de fertilización, la primera, se realiza en el momento del trasplante, en donde los agricultores adicionan fertilizantes en

pre-siembra antes del trasplante, junto con la preparación del terreno, o después de éste, haciendo una aplicación localizada alrededor de cada planta, en la corona (figura 7), sin embargo, dado el ciclo corto de este cultivo, se recomienda que se realice en pre-siembra. Por lo general se utilizan fertilizantes granulados a base de nitrógeno, fósforo y potasio, los más comunes son 15-15-15 o 18-18-18, en dosis de 6 a 14 gramos por planta. Esta primera fertilización es indispensable para conseguir que la plántula se afiance en el nuevo sustrato y despeguen rápidamente del suelo, mejorando la formación de raíz y uniformidad de las plantas (Jaramillo et al., 2016).

La segunda dosis, se realiza cerca de los 20 o 30 días después del trasplante, posterior al primer deshierbe. El régimen de fertilización se basa nuevamente en nitrógeno, fósforo y potasio, pero en esta oportunidad en una proporción de 10-20-20 o 10-20-30, en una dosis de 6 a 14 gramos por planta (Figura 7), el objetivo de esta segunda fertilización es lograr una formación abundante y compacta de cabezas (Jaramillo et al., 2016). Adicionalmente 15 días después del trasplante se realiza una fertilización con nitrato de amonio en una dosis de 21 kg/Ha y un mes antes de la recolección, una aplicación con nitrato de potasio en una dosis de 28 Kg/Ha (Jaramillo et al., 2016).



**Figura 7.** Fertilización en la corona después del primer deshierbe (Jaramillo et al., 2016).

Las deficiencias o exceso de nutrientes durante la fase de fertilización se verán reflejados en atributos de las plantas y rendimientos del cultivo. Cada elemento, presenta diferentes síntomas de acuerdo con su deficiencia, que no deben ser confundidos con afectaciones por plagas o enfermedades (Cámara de comercio, 2015; Jaramillo et al., 2016).

### 2.1.4.1 Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento de alta movilidad y disponibilidad en el suelo, que se encuentra especialmente en forma de nitrato. La fertilización, enmiendas y residuos de cultivos anteriores, representan un aporte de N, debido a que este se va reciclando en el sistema, por lo que es importante conocer las concentraciones en el suelo, antes de realizar alguna aplicación, con el fin de evitar excesos de este nutriente y pérdidas por lixiviación (Antúnez., 2017).

El nitrógeno es un elemento esencial para la síntesis de proteínas y por lo tanto el metabolismo vegetal. Su deficiencia provoca una reducción en el desarrollo de las hojas, las cuales además toman una coloración verde grisácea. En estados avanzados, las hojas adultas se tornan pálidas con tonalidades amarillas, hasta llegar a su muerte, lo que desencadena la formación de cogollos pequeños o la ausencia total de éstos.

Por otro lado, excesos de nitrógeno llevan a una aceleración del desarrollo vegetativo, y retrasa el proceso de acogollamiento, ampliando la posibilidad de aparición de enfermedades, especialmente las causadas por hongos (Jaramillo et al., 2016).

### 2.1.4.2 Fósforo

El fósforo es uno de los elementos con menor movilidad en el suelo y, por lo tanto, uno de los menos disponibles para la planta. Para la absorción de fósforo es necesaria la presencia y unión con algunos aniones de ácidos orgánicos, muchos de éstos, liberados por las raíces y microorganismos presentes en el suelo (Marschner y Rengel, 2012).

En Colombia la producción de hortalizas se realiza bajo dos esquemas, uno tradicional con el uso continuo de fertilizantes químicos y uno orgánico con la inclusión de materia orgánica en el esquema de fertilización. En un estudio realizado por Forero, (2010) analizando los suelos de cultivos de lechuga en Cundinamarca encontraron que en el caso del sistema de producción tradicional el 73,1% de las fincas presentan bajo contenido de fósforo debido a los altos costos de fertilizantes fosfatados, los cuales han aumentado sus costos en el mercado más del 200% en los últimos años. Por otro lado, el 92,3% de las fincas con producción orgánica presentan excesos en el contenido de este elemento en el suelo, debido a la alta incorporación de materiales orgánicos,

especialmente roca fosfórica. Sin embargo, estos aportes no representan una fuente de fósforo disponible para la planta, debido a que este elemento se encuentra en forma de fosfato de hierro y de aluminio, el cual necesita un proceso de solubilización para su absorción (Forero, 2010).

Este elemento es esencial en el cultivo de lechuga para el metabolismo y desarrollo vegetal y del cogollo, su deficiencia inicia con una coloración verde oscura, que se va tornando púrpura progresivamente, en estados avanzados se llega a una necrosis total de las hojas hasta su muerte, generando plantas pequeñas y deteniendo su desarrollo. Su exceso afecta la absorción de hierro (Jaramillo et al., 2016).

### **2.1.4.3 Potasio**

El potasio al igual que el fósforo presenta una baja movilidad en el suelo, por lo que es necesaria la aplicación de fertilizantes que aporten 100 a 150 ppm, siendo suficientes para el cultivo. El potasio es un elemento relacionado con el transporte de hidratos de carbono, por lo que se encuentra involucrado con resistencia de la planta a condiciones medio ambientales adversas y a procesos de post-cosecha.

Su deficiencia se visualiza con la aparición de manchas cloróticas en el borde de las hojas más viejas, a medida que la deficiencia continúa, las manchas se alargan sobre las nervaduras de la hoja y en estados avanzados aparecen puntos necróticos sobre los halos cloróticos, además genera plantas alargadas y con escasa área foliar. El exceso en este elemento genera hojas duras y rígidas (Antúnez et al., 2017; Jaramillo Noreña et al., 2016).

### **2.1.5 Plagas y enfermedades**

La evaluación de las plagas que afectan los cultivos y su ciclo y comportamiento es esencial para la implementación de sistemas para su control. En los cultivos e incluso en los procesos de postcosecha es común la aparición de plagas y enfermedades que alteran el funcionamiento de las plantas variando sus características físicas o químicas, generando pérdidas económicas debido a detrimentos en la producción y al aumento en los costos por el uso de productos químicos o biológicos para el control de estos agentes epidemiológicos. (Toussaint et al., 2012; Orbera et al., 2014).

Diferentes enfermedades de tipo viral, bacteriano o fungicida afectan el cultivo de lechuga. Las enfermedades virales, después de los hongos, son quienes más pérdidas económicas generan en este cultivo, debido a que tiene grandes impactos sobre el rendimiento, predisposición a otras enfermedades y afecta la calidad por cambios en el tamaño, forma y propiedades nutricionales. Entre las enfermedades causadas por virus se encuentran: virus del mosaico de la lechuga, virus de la lechuga mirafirori, virus del amarilleo occidental de la remolacha, virus de la marchitez manchada del tomate y virus del amarillamiento necrótico de la lechuga (Lebeda et al., 2014).

En las enfermedades causadas por hongos, encontramos patógenos como: *Bremia lactucae* agente causal de la enfermedad del Mildeo velloso de la lechuga, *Sclerotinia sclerotiorum* responsable de la enfermedad del moho blanco de la lechuga, *Erysiphe cichoracearum* causante del Mildeo polvoriento, *Microdochium panattoniana* agente de la antracnosis de la lechuga y *Botrytis cinerea* (Pers.:Fr) causante del moho gris de la lechuga (Lebeda et al., 2014).

Finalmente, dentro de las enfermedades bacterianas del cultivo de lechuga, encontramos, la pudrición blanda causada por *Pectobacterium carotovorum*, mancha foliar brillante causada por *Pseudomonas cichorii* y la mancha foliar bacteriana causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (Lebeda et al., 2014).

## **2.2 Xanthomonas sp.**

El género *Xanthomonas* está conformado por bacterias Gram negativas aerobias, patógenas de al menos 124 monocotiledóneas y 268 dicotiledóneas, además de poseer otros miembros saprófitos y epífitos, siendo sin duda uno de los grupos de bacterias más ubicuos en el mundo (Chan y Goodwin, 1999; Sharma et al., 2014). Debido a esto, *Xanthomonas* sp. tiene un alto impacto económico, dada su afectación sobre el rendimiento y la productividad de cultivos como el tomate, el pepino y la lechuga (Pernezny et al., 2008).

En su perfil bioquímico son catalasa positiva y oxidasa negativa, en medios como TSI o Kligler no fermentan azúcares como la glucosa o lactosa, en medio YDC crecen colonias

lisas, brillantes, mucosas y producen pigmentación amarilla, son positivas para la hidrólisis de almidón (Álvez, 2016; Guzmán Rodríguez, 2007).

La clasificación taxonómica del género *Xanthomonas* ha presentado varios cambios a lo largo de los años, dada su complejidad y amplitud de rango de hospederos. Inicialmente cada variante con un rango de hospedantes diferentes se clasificó como una nueva especie, llevando a la formación de un género complejo, con más de 100 especies, razón por la cual, posteriormente, se propuso una clasificación por especie y patovares, clasificando todos los patovares en la misma especie denominada *X. campestris*.

Posteriormente los análisis de hibridación y huellas genéticas de ADN, permitieron reclasificar el grupo en tres linajes filogenéticos el primero incluye *X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. bromi*, *X. campestris*, *X. cassavae*, *X. cucurbitae*, *X. codiae*, *X. fragariae*, *X. hortorum*, *X. melonis*, *X. oryzae*, *X. pisi*, *X. populi*, *X. vasicola* y *X. vesicatoria*; el segundo incluye *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. theicola*, y *X. translucens*; y el tercero que consiste únicamente en *X. sacchari* (Vauterin et al; 2000).

El proceso de patogenicidad de *Xanthomonas* inicia con el ingreso de la bacteria al sistema vascular de la planta mediante heridas o estomas, una vez dentro, la bacteria se ubica en los espacios intercelulares en donde inicia su multiplicación, saturando los espacios y aumentando la permeabilidad, generando pérdida de nutrientes a través de las células vegetales. En el caso de las especies que no son capaces de penetrar inmediatamente, la infección inicia sobre las hojas vegetales, en donde generan degradación vegetal y de los organelos, hinchando las paredes hasta su fragmentación, punto en el cual pueden ingresar al sistema vascular de su hospedero. Este género de bacterias es capaz de multiplicarse rápidamente sin causar ningún daño visible, los síntomas incluyen: necrosis, marchitamiento, hipertrofia, descomposición y muerte celular (Chan y Goodwin, 1999; Daniels, 1989).

Como principales mecanismos de patogenicidad del género *Xanthomonas* se ha conocido la importancia de metabolitos fitotóxicos como lipopolisacáridos, glicopéptidos, ácidos carboxílicos de baja densidad, enzimas como las fosfoglucomatasas involucradas en la producción de xantano, sustancia clave para la interacción planta-patógeno, también enzimas como pectinasas, liasas, xilanasas y celulasas, involucradas en

procesos de degradación de polisacáridos estructurales como celulosa y hemicelulosa (Goto et al., 2016; Molinaro et al., 2000; Rosseto et al., 2016).

## **2.2.1 *Xanthomonas campestris* pv. *vitians***

La mancha foliar bacteriana (BLS) en lechuga es causada por el patovar *Xantomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*), el primer reporte de esta enfermedad fue descrito en Carolina del Sur y en Virginia en 1918 y a partir de este momento ha sido reportada en todo el mundo como agente causal de enfermedad, generando cerca de 4 millones de pérdidas económicas en Estados Unidos (Al-Saleh., 2011; Molinaro et al., 2000).

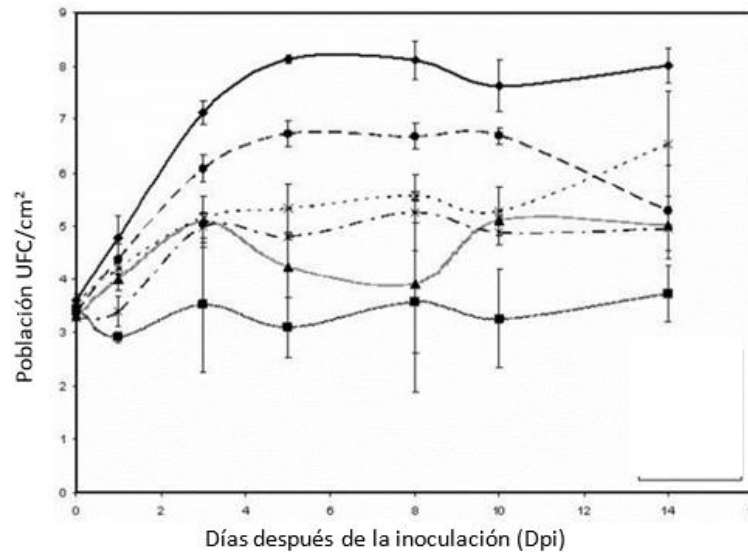
### **2.2.1.1 Síntomas e infección**

*Xcv* es un patógeno foliar y sistémico, que una vez entra en contacto con la planta, ingresa por medio de las aberturas de la hoja (estomas y/o heridas) a los haces vasculares y es capaz de translocarse dentro de la planta, probablemente a través de la xilema, colonizando otras zonas (Barak et al., 2002).

Los síntomas se observan inicialmente con la aparición de manchas acuosas marrón o negras con halos cloróticos, en los bordes o márgenes de la hoja, de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, posteriormente esta mancha se extiende a través de las nervaduras de la hoja y toman una forma de V hasta la necrosis total de éstas (Toussaint et al., 2012; Toussaint, 2019).

### **2.2.1.2 Epidemiología**

Se ha observado que *Xcv* se transmite en las semillas y es capaz de sobrevivir en éstas, considerándolas como la mayor fuente de inóculo primario. Algunos estudios, se han enfocado en tratamientos de control desde la semilla, con el fin de disminuir la incidencia del patógeno (Carisse et al., 2000). Puede también sobrevivir en residuos vegetales, en malezas y adicionalmente se ha encontrado que plantas como las de pimentón, cilantro o tomate actúan como reservorio de este patógeno, en donde permanece de manera epífita (figura 8) (Al-Saleh et al., 2011; Robinson et al., 2006).



**Figura 8.** Población bacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* cepa L7R a  $1 \times 10^5$  UFC/mL en tejidos foliares de lechuga, frijol, cilantro, tomate, remolacha, pimentón. Evaluación por dos semanas después de una infiltración (modificada de Robinson et al., 2006).

Toussaint, (2019) indica que según investigaciones realizadas por Wellman-Desbiens, (1998), posiblemente la bacteria se comporta de manera epífita también en lechuga, estando presente en las plantas sin generar síntomas visibles que alerten sobre su presencia en el cultivo, probablemente hasta alcanzar un umbral de población (quorum sensing), acompañado de condiciones ambientales óptimas, que induzcan los síntomas (Toussaint et al., 2012; Toussaint, 2019). Este es un tema especialmente coyuntural para el proceso de plantulación, ya que las semillas o plantas pueden contener el patógeno, pero no presentar síntomas, solo hasta cuando son trasplantadas a campo y encuentran las condiciones óptimas de desarrollo, por lo que un tratamiento preventivo sería óptimo para esta fase del cultivo (Toussaint, 2019).

La enfermedad (BLS) se ve favorecida por condiciones de humedad mayores a 70%, lluvias frecuentes y clima cálido, con una temperatura óptima de infección de 22.7°C (Nicolas et al., 2019; Robinson et al., 2006; Toussaint, 2019).

### 2.2.1.3 Mecanismos de patogenicidad

La interacción planta patógeno es un proceso complejo, mediado por una serie de eventos de reconocimiento de sustancias y moléculas, dentro de las que principalmente se encuentran azúcares, lipopolisacáridos y proteínas. Por parte de los patógenos estas sustancias son claves para el proceso de reconocimiento del hospedero y la colonización exitosa del mismo, por otro lado, las sustancias y proteínas producidas por la planta son indispensables para el reconocimiento del patógeno y la cadena de eventos asociados a la defensa (Evidente y Mottats, 2002; Peyraud et al., 2017).

Los estudios enfocados en los mecanismos de patogenicidad de *Xcv*, son escasos, sin embargo, Scala et al. (1996), aislaron y purificaron, dos metabolitos identificados como ácido 3-metiltiopropánico (compuesto 1) y ácido trans-3-metiltiopropánico (compuesto 2), a los cuales adicionalmente les hicieron pruebas de fitotoxicidad aplicando los extractos a una concentración de 300 µg/mL y 50 µg/mL, para el compuesto 1 y 2 respectivamente, sobre hojas de lechuga. A las 24h después de la inoculación se obtuvieron zonas traslucidas, áreas cloróticas después de 3 días y necrosis después de 5 días. Los mismos ácidos fueron aplicados sobre hojas de repollo, sin obtener ningún síntoma, evidenciando la participación de estos ácidos en la patogenicidad y su especificidad por el hospedero.

### 2.2.1.4 Sistemas de control

El control tradicional que se ha utilizado para enfermedades de tipo bacteriano se ha basado principalmente en el uso de compuestos químicos especialmente a base de cobre, sin embargo, el exceso en el uso de estos productos ha llevado a la resistencia por parte de algunas cepas (Moss et al., 2007; Pernezny et al., 2008; Toussaint et al., 2012). En estudios realizados por Toussaint (2019), evaluando la tolerancia de diferentes cepas de la especie *Xanthomonas campestris* frente a cobre, de 72 cepas evaluadas el 90,3% presentaron una tolerancia a cobre a una concentración de 5 mg/L y un 19,4% a 10,1 mg/L.

Debido a esta problemática, diversas alternativas se han estudiado para disminuir el uso de productos químicos. Una de estas consiste en el uso de variedades resistentes (Nicolas et al., 2019). En estudios realizados por Carisse et al., (2000), encontraron una

disminución de la incidencia por *Xcv* en algunas variedades como la de hoja roja, pero sin diferencias significativas en la resistencia para ninguno de los materiales evaluados, llevando a clasificar nueve variedades de lechuga en susceptibles, intermedias o tolerantes. Otros panoramas se han enfocado en la nutrición de la planta por su relación con la susceptibilidad a enfermedades, dado su papel en funciones básicas como: metabolismo celular, regulación génica, secreción hormonal, entre otras (Nicolas et al., 2019). Según Navarrete y De La Fuente (2015), la presencia de metales como el hierro en la planta cumple un papel importante en la interacción planta-patógeno, dado que altas concentraciones de estos ofrecen una protección del hospedero frente a herbívoros y patógenos.

Del mismo modo Nicolas et al, (2019), estudiaron el comportamiento y los cambios en las concentraciones de nitrógeno, azufre y fósforo en plantas de lechuga infectadas con *Xcv*, encontrando que concentraciones de estos elementos aumentan con el incremento de la infección. El uso de microorganismos benéficos o rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), con actividad antagonista e inducción de resistencia, es otra de las alternativas evaluadas para el control de fitopatógenos y algunos estudios se han realizado para evaluar el efecto de estas bacterias en el control de ciertas especies de *Xanthomonas* spp. (Ednar et al., 2002; Massomo et al., 2004).

## 2.3 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

En estudios realizados por Hiltner (1904), se evidenció que la porción de suelo de la rizósfera era de 10 a 100 veces más rica en microorganismos que el suelo a granel (Lugtenberg y Kamilova, 2009). La rizósfera es aquella porción del suelo influenciada por las raíces de las plantas, las cuales liberan una serie de exudados como vitaminas, ácidos grasos, aminoácidos y azúcares, que atraen y sirven como nutrientes y fuente energética para microorganismos (Beneduzi et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Shukla, 2019). Las bacterias que colonizan esta zona son conocidas como rizobacterias, las cuales se clasifican en tres grupos; benéficas, nocivas y neutras, según la interacción y efecto que tengan sobre la planta. Aquellas pertenecientes al grupo de benéficas, son conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), en donde predominan especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus* (Beneduzi et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Shukla, 2019). Algunos estudios se han realizado en

diversos cultivos para determinar el potencial de estas PGPR en la agricultura (Tabla 3).

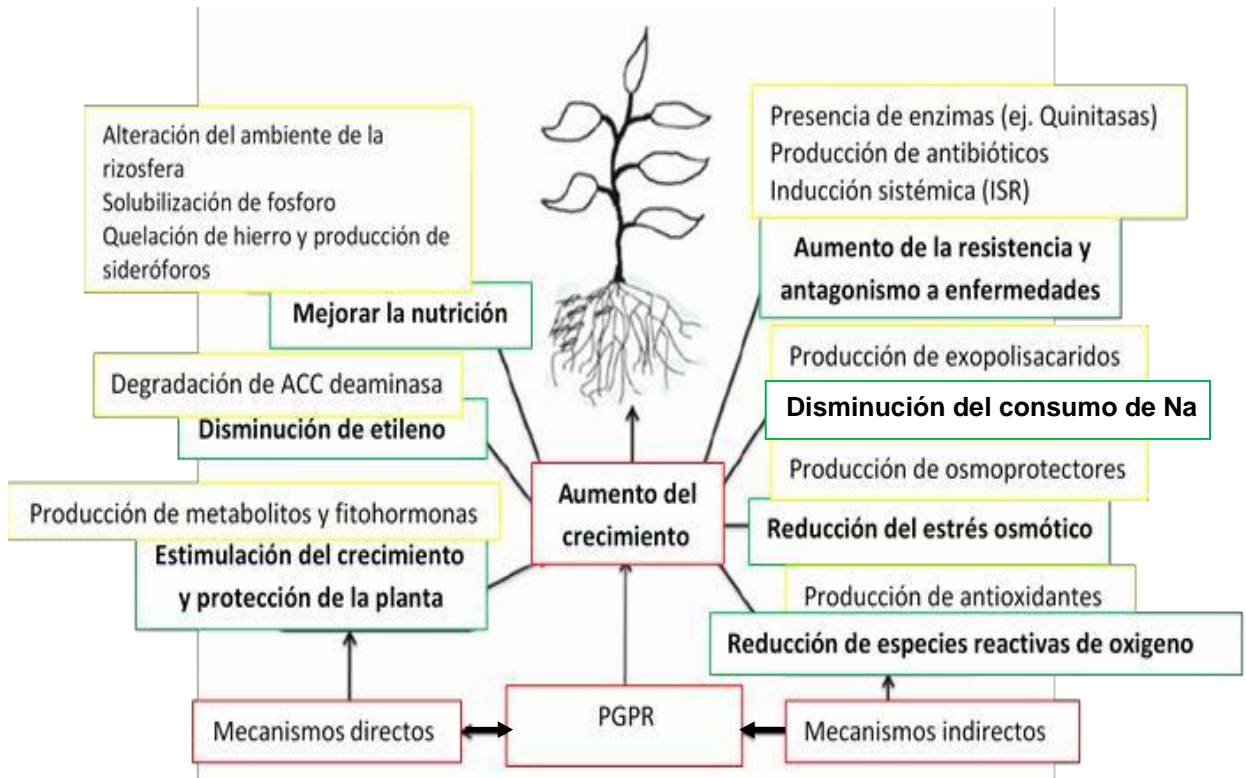
**Tabla 3.** PGPR y su potencial en la agricultura

<b>Especies bacterianas</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Actividad</b>
<i>Azospirillum sp.</i>	<i>Zea mays</i>	Fijación de N <sub>2</sub> (rizósferica)
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Fijación de N <sub>2</sub> (rizósferica)
<i>Agrobacterium sp.</i>	<i>Lactuca sativa</i>	Producción de AIA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Glycine max</i>	Producción de citoquininas
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Producción de fosfato
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	Prevención de Mildesos

(Modificada de Shukla, 2019)

De acuerdo con su relación e interacción con las raíces, las PGPR se dividen en dos grupos; extracelulares (ePGPR) e intracelulares (iPGPR) (Gray y Smith, 2005; Shukla, 2019). Las ePGPR son bacterias que se encuentran en la rizosfera y en los espacios de las células de la corteza de la raíz, por el contrario, las iPGPR se encuentran presentes dentro de las células de las plantas e inclusive algunas en estructuras especializadas de las células de la raíz conocidas como nódulos, en donde encontramos especialmente bacterias asociadas a la fijación de nitrógeno (Gray y Smith, 2005; Shukla, 2019).

Del mismo modo las PGPR pueden tener dos mecanismos de acción sobre el crecimiento de las plantas (figura 9); un modo directo, relacionado con mecanismos que facilitan la absorción y asimilación de ciertos elementos como el fósforo, o producción de sustancias claves para el desarrollo, como fitohormonas (AIA, citoquininas) y un modo indirecto, en donde las PGPR ofrecen una protección a la planta frente a fitopatógenos, ya sea por la secreción de sustancias antimicrobianas o por inducción de resistencia (Figura 9) (Beneduzi et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Shukla, 2019).



**Figura 9.** Mecanismos utilizados por las PGPR para mejorar el crecimiento vegetal (Modificada de Nadeem et al., 2013).

### 2.3.1 Solubilización de fósforo

El fósforo es el segundo elemento más importante que limita el crecimiento de las plantas, después del nitrógeno, sin embargo, es un elemento de difícil asimilación para éstas, debido a que en el suelo casi el 99% se encuentra insoluble, inmovilizado o precipitado, estado en el cual no es disponible para las plantas (Ahemad y Kibret, 2014; Shukla, 2019). Esta característica representa un problema para los agricultores, dada la dificultad para proveer este nutriente a la planta, ya que el uso de fertilizantes a base de fósforo tiene un costo alto y varios problemas de contaminación ambiental (Ahemad y Kibret, 2014; Shukla, 2019).

Las PGPR, surgen como una alternativa, debido a que se conoce su acción en la solubilización y mineralización de fósforo. Para la solubilización, los microorganismos especialmente producen y liberan ácidos orgánicos al medio, los cuales acidifican las células y su entorno circundante, disminuyendo el pH del suelo y permitiendo la liberación del fósforo debido a la sustitución por H<sup>+</sup> de los cationes de hierro, calcio y

aluminio que se encuentran precipitando el fósforo. Sin embargo, los ácidos orgánicos no son la única forma de solubilización, algunos microorganismos utilizan la producción de sideróforos, de H<sub>2</sub>S, de nitratos y CO<sub>2</sub> (Alori et al., 2017; Sharma et al., 2013).

Otro mecanismo conocido en las PGPR es la mineralización de fósforo, en este proceso las rizobacterias producen una serie de enzimas, las más conocidas y estudiadas son las fosfatasas, especialmente fosfatasas ácidas, que catalizan la hidrólisis de ésteres fosfóricos llevando a la mineralización del fósforo orgánico. Otras enzimas de gran importancia son las fitasas, las cuales liberan el fósforo que se almacena en forma de fitato, el cual no es disponible para las plantas (Alori et al., 2017; Sharma et al., 2013). Tanto la mineralización como la solubilización de fósforo pueden darse por una misma cepa bacteriana y actuar de manera aditiva (Ahemad y Kibret, 2014; Shukla, 2019).

### **2.3.2 Producción de fitohormonas**

Un 80% de microorganismos aislados de la rizósfera de cultivos tienen la capacidad de producir auxinas como el ácido indol acético (AIA) que es un metabolito secundario (Ahemad y Kibret, 2014).

El AIA juega un papel muy importante en la interacción planta-microorganismo debido a que afecta la concentración endógena de esta hormona alterando algunos procesos de la planta; esta afectación depende especialmente de la concentración y nivel de producción. La raíz es una de las zonas de la planta más sensible a estas concentraciones, respondiendo con alargamiento de la raíz primaria, producción de raíces laterales o adventicias o inclusive inhibición del crecimiento (Ahemad y Kibret, 2014; Patten y Glick, 1996).

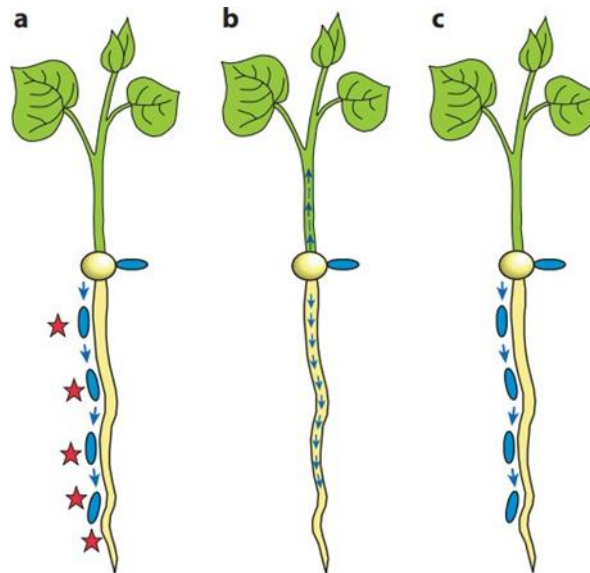
El AIA está implicado casi en todos los procesos de crecimiento, desarrollo y respuestas de defensa de la planta, en gran medida debido a la complejidad de sus vías biosintéticas, de señalización y transporte (Ahemad y Kibret, 2014). El AIA de las plantas, interfiere en funciones como: división y diferenciación de células vegetales,

estimulación de la germinación de semillas, aumento del desarrollo de la raíz incluyendo la formación de raíces laterales, resistencia a condiciones de estrés además de un efecto sobre la fotosíntesis y formación de pigmentos (Ahemad y Kibret, 2014). Por otro lado, el AIA producido por las bacterias, mejora el desarrollo de la raíz, aumentando su área superficial y longitud, facilitando la asimilación de nutrientes, adicionalmente las bacterias se ven beneficiadas debido a que esta auxina también afloja las paredes celulares de la raíz, mejorando la liberación de exudados de los cuales las rizobacterias se nutren (Ahemad y Kibret, 2014).

La regulación en la producción de esta hormona se da gracias al triptófano, debido a que actúa como precursor. En los microorganismos se conocen más de seis rutas de señalización para la producción de AIA que en su mayoría utilizan el triptófano como precursor y su variación se basa especialmente en los intermediarios de dichas rutas de las cuales las más comunes y conocidas en procariontes son la vía del indol-3-acetamida IAM e indol-3-piruvato IPyA en donde utilizan como intermediarios la indolacetamida y ácido-indol-3-pirúvico respectivamente (Cassan et al., 2013; Marschner y Rengel, 2012).

### **2.3.3 Supresión de fitopatógenos (control biológico)**

Los microorganismos pueden actuar como agentes de control biológico disminuyendo la incidencia y/o severidad de la enfermedad, o como antagonistas directos del mismo. Los mecanismos mediante los cuales las bacterias logran este efecto pueden ser: 1. síntesis de enzimas que actúan sobre componentes de la pared celular de hongos como quitinasas, lipasas, glucanasas y proteasas, 2. competencia por nutrientes y colonización de nichos 3. regulación de rutas como la del etileno para resistencia inducida y 4. producción de sideróforos o sustancias antimicrobianas (Figura 10) (Beneduzi et al., 2012; Singh, 2019).



**Figura 10.** Mecanismos de control biológico en plantas, mediados por rizobacterias. (a) Antibiosis, la rizobacteria coloniza el sistema radicular y produce antibióticos que no permiten la colonización del patógeno (estrellas rojas), (b) ISR resistencia sistémica inducida, protección de otras partes de la planta no afectadas directamente por el patógeno por activación de genes, (c) competencia por nutrientes y nichos (tomada de Lugtenberg y Kamilova, 2009).

### 2.3.3.1 Producción de sideróforos y sustancias antimicrobianas

La producción de sideróforos, de bacteriocinas y/o antibióticos, son una de las formas más efectivas que tienen las rizobacterias para ejercer una actividad antagónica frente a fitopatógenos.

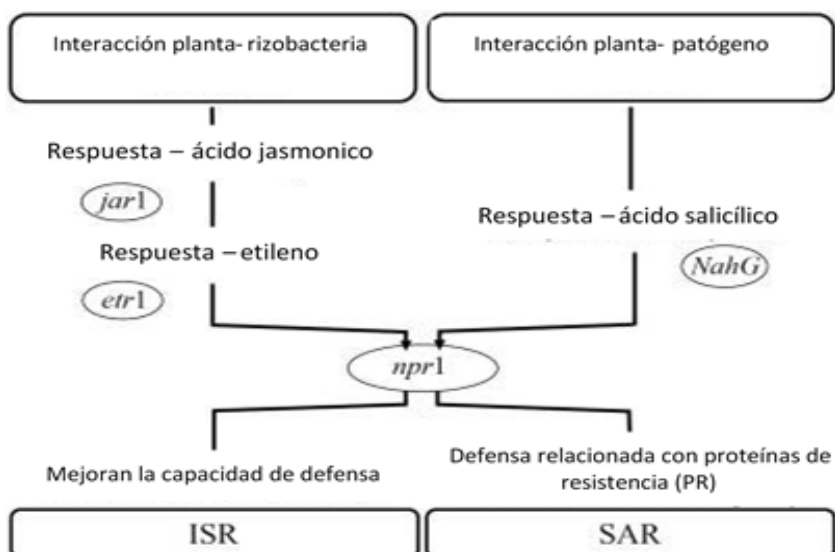
Los sideróforos son quelantes de hierro de bajo peso molecular producidos por los microorganismos con el fin de permitir la absorción de este metal, dado que las formas en las que el hierro se encuentra de forma natural en el suelo ( $Fe_2$  y  $Fe_3$ ) no son disponibles para organismos biológicos.

Esto les genera una ventaja por una competencia de nutrientes, especialmente en suelos deficientes en hierro, generando supresión de otros microorganismos (Beneduzi et al., 2012).

La producción de sustancias antimicrobianas es uno de los mecanismos más conocidos y relacionados con las PGPR, su modo de acción es mediante síntesis y degradación de paredes celulares del patógeno, inhibición en la formación de la subunidad ribosomal, inhibición de producción de esporas o zoosporas, entre otras. Existen seis grupos de compuestos de antibióticos; fenocitos, cloroglucinoles, piroluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos y cianuro de hidrógeno, y los biosurfactantes lipopeptídicos producidos especialmente por especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus* (Beneduzi et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009).

### **2.3.3.2 Resistencia sistémica inducida (ISR)**

Muchos microorganismos no patógenos son capaces de suprimir enfermedades en plantas mediante dos mecanismos, la resistencia sistémica inducida (ISR) y la resistencia sistémica adquirida (SAR). ISR y SAR son sistemas de defensa en la planta que se diferencian por el origen de la interacción y las rutas de señalización. SAR se activa mediante la ruta del ácido salicílico tras el reconocimiento de patógenos, mientras que ISR lo hace por la vía de señalización del ácido jasmónico y el etileno por estimulación de microorganismos PGPR (figura 11). Se sabe que la resistencia obtenida por ISR es menor a la obtenida en SAR, sin embargo, ambas rutas pueden actuar de manera aditiva siendo suficientes para inducir protección (Beneduzi et al., 2012; Lugtenberg y Kamilova, 2009). Los géneros de rizobacterias más estudiados en ISR son *Pseudomonas* y *Bacillus* en plantas como *Arabidopsis* (Beneduzi et al., 2012).



**Figura 11.** Vías de transducción de señales que conducen a la resistencia adquirida sistémica (SAR) inducida por patógenos y la resistencia sistémica inducida (ISR) mediada por rizobacterias en *Arabidopsis thaliana* (Modificada de Beneduzi et al., 2012).

Varios estudios en diferentes cultivos afectados por múltiples patógenos, se han llevado a cabo para establecer el efecto de las rizobacterias en la protección frente a estas enfermedades mediante ISR, algunos de estos estudios y resultados se muestran a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4.** Diferencia porcentual promedio en la enfermedad y el rendimiento en relación con un control no tratado en experimentos de campo usando cepas de PGPR y pesticidas para controlar las enfermedades de los cultivos.

Cultivo	Patógeno	Cepa de PGPR	Enfermedad (+/- %)		Rendimiento (+/- %)		Comentarios
			ISR	Pesticida	ISR	pesticida	
Arroz	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PFI	-51	-54	+25	+14	Síntomas foliares
Cereal	<i>Sclerospora glaucum</i> (Mildeo)	<i>Bacillus pumilus</i> T4	-63	-87	+40	NA	
Tomate	Virus moteado del tomate	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IN937a	-58	NA	+19	NA	Síntomas foliares
Pepino	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lactymans</i>	<i>Serratia marcescens</i> 90-166	-89	-53	+35	+5	Síntomas foliares

NA: No disponible

(Modificada de Vallad y M. Goodman, 2004)

## 2.4 Bacterias aerobias formadoras de endospora (BAFEs)

El género *Bacillus* se encuentra dentro de la familia Bacillaceae, clase Bacilli, phylum Firmicutes y dominio Bacteria. Actualmente más de 200 especies divididas en aproximadamente 25 géneros de *Bacillus* han sido clasificadas (Fritze, 2004; Garrity et al., 2003).

*Bacillus* es un género de bacterias Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas, empleadas en el área de la biotecnología, medicina y agricultura, debido a su versatilidad y estabilidad (Radhakrishnan et al., 2017). En el área agrícola es uno de los géneros bacterianos más estudiados dada su contribución a la productividad de los cultivos agrícolas, en gran medida por su capacidad de sobrevivir en el suelo y adaptarse a diversas condiciones, colonizando la rizosfera y generando una interacción planta- benéfica para el crecimiento vegetal (Choudhary y Johri, 2009; Gardener, 2004).

Esta capacidad de *Bacillus*, se debe especialmente a rasgos metabólicos y estructurales como: pared celular con múltiples capas, secreción de antibióticos y enzimas extracelulares, motilidad y uno de los rasgos más importantes en la mayoría de las especies, la formación de una endospora de resistencia, que le permite sobrevivir en condiciones adversas (Choudhary y Johri, 2009; Gardener, 2004; Radhakrishnan et al., 2017).

Dentro de los atributos y modos de acción que han sido descritos en las especies de *Bacillus* de interés agrícola, se encuentran mecanismos directos e indirectos, muchos de estos ya mencionados anteriormente, como solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, producción de fitohormonas, formación de biopelículas, producción de exopolisacáridos, lipopéptidos y sustancias antimicrobianas e inducción de resistencia sistémica (ISR) (Gardener, 2004; Tiwari et al., 2019). Varios estudios realizados sobre el efecto biofertilizante de diferentes especies de *Bacillus* spp. han sido publicados, permitiendo estimar los mecanismos de acción utilizados y las especies involucradas. (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto Biofertilizante de *Bacillus* spp. en cultivos de plantas.

<b>Especies de <i>Bacillus</i></b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b><i>B. insolitus</i>; <i>B. subtilis</i>; <i>B. methylotrophicus</i></b>	Incremento de longitud y biomasa de brotes, raíces y hojas
<b><i>B. megaterium</i>; <i>B. subtilis</i></b>	Aumento en el rendimiento de frutas y granos.
<b><i>B. pumilus</i>; <i>B. megaterium</i></b>	Solubilización P y fija N en el suelo, e incrementa su transporte a las raíces
<b><i>B. subtilis</i>; <i>B. methylotrophicus</i></b>	Síntesis de hormonas de crecimiento vegetal (IAA, GAs, citoquininas y espermidinas)
<b><i>B. subtilis</i>; <i>B. mojavensis</i></b>	Secreción ACC deaminasa para inhibir senescencia en las plantas
<b><i>B. megaterium</i>; <i>B. methylotrophicus</i></b>	Mejora de las proteínas endógenas, aminoácidos, azúcares, pigmentos fotosintéticos y minerales (K, Mg, Na, P, Fe, Zn y N) en las plantas.

(Modificada de Lebeda et al., 2014).

De igual forma, las especies más conocidas y estudiadas por su acción antagónica frente a otros microorganismos son: *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, y *B. pumilus*, su capacidad de supresión se basa principalmente en la producción de toxinas, antibióticos, enzimas degradadoras como quitinasas, y glucanasas y competencia por nutrientes y nicho, en donde cepas de *B. megaterium*, muestran una gran actividad, dada su capacidad de motilidad para colonizar las raíces (Choudhary y Johri, 2009). Adicionalmente especies como *B. thuringensis* y *B. sphaericus*, son patógenos de insectos y algunos nemátodos. (Choudhary y Johri, 2009; Gardener, 2004).

Algunas investigaciones se han realizado para evaluar el efecto de *Bacillus* spp. en la promoción de crecimiento en lechuga como alternativa que disminuya el uso de fertilizantes químicos. Galelli et al., (2015), evaluaron el efecto por separado de la aplicación de inóculos y *biofilm* de *B. subtilis* subsp. *spizizenni* sobre semillas de lechuga. Los tratamientos de semillas sumergidas en inóculos líquidos a una concentración de

$1 \times 10^8$ UFC/mL, mostraron un incremento del 57% para biomasa aérea y el 76% para biomasa de raíz, en comparación con el control. Por otro lado, los tratamientos con *biofilm*, los cuales fueron realizados colocando en contacto las semillas con el *biofilm* previamente recuperado de los mismos cultivos líquidos del inóculo, pero con 96 h más de incubación y ajustados a una concentración igual de  $1 \times 10^8$ UFC/mL mostraron un incremento del 39% en la parte aérea y del 59% en raíz, en comparación con los inóculos líquidos, siendo mejor el tratamiento con *biofilm* para la promoción vegetal en plantas de lechuga. Los autores sugieren que en la formación de *biofilm* los metabolitos producidos por las bacterias son diferentes a los de la fase líquida del inóculo, adicionalmente un contacto más cercano entre las bacterias y las semillas se puede lograr con un sistema de inmovilización como lo son los *biofilm*.

Por otro lado, Pishchik et al. (2016), evaluaron el efecto por separado y en conjunto de una cepa de *B. subtilis* y la aplicación de un fertilizante húmico sobre parámetros como: biomasa fresca, biomasa seca, contenido total de nitrógeno y contenido de clorofila. En los resultados obtenidos encontraron un efecto sinérgico en el tratamiento combinado, mejorando características como contenido total de nitrógeno y contenido de clorofila, sin embargo, el efecto contrario se observó para la biomasa, debido a que en el tratamiento sinérgico disminuyó la concentración de *B. subtilis* y por lo tanto la producción de AIA. El efecto por separado de cada tratamiento mostró un incremento significativo en la calidad y el crecimiento de la planta en el tratamiento con *B. subtilis*, por el contrario, el tratamiento con fertilizante húmico disminuyó algunos parámetros y no tuvo efecto positivo.

Estas investigaciones abren un panorama al uso de PGPR en el cultivo de lechuga, con el fin de disminuir el uso de fertilizantes y pesticidas químicos y mejorar la promoción vegetal y la protección a fitopatógenos en el cultivo, aumentando la productividad y el rendimiento.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Evaluación de los aislamientos de BAFEs como promotoras de crecimiento vegetal

#### 3.1.1 Caracterización bajo condiciones de invernadero

##### 3.1.1.1 Aislamientos bacterianos y producción de inóculos

A partir de la colección de cepas de bacterias aerobias formadoras de endospora del grupo de microbiología agrícola del Instituto de Biotecnología, aisladas previamente de suelo rizosférico de cultivos de papa criolla (*Solanum tuberosum* grupo Phureja) de 7 fincas del departamento de Cundinamarca-Colombia en un estudio realizado por Flórez-Zapata y Uribe-Vélez (2011), se realizaron los aislamientos correspondientes en agar tripticasa de soya (TSA), evaluando viabilidad y pureza (tabla 6).

**Tabla 6.** Colección de cepas de suelo rizosférico de cultivos de papa criolla.

1p-03	2p-01	2p-06	3p-04	3p-09	4p-07	5p-08	6p-03	6p-07	7p-03
1p-06	2p-02	2p-08	3p-05	4p-02	4p-08	5p-09	6p-04	6p-08	7p-05
1p-07	2p-03	2p-09	3p-06	4p-03	5p-02	5p-10	6p-05	6p-09	7p-07
1p-08	2p-04	3p-01	3p-07	4p-04	5p-04	6p-01	6p-06	6p-10	7p-08
1p-09	2p-05	3p-02	3p-08	4p-05	5p-05	6p-02	6p-07	7p-01	7p-10

Para la preparación de los inóculos, a partir de los bancos conservados, se sembraron los aislamientos en medio sólido TSA y se incubaron por 24 h a 25 °C, transcurrido este tiempo, una asada de cada cepa fue tomada y puesta en medio de esporulación (glucosa 3g, triptona 7g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,088g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,028g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8g, MgSO<sub>4</sub>

.7H<sub>2</sub>O 0,12g, MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,002g, ZnSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0,014g, por litro de agua destilada estéril (ADE) por 5 días a 25°C y 150 rpm. Pasados los 5 días, los medios fueron desmontados y mediante tinción con cristal violeta se verificó un porcentaje de esporulación mayor al 95%, posteriormente los inóculos se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL y se calentaron a 80 °C por 15min; con el fin de eliminar las células vegetativas. Los tubos se centrifugaron por 8 min a 8,500 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 20 mL de ADE, una vez finalizado el lavado de células, los inóculos se transfirieron a frascos ámbar y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Para determinar la concentración de cada inóculo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta 10<sup>-6</sup>, sembrando por triplicado en medio TSA las diluciones 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> mediante la técnica de conteo de siembra en microgota, las cajas se incubaron a 25 °C por 24 h y se realizó conteo de esporas viables, utilizando la fórmula de unidades formadoras de colonia.

### 3.1.1.1 Inoculación de semillas

Para todos los ensayos de invernadero, semillas de lechuga Batavia var. Altamira fueron desinfectadas según la metodología descrita por Radhakrishnan y Lee (2016), posteriormente cuarenta semillas se embebieron en 5 mL del inóculo de BAFEs descrito en el punto 3.1.1.1, ajustado a 1x10<sup>7</sup> esporas/mL, se dejaron en agitación constante durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dos semillas fueron sembradas en cada matera, posteriormente 5 mL de la suspensión bacteriana fueron adicionados en el sitio de la siembra. El control consistió en semillas embebidas en ADE por 30 minutos.

Para la preparación de los inóculos, a partir de los bancos conservados, se sembraron los aislamientos en medio sólido TSA y se incubaron por 24 h a 25 °C, transcurrido este tiempo, una asada de cada cepa fue tomada y puesta en medio de esporulación (glucosa 3g, triptona 7g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,088g, FeSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0,028g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8g, MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0,12g, MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,002g, ZnSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0,014g, por litro de agua destilada estéril (ADE) por 5 días a 25°C y 150 rpm. Pasados los 5 días, los medios fueron desmontados y mediante tinción con cristal violeta se verificó un porcentaje de esporulación mayor al 95%, posteriormente los inóculos se transfirieron a tubos Falcon

de 50 mL y se calentaron a 80 °C por 15min; con el fin de eliminar las células vegetativas. Los tubos se centrifugaron por 8 min a 8,500 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 20 mL de ADE, una vez finalizado el lavado de células, los inóculos se transfirieron a frascos ámbar y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

Para determinar la concentración de cada inóculo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta  $10^{-6}$ , sembrando por triplicado en medio TSA las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  mediante la técnica de conteo de siembra en microgota, las cajas se incubaron a 25 °C por 24 h y se realizó conteo de esporas viables, utilizando la fórmula de unidades formadoras de colonia.

### **3.1.1.2 Inoculación de semillas**

Para todos los ensayos de invernadero, semillas de lechuga Batavia var. Altamira fueron desinfectadas según la metodología descrita por Radhakrishnan y Lee (2016), posteriormente cuarenta semillas se embebieron en 5 mL del inóculo de BAFEs descrito en el punto 3.1.1.1, ajustado a  $1 \times 10^7$  esporas/mL, se dejaron en agitación constante durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo dos semillas fueron sembradas en cada matera, posteriormente 5 mL de la suspensión bacteriana fueron adicionados en el sitio de la siembra. El control consistió en semillas embebidas en ADE por 30 minutos.

### **3.1.1.3 Ensayos de invernadero**

Las condiciones de siembra para todos los ensayos consistieron en materas con 100 g de turba libre de nutrientes, las semillas se dejaron por un periodo de siembra de 35 días y las variables de respuesta evaluadas al final de los ensayos fueron longitud y peso seco de vástago y raíz. Para el peso seco después del lavado de las raíces, las plantas se guardaron en bolsas de papel y se mantuvieron en horno a 60°C por 5 días. Los ensayos se desarrollaron en los invernaderos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Para la primera evaluación de las 50 cepas seleccionadas de la colección del Instituto de Biotecnología, se montó un ensayo factorial simple generalizado en bloques completos y

aleatorizados, se montaron 5 ensayos en tiempos diferentes, cada uno con 10 cepas más el control. El régimen de fertilización para este ensayo consistió en 10 mL/planta de solución de Hoagland ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M,  $\text{KNO}_3$  1M,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2M,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , EDTA de hierro, solución de micronutrientes:  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{MnO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) al 5% (tabla 7) día de por medio.

**Tabla 7.** Composición solución de Hoagland

Solución	VOLUMEN *1L al 100%	Volumen *1L al 5%
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 mL	0,05 mL
$\text{KNO}_3$	5 mL	0,25 mL
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5 mL	0,25 mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 mL	0,1 mL
EDTA de hierro	1 mL	0,05 mL
Solución de micronutrientes	1 mL	0,05 mL

Los mejores tratamientos del ensayo anterior fueron seleccionados para un segundo montaje de invernadero en un diseño factorial completo aleatorizado. Este montaje contó con dos tipos de fertilización; el primero con solución de Hoagland modificada con 100% de fósforo soluble como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y el segundo, solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo soluble y en su lugar roca fosfórica en una dosis de 4,96 g/planta completando la fertilización de P requerida para plantas de lechuga (Theodoracopoulos, 2009).

Un tercer ensayo con el mismo diseño se montó realizando una variación respecto a la dosis de fósforo, para este caso se utilizó solución de Hoagland con 100% de fósforo como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y otra dosis con solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble más roca fosfórica empleando una dosis de 1,93 g/planta para completar la fertilización de P requerida.

Para todos los ensayos de invernadero se realizó una prueba de MANOVA con el fin de determinar la influencia e interacción de los factores implicados. Se probó normalidad y homocedasticidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y Levene para homocedasticidad, la prueba de homogeneidad de varianza se hizo a partir de la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

### 3.1.2 Caracterización bajo condiciones *in vitro*

### 3.1.2.1 Preparación de inóculos

Para los ensayos *in vitro* se prepararon inóculos de aquellas BAFEs que mostraron capacidad promotora en la primera evaluación bajo condiciones de invernadero. Los aislamientos fueron reactivados en medio TSA a partir de los crioviales de conservación a -20°C, posteriormente una colonia fue transferida a medio líquido Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0,5%) y se dejó en agitación constante toda la noche aproximadamente 16 horas a 125 rpm y 28°C.

Transcurrido el tiempo, los caldos se centrifugaron a 8000 xg por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en NaCl al 0,85% (P/V), después de dos lavados, los inóculos se ajustaron a una densidad óptica de 0.2 a 600nm.

### 3.1.2.2 Solubilización de fosfato

Para evaluar la capacidad de los aislamientos de BAFEs para solubilizar fosfatos, se empleó el método analítico Spectroquant® Fósforo de Merck.

Inicialmente se prepararon 15 mL de medio líquido NBRIP (Glucosa 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1g, KCL 0,2g, MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O 0,25g, MgCl<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O 5g por litro de ADE) suplementado con fosfato tricálcico al 0,1% (P/V), posteriormente los medios se inocularon con 150 µL del inóculo descrito en el punto 3.1.2.1

Los medios se incubaron en agitación constante a 150 rpm y 28 °C por 5 días. Transcurrido este tiempo, 1 mL del medio fue centrifugado a 4.656 g durante 15 minutos, 240 µL del sobrenadante fueron transferidos a 750µL de ADE, posteriormente se adicionaron 240 µL del reactivo Spectroquant® Fósforo de Merck, finalmente de mezclar homogéneamente se transfirieron 200 µL a los pozos de placa para analizar en el lector de microplacas para leer a 405 nm.

Como control positivo se utilizó la cepa *Pseudomonas fluorescens* Pfls 095 y como control negativo medio NBRIP sin inocular.

### 3.1.2.3 Producción de compuestos indólicos

Para determinar la producción de compuestos indólicos, se realizó la prueba colorimétrica de Salkowsky. Para esta prueba se prepararon 9 mL de medio líquido LB suplementado con 1 mL de triptófano a una concentración de 3 mM, los medios fueron inoculados con 100 µL de la suspensión bacteriana y se incubaron por 3 días a 150rpm y 28 °C. Posteriormente los medios fueron centrifugados a 9503 g durante 2 minutos, 700 µL del sobrenadante fueron mezclados con 700 µL de reactivo de Salkowsky, la mezcla se dejó incubando por 30 minutos bajo condiciones de oscuridad, transcurrido este tiempo se pasaron al lector de microplacas y su absorbancia fue leída a 540 nm.

Como control positivo se utilizó la cepa *Azospirillum brasilensis* y como control negativo medio LB con triptófano sin inocular.

### 3.1.2.4 Mineralización de ácido fítico

Para evaluar la capacidad de los aislamientos para mineralizar ácido fítico, se realizó una prueba cualitativa en medio sólido NBRIP ajustado a pH 7.0, el cual fue suplementado con ácido fítico al 1% (P/V) como fuente de fósforo orgánico- Los medios fueron inoculados de manera equidistante con 10 µL de los inóculos descritos en el punto 3.1.2.1, cada siembra se realizó por triplicado. Las cajas se incubaron por 5 días a 28°C, transcurrido este tiempo, se realizó una lectura del crecimiento de las colonias y formación de halos.

Como control positivo se utilizó la cepa *Pseudomonas fluorescens* Pfls 095 y control negativo ADE. La eficiencia de la mineralización (EM) se estimó utilizando la metodología propuesta por Kandil (2017):

$$EM = \frac{\text{Diámetro}}{\text{Diámetro de la colonia}} \times 100$$

Se probó Normalidad y Homocedasticidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y Levene para homocedasticidad, para la prueba de homogeneidad de varianzas se utilizó la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

## **3.2 Caracterización de los aislamientos de BAFEs según su actividad antagónica frente a *Xanthomonas campestris* pv *vitians***

### **3.2.1 Aislamiento e identificación de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians***

Para la obtención de aislamientos de *Xcv* se recolectaron muestras de lechuga de tipo Romana, Crespa y Batavia con síntomas foliares presuntivos de BLS centro agropecuario de Marengo de la Universidad Nacional de Colombia ubicado en Mosquera-Cundinamarca, las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento.

A partir de las hojas recolectadas, se pesaron 2 gramos de muestra y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% por 1 minuto, alcohol al 70% por 1 minuto y finalmente un lavado con agua destilada por 3 minutos, posteriormente cada muestra se maceró en 1 mL ADE. A partir de la maceración se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta  $10^{-4}$ , las tres últimas diluciones fueron sembradas por triplicado en medio MMG (Toussaint et al., 2001) y se incubaron durante 72 horas a 27°C.

Transcurrido el tiempo de incubación las colonias con características macroscópicas de color verde fueron seleccionadas y sembradas nuevamente por agotamiento en medio MMG para la ejecución de pruebas bioquímicas. Las pruebas consistieron en: tinción de Gram, catalasa, oxidasa, Hugh y Leifson, TSI, crecimiento en agar YDC y King B y por último crecimiento a 37°C.

Los aislamientos que cumplieron con las características bioquímicas y morfológicas típicas de *Xanthomonas campestris*, se conservaron a -20°C y -80°C en medio LB con glicerol al 20%.

### **3.2.1 Ensayos de patogenicidad**

Para los ensayos de patogenicidad, semillas de la variedad Parris Island se desinfectaron y sembraron en materas. Pasados 30 días las plantas con 4 hojas verdaderas fueron inoculadas con cada uno de los aislamientos, la inoculación se realizó mediante el

método ISTA (international Seed Testing Association), tomando una colonia con alfiler entomológico estéril de las cepas presuntivas de *Xcv* crecidas en medio LB por 24 horas, seis punciones fueron realizadas sobre las nervaduras de cada hoja. Posterior a la inoculación, las plantas se regaron y se cubrieron con bolsas plásticas transparentes durante 3 días. Pasado este tiempo se retiraron las bolsas y las plantas fueron dejadas a condiciones de invernadero durante dos semanas para la evaluación de las variables de incidencia y severidad.

El montaje consistió en un diseño completamente aleatorizado de un solo factor, con tres unidades experimentales por tratamiento. Para corroborar la presencia del patógeno en los síntomas generados sobre la planta, se realizó nuevamente el procesamiento de las hojas y siembra del macerado en medio MMG.

### 3.2.2 Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN genómico de cada aislamiento de BAFEs y los presuntivos de *Xcv* crecidos en medio LB, siguiendo la metodología de lisis alcalina (Sahoo et al., 2014). Brevemente se preparó un buffer de lisis con NaOH al 0,5 N y SDS al 5%, 50 µL del buffer fueron transferidos a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL de capacidad, una colonia de cada aislamiento crecida en agar LB fue resuspendida en el buffer, se aplicó vórtex y los tubos se calentaron a 95°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se agregaron 200 µL de agua HPLC estéril, los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se almacenó a -20 °C.

Para la identificación inicial de los aislamientos se realizó una PCR con *primers* universales para la amplificación de la subunidad 16S descrita por Lane, (1991) (1492R 5'- TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- 3' / 27F 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3'). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 3 minutos, seguido por un ciclo de elongación de 72 °C por 15 minutos. Los productos de PCR se enviaron al servicio de secuenciación y análisis molecular (SSiGMol) del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, para su respectiva purificación y secuenciación. Las secuencias se editaron usando el programa Bioedit y se realizó la identificación utilizando la base de datos GenBank del NCBI. Con las secuencias de

referencias obtenidas del banco del NCBI, se realizó un árbol filogenético en el programa MEGA 7 utilizando el método estadístico Neighbor-joining, con el fin de determinar la cercanía filogenética de los aislamientos y confirmar su identificación.

Posteriormente, aquellos aislamientos identificados como *Xanthomonas campestris*, se amplificaron utilizando el par de *primers* 9308B (5' TGC TCA GCA ATG ATG CGT 3' and 5' CGA GTT GCG CTT GAG TTA 3') descritos por (Barak, Koike, y Gilbertson, 2001), específicos para la identificación de *X. campestris* pv. *vitians*, los cuales amplifican un gen de 663 pb que codifica para la enzima glicosil hidrolasa. Las condiciones de la PCR consistieron en 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Para confirmar la amplificación del gen se realizó un gel de agarosa al 1,5% utilizando TBE y bromuro de etidio.

### **3.2.3 Evaluación de capacidad antagonica *in vitro* de los aislamientos de BAFEs contra *Xanthomonas campestris* pv. *vitians***

Con el fin de evaluar la capacidad de las 50 BAFEs seleccionadas de inhibir el crecimiento de *Xcv*, se realizaron ensayos *in vitro* en agar LB.

Para este ensayo se dejaron cultivos toda la noche aproximadamente 16 horas a 28°C y 150 rpm de las cepas de *Xcv* LC100 y LB103 en medio líquido LB. Posteriormente los cultivos se centrifugaron en tubos Falcon de 50 mL a 10.000 xg por 8 min.

El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido con agua destilada estéril, los inóculos se ajustaron a una absorbancia de 0.2 leída a 600nm que corresponde a una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente 100  $\mu$ L fueron sembrados masivamente sobre medios sólidos LB, una vez realizada esta siembra se colocaron 4 discos de papel filtro estéril, organizados de forma equidistante.

Para la siembra de las BAFEs se prepararon inóculos a una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/mL, se tomaron 10  $\mu$ L de cada inóculo y se sembraron sobre los discos de papel filtro por triplicado, utilizando como control positivo la cepa de *B. velezensis* FZB42 ó AP303 y como control negativo agua destilada estéril. Las cajas se incubaron a 28°C por

24 horas, transcurrido el tiempo, se realizó lectura de los halos de inhibición del crecimiento del patógeno alrededor de los discos de inoculación con BAFEs.

Se probó Normalidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk y Homocedasticidad con la prueba de Levene, la homogeneidad de varianza se realizó aplicando la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

### **3.2.3.1 Evaluación de la capacidad antagónica de BAFEs sobre *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens* bajo condiciones de invernadero**

Aquellos aislamientos de BAFEs que mostraron inhibición *in vitro* de *Xcv* aislamiento LC100, fueron seleccionados para la evaluación bajo condiciones de invernadero.

Para este ensayo, semillas de lechuga Batavia var. Altamira fueron desinfectadas y sembradas en materas con 100 g de turba. El ensayo consistió en un diseño simple completamente aleatorizado, con una repetición en el tiempo y un régimen de fertilización de día de por medio con solución de Hoagland al 5%.

Las plantas se dejaron crecer durante 20 días, transcurrido este tiempo se realizó la inoculación las BAFEs a una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/mL más sobrenadante diluido 1:10, en dos hojas verdaderas utilizando un aerógrafo. Para la obtención de este sobrenadante medios líquidos de LB inoculados con las cepas, se dejaron durante 48 h en agitación constante a 125 rpm y 25 °C, pasadas las 48 h los medios fueron centrifugados a 8000 g durante 20 minutos, luego se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, los sobrenadantes fueron almacenados en frascos ámbar a 4°C. Transcurridos 3 días de la inoculación con las BAFEs, las mismas hojas fueron inoculadas con *Xcv* a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL, utilizando el mismo método de inoculación. Las plantas se cubrieron con bolsas plásticas durante 3 días, transcurrido este tiempo se retiraron las bolsas y las plantas se dejaron bajo condiciones de invernadero por 20 días, evaluando incidencia y severidad. Los mejores aislamientos fueron llevados a una segunda evaluación bajo las mismas condiciones de invernadero como repetición en el tiempo, para corroborar su actividad.

Para los ensayos de antagonismo se realizó un análisis de varianza ANOVA de medidas repetidas con el fin de determinar el efecto de los tratamientos, posteriormente se realizó una prueba de intersujetos, para establecer el comportamiento de los tratamientos al final del experimento. Finalmente se realizó la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

El porcentaje de incidencia se evaluó mediante la fórmula:

$$\frac{\text{\# de hojas enfermas}}{\text{\# de hojas inoculadas} \times 100}$$

Se evaluó la severidad utilizando la escala de evaluación de la enfermedad de 1 a 5 descrita por (Carisse et al., 2000), en donde:

1= 1 a 5 manchas distintas en el margen de la hoja, 2= varias manchas con coalescencia,

3= lesiones amplias a lo largo de las nervaduras, 4= amarillamiento y leve marchitamiento de la hoja, 5= hoja muerta

El índice de severidad se determinó utilizando la fórmula:

$$\text{Índice de severidad} = \frac{(n*1) + (n*2) + (n*3) + (n*4) + (n*5)}{n}$$

En donde n = número de hojas y 1, 2, 3, 4 y 5 = escala de severidad

### **3.2 Evaluación del efecto de promoción y antagonismo en presencia o no de *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens***

Con base en los resultados obtenidos para los ensayos de promoción y antagonismo y teniendo en cuenta los resultados de la identificación molecular, un aislamiento para cada actividad fue seleccionado para el ensayo final.

El ensayo consistió en un diseño factorial completo aleatorizado. Las combinaciones y tratamientos del diseño se muestran a continuación en la tabla 8. El ensayo fue montado

bajo condiciones de invernadero durante 35 días y contó con un régimen de fertilización con solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble más roca fosfórica, empleando una dosis de 1,93 g/planta para completar la fertilización de P requerida. Como control de fertilización se utilizó un tratamiento con 100% de fósforo en solución de Hoagland.

**Tabla 8.** Diseño factorial para la evaluación de la interacción de los aislamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Cepa promotora</b>	<b>Cepa antagonista</b>	<b>Cepa LC100 de Xcv</b>
<b>T1</b>	Con	Con	Con
<b>T2</b>	Con	Con	Sin
<b>T3</b>	Con	Sin	Con
<b>T4</b>	Con	Sin	Sin
<b>T5</b>	Sin	Con	Con
<b>T6</b>	Sin	Con	Sin
<b>T7</b>	Sin	Sin	Con
<b>T8</b>	Sin	Sin	Sin

Para el análisis estadístico se realizó una prueba de MANOVA con el fin de determinar la influencia e interacción de los factores implicados. Se probó normalidad y homocedasticidad por medio de la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y Levene para homocedasticidad, la prueba de homogeneidad de varianzas se hizo a partir de la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.



## **4. Resultados y discusión**

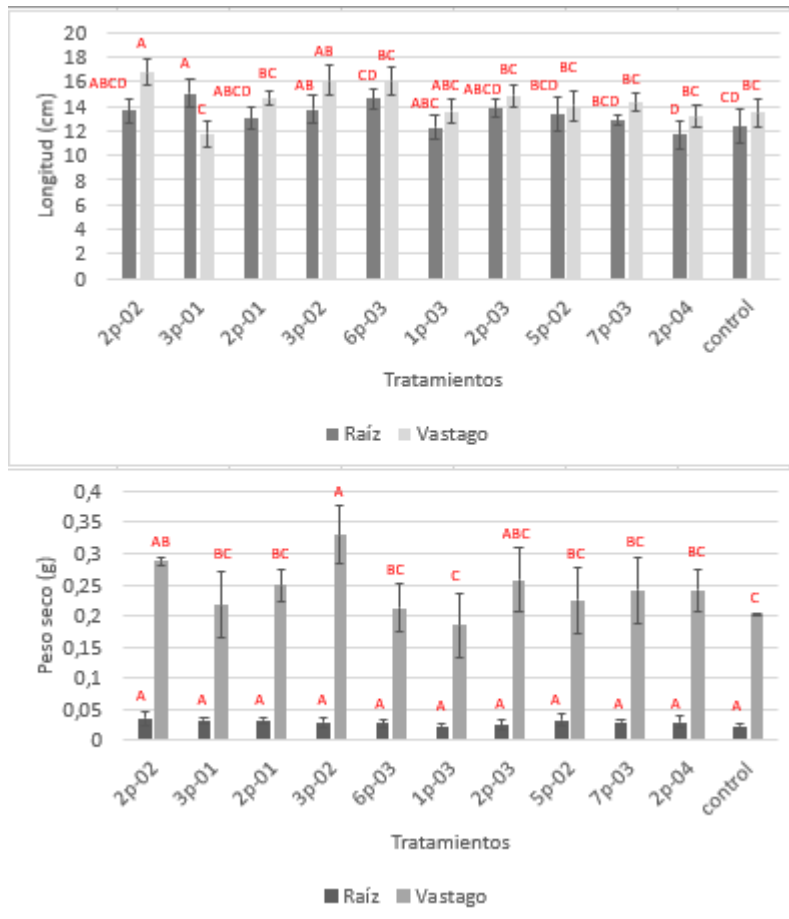
### **4.1 Caracterización de la actividad promotora de crecimiento bajo ensayos de invernadero**

Los valores de longitud y peso seco de vástago y raíz obtenidos a partir de los tratamientos con las 50 cepas del banco seleccionado, montados en tiempos diferentes, se observan a continuación en las figuras 12 a la 16, cada figura corresponde al tratamiento con cada cepa más el control. A partir del análisis estadístico MANOVA se estableció que el factor bloque no tuvo efecto sobre las variables de respuesta, siendo nula la interacción entre los dos factores (cepas y bloques), por lo que se eliminó el bloque y se realizó la prueba de Tukey para determinar los mejores tratamientos en cada uno de los ensayos.

El análisis de los ensayos se realizó de manera independiente comparando cada tratamiento con su control, esto debido a las diferencias que se presentan en los valores de las variables evaluadas en cada uno de los montajes en tiempos diferentes. El clima y las variaciones medio ambientales tiene una fuerte influencia en el desarrollo y crecimiento de las plantas, encontrando que factores como la temperatura, la concentración de CO<sub>2</sub> y la luminosidad, son aquellos que más afectan procesos como la respiración celular, la fotosíntesis y la acumulación de nutrientes, lo que se verá reflejado en variaciones de variables como longitud y peso seco de raíz y/o vástago (Gent, 2017; Pearson et al., 1997; Van Henten, 1994; Wheeler et al., 1993). Igualmente se ha estudiado el efecto del clima sobre la acción y actividad de PGPR y su interacción con las plantas. Cambios en la temperatura, la sequía y concentraciones de CO<sub>2</sub> afectan la producción de exudados y metabolitos de la planta y por lo tanto la interacción y abundancia de los microorganismos, por otro lado, condiciones de estrés modulan la

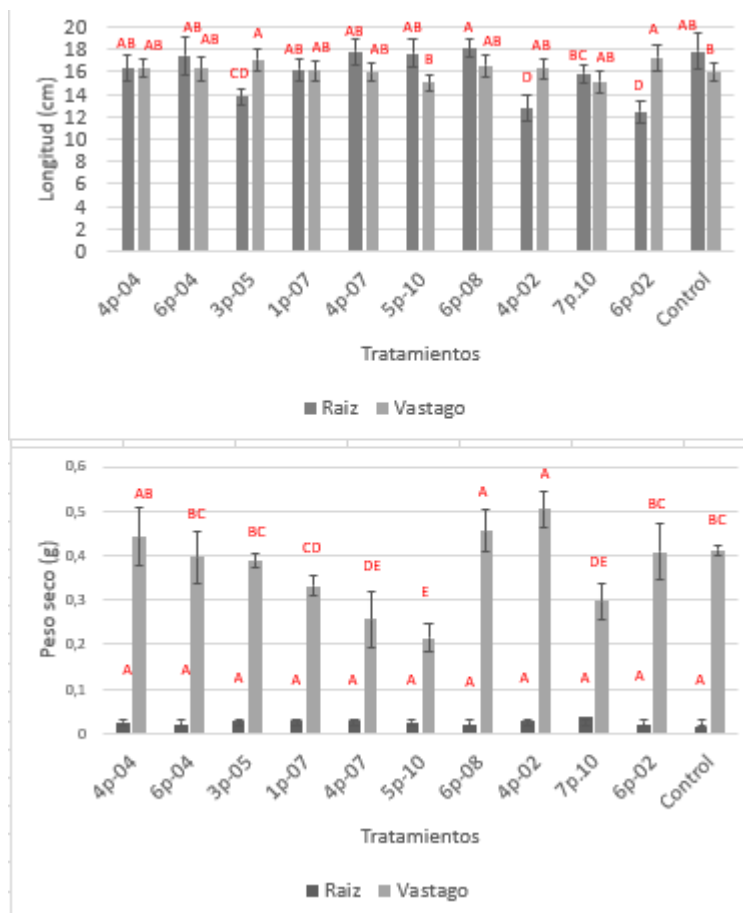
expresión de genes en las PGPR, activando vías diferentes de señalización y promoción de crecimiento (Compant et al., 2010, Sessitsch, 2010).

En el primer ensayo (figura 12), sobresalen 3 aislamientos con diferencias significativas respecto al control sin inocular. Para longitud de raíz los aislamientos 3p-01 y 6p-03 aumentaron un 22.06% y 14.03% ésta variable, para longitud de vástago se destaca el aislamiento 2p-02 con un aumento del 24.50% y en peso seco de vástago los aislamientos 2p-02 y 3p-02 aumentando en un 42.78% y un 63.9%, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la variable de peso seco raíz para ninguno de los tratamientos evaluados.



**Figura 12.** Ensayo #1, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianzas de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

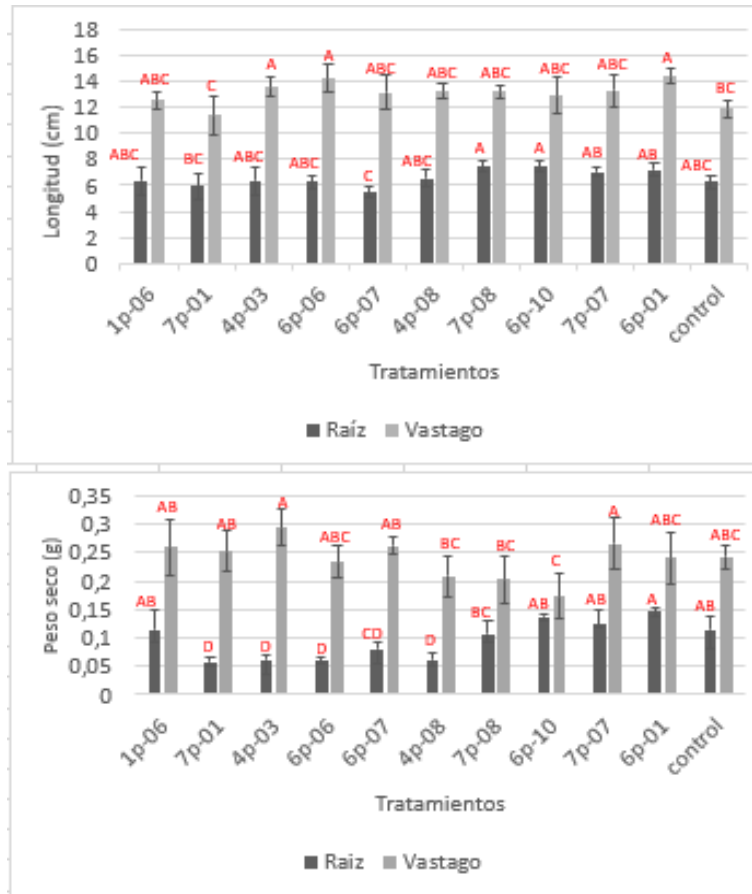
Para el segundo ensayo (figura 13), sobresalen con diferencias significativas respecto al control, el aislamiento 6p-02 para longitud de vástago con un aumento del 8.34% y los aislamientos 4p-02 y 6p-08 para peso seco de vástago con un aumento del 21.97% y 10.46%, respectivamente. No se observan diferencias significativas en las variables de longitud raíz y peso seco raíz.



**Figura 13.** Ensayo #2, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

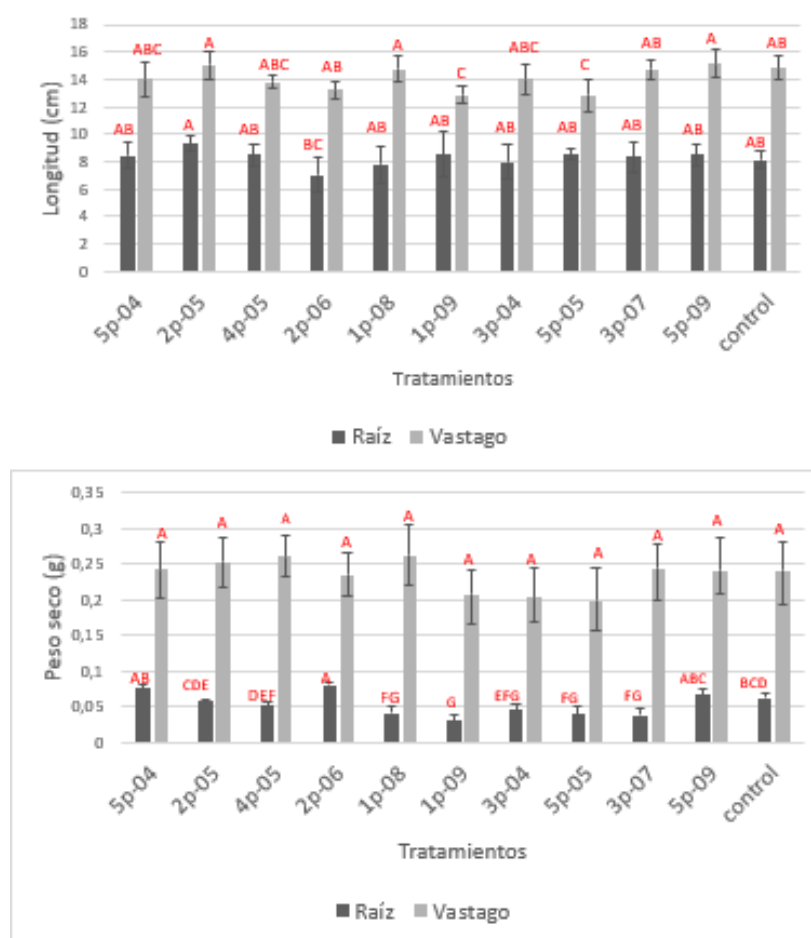
Para el tercer ensayo (figura 14), se observan diferencias significativas en las variables de longitud de vástago para los aislamientos 6p-01, 6p-06 y 4p-03 con un aumento del 21,4%, 20.15% y 14.24%, respectivamente. El aislamiento 6p-01 aumentó en un 27.8% el peso seco de raíz respecto al control. Para longitud de raíz y peso seco vástago no se observaron diferencias significativas, sin embargo, es importante indicar que para el peso seco de vástago los aislamientos 4p-03 y 7p-07 aumentaron su valor en un 21.30%

y 9.91% respectivamente, en comparación con el control sin inocular.



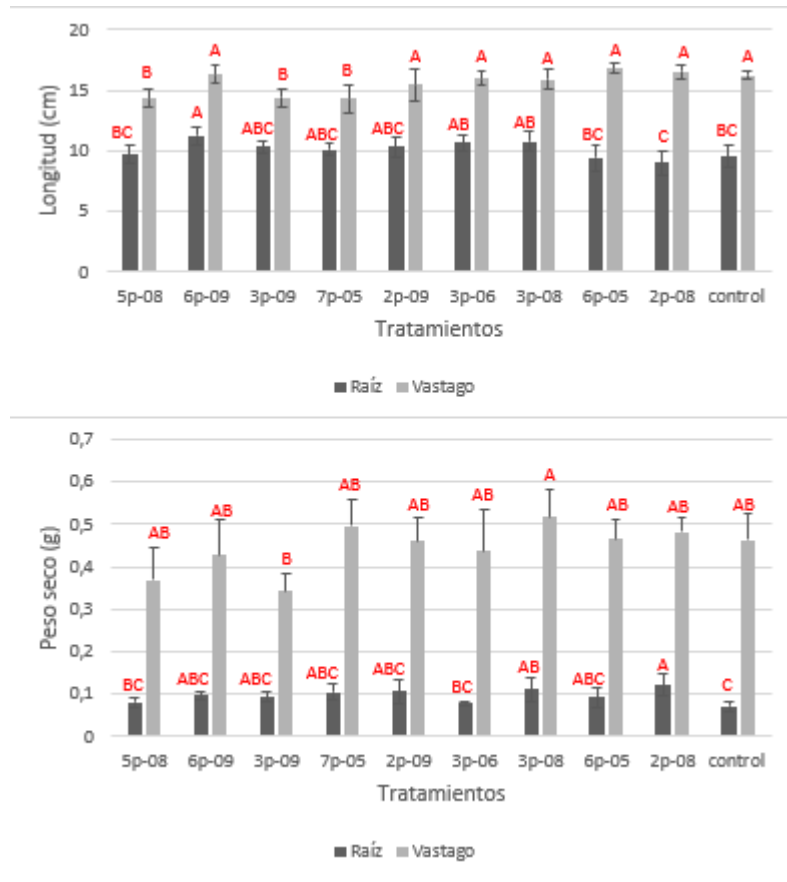
**Figura 14.** Ensayo #3, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para el caso del cuarto ensayo (Figura 15), únicamente se observan diferencias significativas en la variable peso seco raíz en donde el aislamiento 2p-06 aumenta el valor en un 29.00% respecto al control.



**Figura 15.** Ensayo # 4, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Finalmente, en el quinto ensayo (figura 16), se observan diferencias significativas en las variables de longitud de raíz para el aislamiento 6p-09, aumentando este valor en un 18% y en peso seco de raíz en los aislamientos 2p-08 y 3p-08 con un aumento del 70% y 56.7%, respectivamente. Para el caso del peso seco de vástago a pesar de no encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, se destaca el aislamiento 3p-08 que aumentó esta variable en un 11.16% respecto al control



**Figura 16.** Ensayo # 5, variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga, después de 35 días bajo invernadero. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

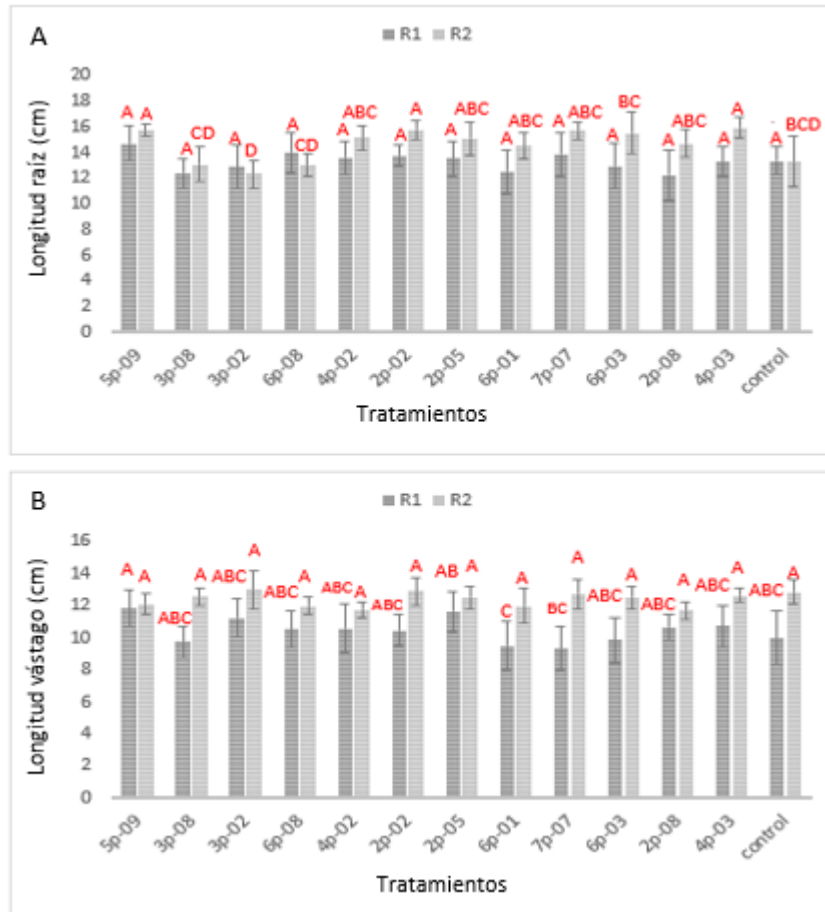
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta primera fase de selección y basados en el comportamiento de los aislamientos *in vitro*, los aislamientos 2p-02, 3p-02, 6p-03, 4p-02, 6p-08, 6p-01, 4p-03, 5p-09, 2p-05, 2p-08, 7p-07 y 3p-08 fueron seleccionados para una segunda fase de evaluación bajo invernadero, midiendo su respuesta en las variables de longitud y peso seco de raíz y vástago bajo diferentes niveles de aplicación de fósforo.

La primera evaluación se realizó con dos niveles de fertilización de fósforo, el primero correspondiente a 100% de fósforo soluble en solución de Hoagland en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

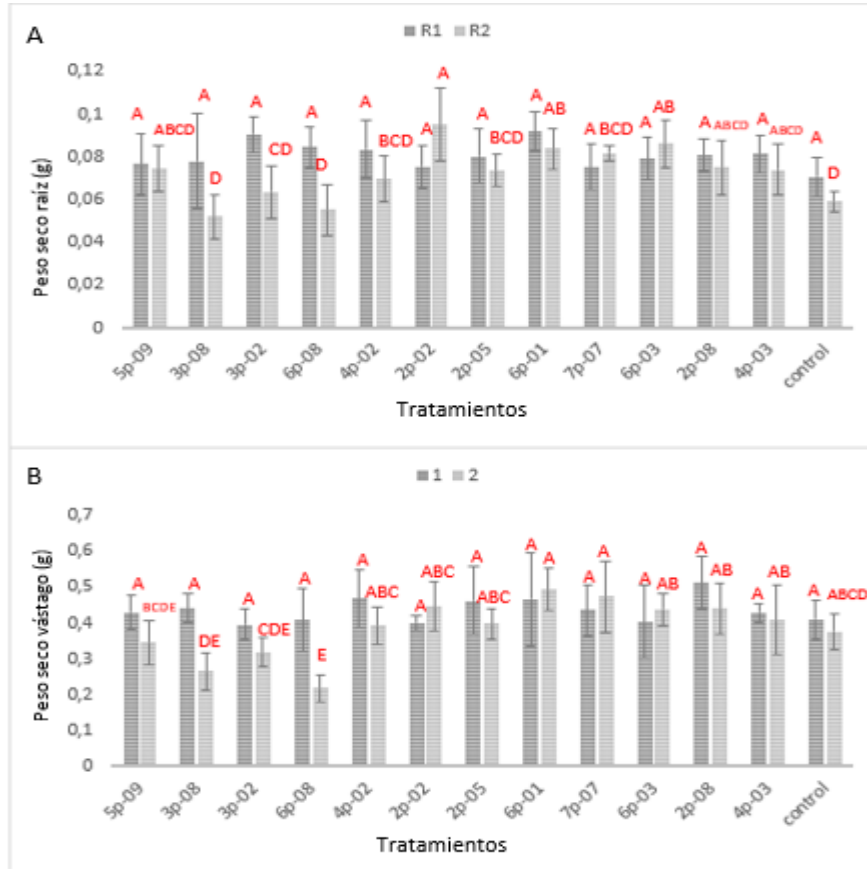
y el segundo con 0% de fósforo soluble y 100% de fósforo en forma de roca fosfórica ( $P_2O_5$ )

El segundo ensayo consistió en una dosis con 100% de fósforo soluble en solución de Hoagland en forma de  $KH_2PO_4$  y otra dosis con fósforo soluble al 50% en solución de Hoagland en forma de  $KH_2PO_4$  y 50% fósforo en forma de roca fosfórica ( $P_2O_5$ ). El análisis de pruebas multivariantes permitió establecer una interacción entre los factores, por lo que no fue posible escoger el mejor aislamiento o la mejor dosis de fertilización ya que depende del nivel de interacción. Con el objetivo de seleccionar el mejor aislamiento bajo cada dosis de fertilización, se procedió a realizar un análisis independiente de cada ensayo.

Los resultados de las dos repeticiones del ensayo con 100% de fósforo inorgánico soluble para las 4 variables de respuesta, se observan a continuación en las figuras 17 y 18, para longitud y peso seco de raíz y vástago, respectivamente. En la primera repetición no se observan diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las variables de respuesta, sin embargo, en la segunda repetición se observan diferencias significativas en las variables longitud de raíz en los tratamientos con las cepas 5p-09, 4p-03 y 2p-02 y en la variable de peso seco de raíz sobresaliendo los aislamientos 2p-02, 6p-03 y 6p-01.



**Figura 17.** Variables de respuesta longitud raíz (A) y longitud vástago (B) de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de 100% de fósforo soluble inorgánico en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aplicado en solución de Hoagland. R1 repetición 1, R2 repetición 2 en el tiempo. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

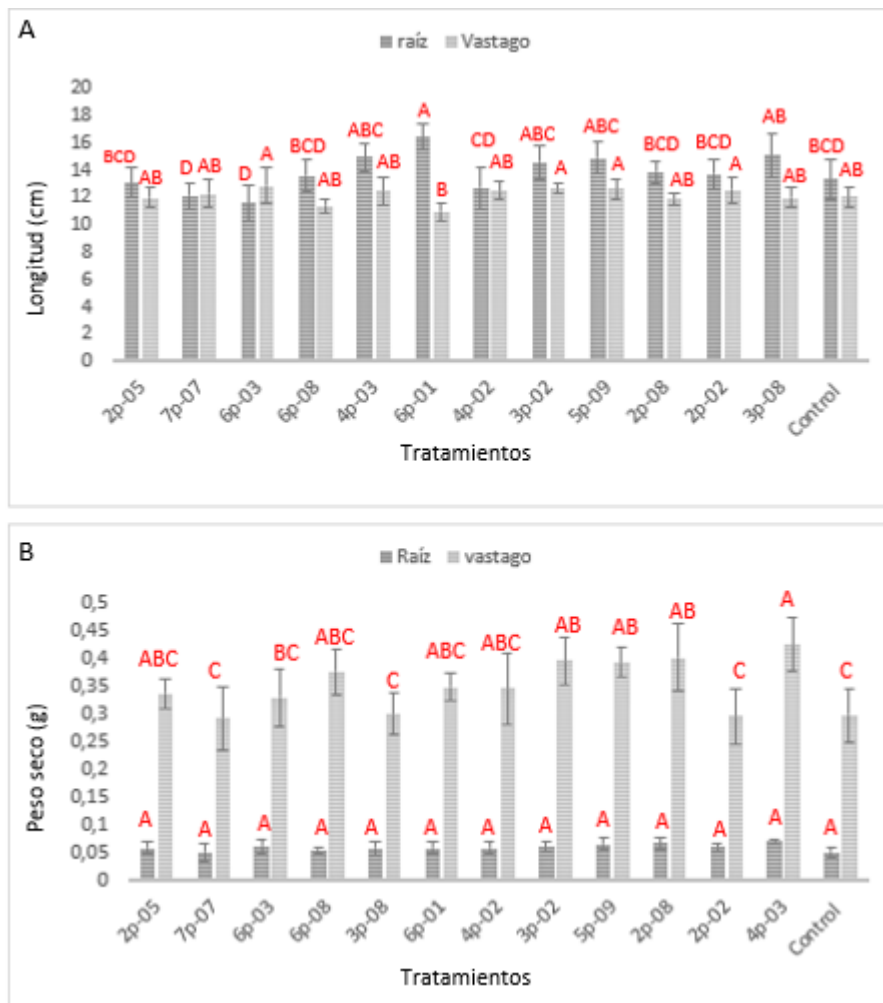


**Figura 18.** Variables de respuesta peso seco raíz (A) y peso seco vástago (B) de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de 100% de fósforo soluble inorgánico en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aplicado en solución de Hoagland. R1 repetición 1, R2 repetición 2 en el tiempo. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Los valores obtenidos en el ensayo con fósforo al 50% inorgánico en solución de Hoagland y 50% fósforo como roca fosfórica, se observan a continuación en las figuras 19 y 20. La comparación de medias aplicando la prueba de Tukey, permitió establecer diferencias significativas en las variables de longitud de raíz sobresaliendo el aislamiento 6p-01, aumentando la longitud en un 23.1% y en la variable de peso seco de vástago sobresaliendo los aislamientos 4p-03, 2p-08, 3p-02 y 5p-09 aumentando el peso en un 42,8%, 35.2%, 32.8%, 32.2%, respectivamente.

Las plantas no presentaron síntomas de deficiencia de fósforo relacionados con plantas enanas o coloración verde oscura o púrpura, en ninguno de los tratamientos, sin

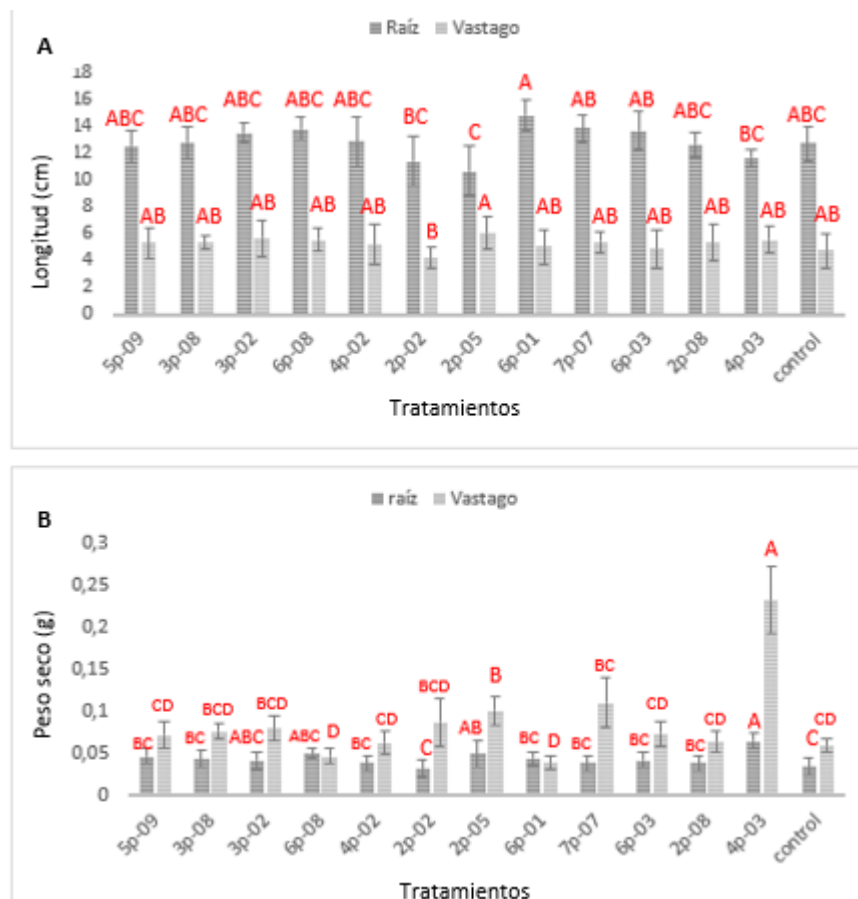
embargo, es importante mencionar que al comparar los valores de peso seco de vástago, los aislamientos mencionados anteriormente fueron los únicos en igualar el valor del control en el ensayo con fertilización de 100% con fósforo soluble en solución de Hoagland, lo que indica presuntivamente una acción en la solubilización del  $P_2O_5$  presente en la roca fosfórica, abriendo un panorama a la disminución en la aplicación de fósforo de origen químico para suplirlo con la aplicación de roca fosfórica, favoreciendo los costos e impactos para el agricultor y los suelos.



**Figura 19.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Para el caso del ensayo llevado a cabo bajo una fertilización de 0% fósforo soluble y 100% de fósforo como roca fosfórica, se observan diferencias significativas en las variables de peso seco de raíz y vástago, sobresaliendo en ambos casos los aislamientos 4p-03 y 2p-05, se destacan los valores obtenidos por el aislamiento 4p-03, quién supera por más del 100% los valores del control con ADE (figura 20).

Las plantas presentaron síntomas de deficiencia de fósforo como coloración verde oscura y púrpura, raíces delgadas y elongadas y plantas enanas (figura 21) (Uchida, 2000). Sin embargo, estos síntomas no se observaron en las plantas tratadas con el aislamiento 4p-03, lo que indica presuntivamente que las plantas no tuvieron deficiencia de este nutriente durante su desarrollo, muy seguramente por la actividad de solubilización por parte de la cepa.

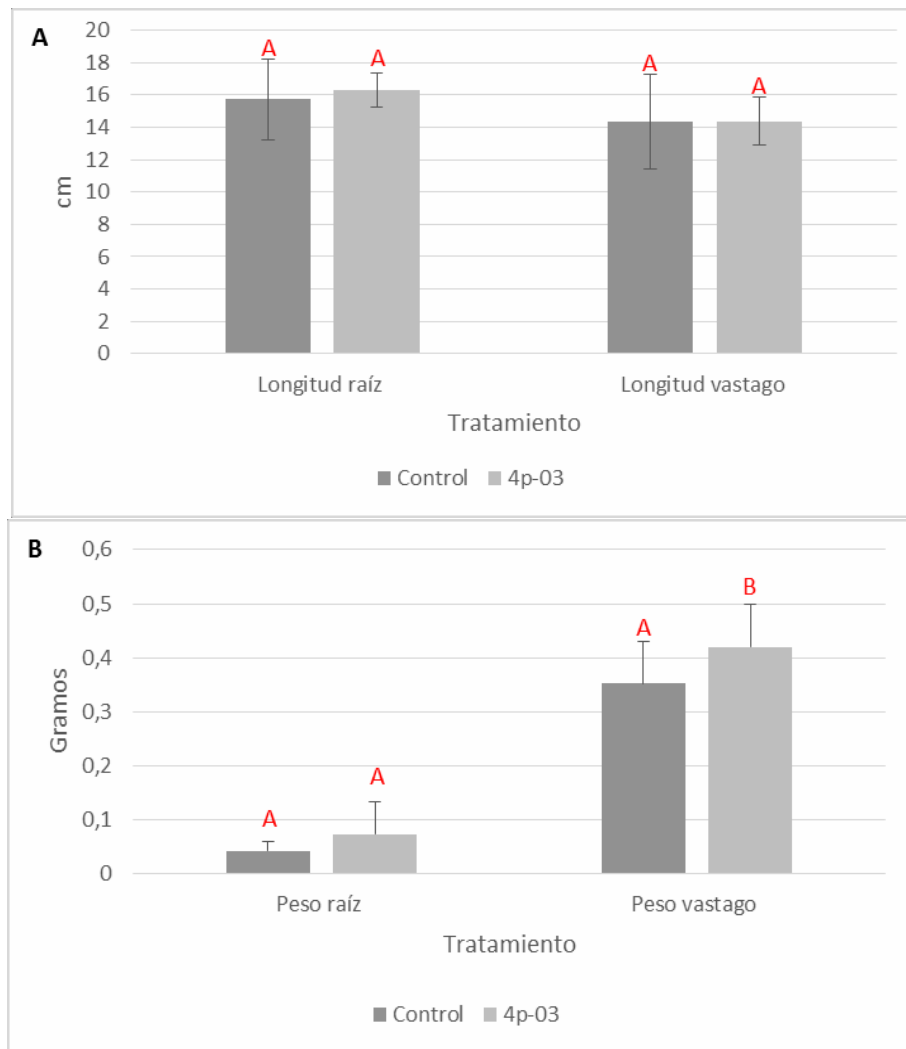


**Figura 20.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo soluble y 100% de fósforo como roca fosfórica. Se observa la desviación estándar del promedio de 6 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ )

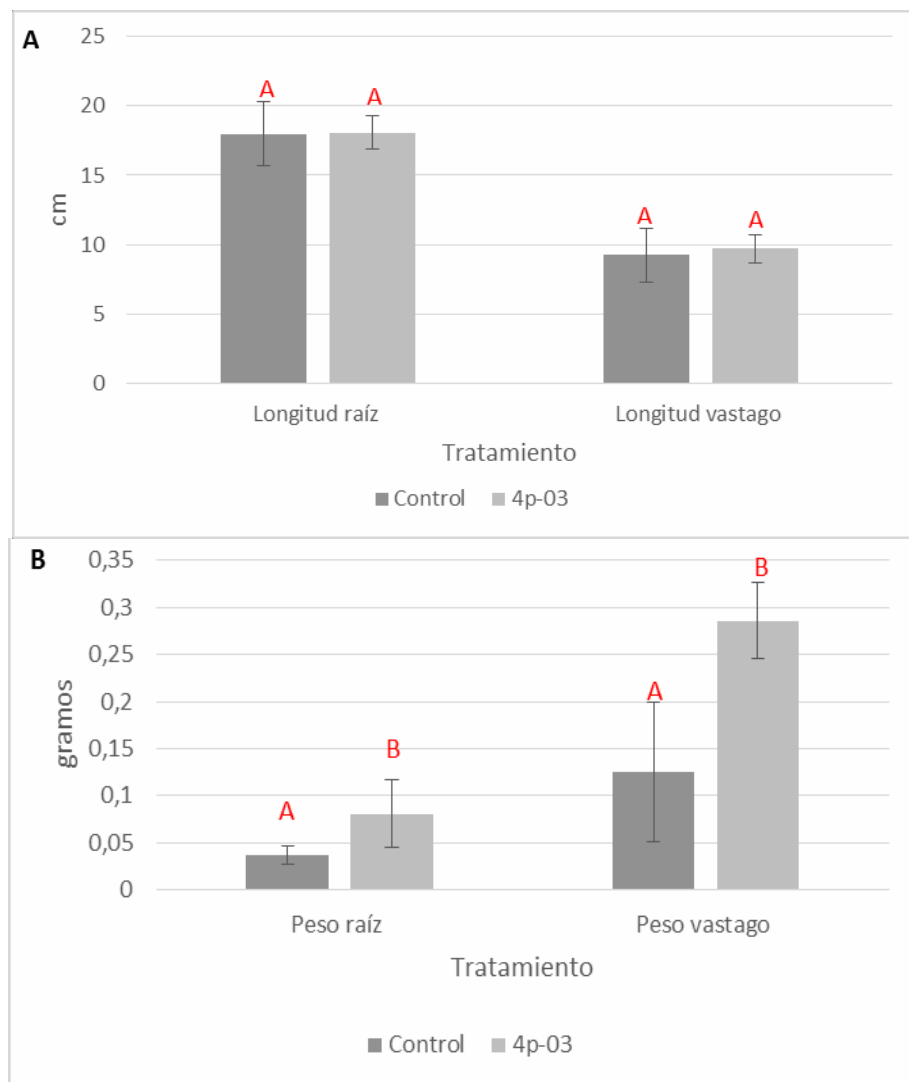


**Figura 21.** Síntomas de deficiencia de fósforo en plantas de lechuga fertilizadas con solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo más roca fosfórica. A) coloración purpura en vástago B) enanismo (planta del lado izquierdo tratada con la cepa 4p-03, planta del lado derecho control con ADE).

La repetición del ensayo con 100% de roca fosfórica con el aislamiento 4p-03 y como control ADE, evidencia nuevamente una mejoría en los atributos de las plantas tratadas con la cepa y con 100% de fósforo como roca fosfórica ( $P_2O_5$ ), en donde se observan diferencias significativas en las variables de peso seco raíz y de vástago con un aumento del 117% y 128% respectivamente, en comparación con el control. En relación con la fertilización con 100 % de fósforo en solución de Hoagland como  $KH_2PO_4$ , se observan diferencias significativas en la variable de peso seco vástago con un aumento del 18.8 %. Los resultados obtenidos se observan a continuación en las figuras 22 y 23.



**Figura 22.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización con solución de Hoagland con 100% de fósforo soluble en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Se observa la desviación estándar del promedio de 15 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



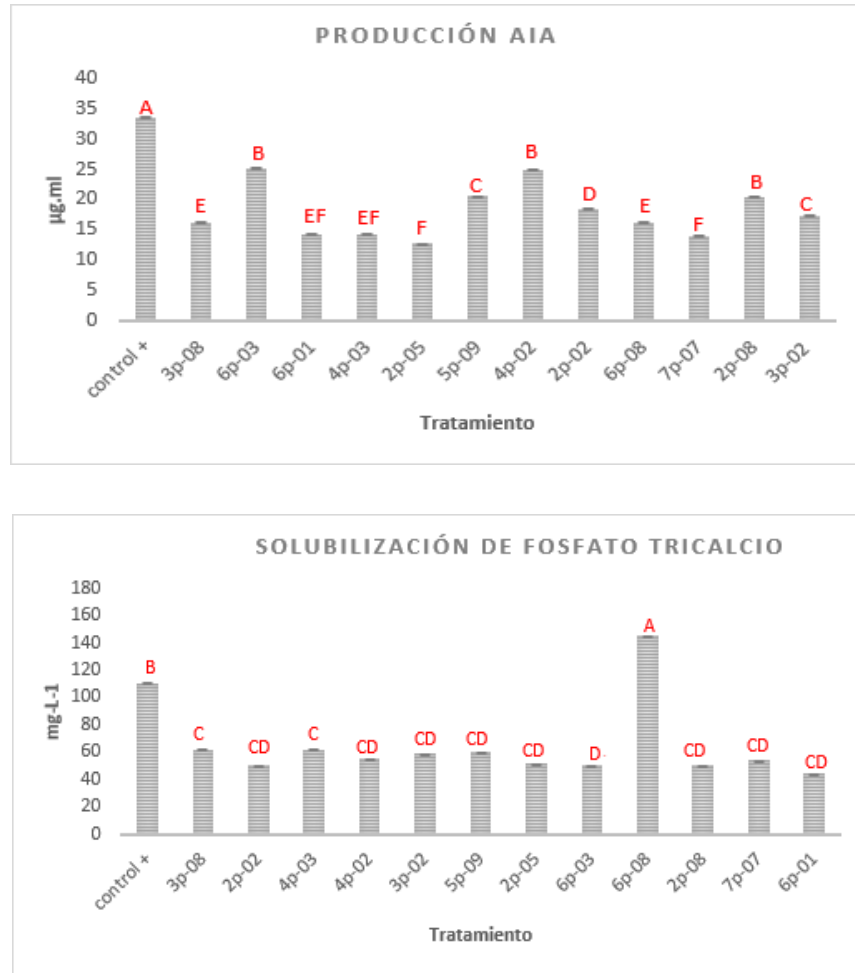
**Figura 23.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de plantas de lechuga después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización con solución de Hoagland modificada con 0% de fósforo soluble más roca fosfórica (4,96 g/planta). Se observa la desviación estándar del promedio de 15 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 4.2 Caracterización de actividades relacionadas con promoción de crecimiento *in vitro*

### 4.2.1 Solubilización de fosfato tricálcico

Los aislamientos evaluados presentaron niveles de solubilización de fosfato tricálcico en

rangos de 50 a 145 mg PO<sub>4</sub>.L<sup>-1</sup>, el aislamiento 6p-08 arrojó los niveles más altos de solubilización, superando la producción del control positivo *Pseudomonas fluorescens* Pfls 095, quién presentó valores de 110 mg.L<sup>-1</sup>, se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos con un intervalo de confianza de p≤0,05. La figura 24 muestra los valores obtenidos para cada aislamiento.

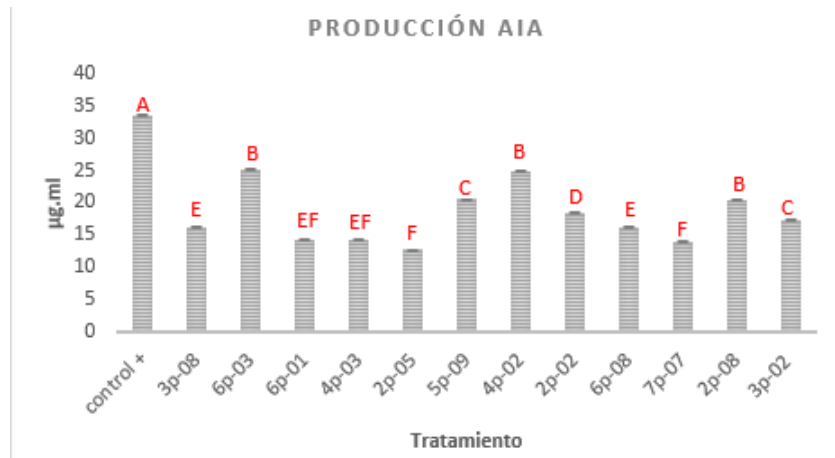


**Figura 24.** Valores en mg.L<sup>-1</sup> de solubilización de fosfato tricálcico, utilizando el método analítico Spectroquant<sup>®</sup> Fósforo de Merck. Control + (*Pseudomonas fluorescens* Pfls 095), Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey (p≤0,05).

### 4.2.2 Producción de compuestos indólicos

El 100 % de los aislamientos evaluados presentaron producción de ácido indol acético con rangos que oscilan entre los 14 a 25 µg.mL<sup>-1</sup>, la comparación de medias permitió establecer diferencias significativas entre los tratamientos, en donde se destacan los aislamientos 6p-03 y 4p-02 con valores de producción de 25 µg.mL<sup>-1</sup>, sin embargo ninguna de las cepas superó

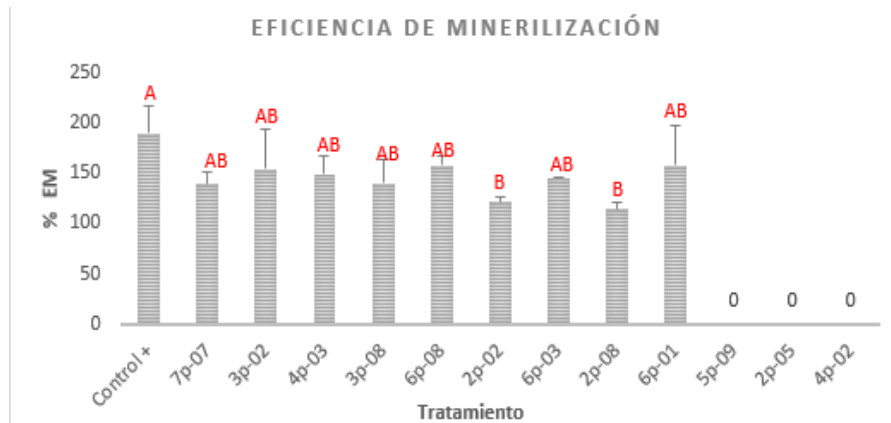
el valor de producción del control positivo *A. brasilensis*, que produjo  $34 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figura 25.



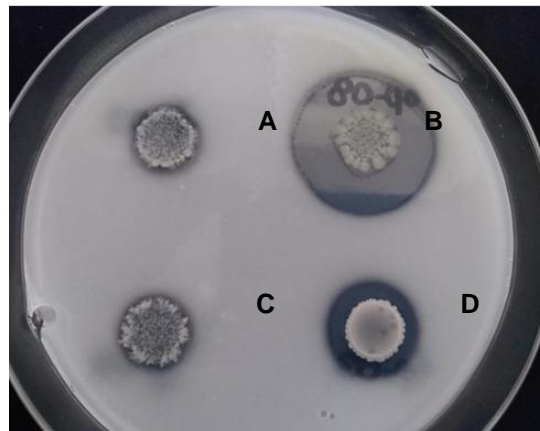
**Figura 25.** Valores en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$  de producción de ácido indol acético (AIA). Control + (*Azospirillum brasilensis*). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.2.3 Mineralización de ácido fítico

De los 12 aislamientos seleccionados, el 75% presentó actividad en la mineralización de ácido fítico *in vitro*, presentando porcentajes de eficiencia de mineralización que oscilan entre 115 a 158, no se observaron diferencias significativas mediante la comparación de medias para ninguno de los tratamientos, adicionalmente ningún aislamiento superó la actividad del control positivo *Pseudomonas fluorescens* Pfls 095, que presentó un porcentaje de eficiencia de 190. La figura 26 presenta los resultados obtenidos.



**Figura 26.** Porcentaje de eficiencia de mineralización de ácido fítico. Control + (*Pseudomonas fluorescens* Pfls 095), Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 27.** Halos de mineralización de ácido fítico de BAFEs en medio NBRIP después de cinco días de incubación. A. 2p-02 B. 6p-08 C. 2p-08 D. 7p-07

Algunas investigaciones se han desarrollado para determinar la función y acción promotora de *Bacillus* sp, en plantas de lechuga. Estudios realizados por Ogugua et al., 2018, evaluaron el efecto de la cepa BD233 de *B. subtilis* en plantas de lechuga, pimentón y remolacha, midiendo y comparando las variables de altura, longitud de tallo y biomasa en plantas después de 35 días de su trasplante. En los resultados específicamente para plantas de lechuga, encontraron un efecto positivo en los tratamientos con la cepa BD233 respecto al control, aumentando en un 32.1% y 92.6% las variables de altura y biomasa, respectivamente. Estudios similares han reportado también el efecto benéfico de *Bacillus* sp.

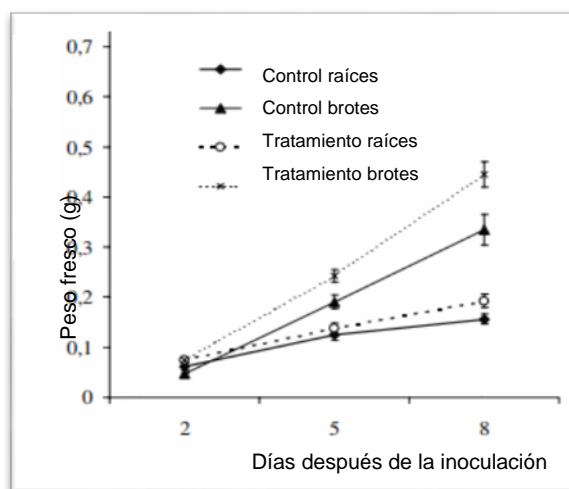
en plantas de lechuga (Ferreira et al., 2011; Yobo et al., 2004). Sin embargo, otras investigaciones no han encontrado ningún efecto promotor en atributos de las plantas tras la inoculación con *Bacillus* sp. (Szczeczek et al., 2016), llegando en algunos casos a tener un efecto negativo inhibiendo el desarrollo de plantas inclusive con valores por debajo del control. Ambos tipos de hallazgos coinciden con los resultados obtenidos durante este estudio, en donde se encontró el efecto promotor por aumento en las variables de longitudes y peso seco de raíz y vástago en algunos aislamientos, pero también un efecto nulo o negativo en algunos otros tratamientos, respecto al control.

Hoang et al., 2005 evaluaron el efecto inhibitorio de la cepa EJ-121 de *B. cereus* sobre plantas de lechuga. A partir de sobrenadantes de la cepa realizaron cromatografía en columna de sílica gel y HPLC con el fin de identificar y extraer los compuestos producidos por la cepa y comprobar su papel en la inhibición del desarrollo de plantas. Los compuestos extraídos se identificaron como vainillato de sodio (compuesto 1) y ácido 2-aminobenzoico (compuesto 2), los cuales, al ser inoculados en brotes de lechuga a diferentes concentraciones, redujeron las variables de elongación de raíces en un 68.4% y 69.2% para el compuesto 1 y 2 respectivamente, con un comportamiento dosis dependiente. Muchas de estas sustancias producidas por microorganismos o por plantas, son conocidas como alelopáticas las cuales pueden tener una acción estimulante o inhibitoria, por lo que se consideran reguladoras de crecimiento vegetal (Hoang et al., 2005; Kushima et al., 1998). Según lo reportado por Yobo et al., (2004), diferentes efectos de promoción en patatas de tomate, pimentón y lechuga se obtuvieron después del tratamiento con las mismas cepas bacterianas de *Bacillus* sp. lo que refleja la influencia y el establecimiento selectivo de microorganismos en diferentes tipos de plantas.

La producción de fitohormonas es considerada hoy en día como uno de los mayores mecanismos utilizados por las PGPR para la promoción de crecimiento vegetal, dentro de las cuales se destacan la producción de ácidos orgánicos como auxinas o citoquininas (Martínez., 2010). Considerando el tipo de ensayo de invernadero en la evaluación inicial de los aislamientos, en donde la fertilización empleada fue solución de Hoagland completa y por lo tanto, las plantas no presentaban deficiencia o ausencia de nutrientes, se sugiere la producción de hormonas como el mecanismo utilizado por los aislamientos para los efectos de promoción. Adicionalmente en los ensayos *in vitro*, todos los aislamientos seleccionados presentaron capacidad de producir ácido indol acético en

rangos de 14 a 25  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , lo que corrobora su capacidad de producir hormonas de la familia de las auxinas. En estudios realizados por Ali et al. (2008), reportan la producción *in vitro* de ácido indol acético en medio LB a diferentes concentraciones de L-triptófano (0, 200, 400, 600, 800, 1000 y 2000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en 17 especies de *Bacillus* aisladas de diferentes tipos de plantas, en donde obtuvieron rangos de producción que oscilaron entre 1.7 y 92.7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Arkhipova et al., (2005) estudiaron la producción de fitohormonas como ácido abscísico (ABA), ácido indolacético (AIA) y citoquininas en una cepa de *B. subtilis* y su efecto en la promoción de crecimiento vegetal sobre plantas de lechuga. Los resultados mostraron una acumulación mayor de ABA, AIA y citoquininas respecto al control, en los brotes y las raíces de las plantas después de 2 días de inoculación con la suspensión bacteriana, así mismo la inoculación influyó en el peso fresco de raíces y brotes, mejorando estos atributos (figura 28).



**Figura 28.** Peso fresco de plantas de lechuga 2, 5 y 8 días después de la inoculación con *Bacillus subtilis* (tomada de Arkhipoca et al., 2005).

Otro mecanismo comúnmente conocido en las PGPR es la solubilización de fósforo. Como se menciona en el marco teórico, el fósforo es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, sin embargo, presenta una baja disponibilidad en el suelo, razón por la cual algunos estudios se han enfocado en la aplicación de fuentes alternativas de este elemento, como la roca fosfórica.

En un estudio realizado por Han y Lee, (2006), encontraron que en cultivos de pimentón y pepino inoculados con roca fosfórica y las cepas PSB y KSB de *B. megaterium* y *B. mucilaginosus*, respectivamente, aumentó la captación de fósforo en raíces y brotes de la planta, mejorando aspectos como peso seco. Estos resultados indican la capacidad de cepas de *Bacillus* sp. para solubilizar diferentes fuentes de fósforo y liberar este elemento de tal manera que pueda ser absorbido por las plantas, mejorando sus atributos. Estudios similares fueron reportados por Panhwar et al., (2011) en cultivos de arroz, en donde la adición de roca fosfórica e inóculos de *Bacillus* spp. incrementaron la absorción de fósforo mejorando variables como crecimiento de la planta y desarrollo de la raíz.

Para el caso específico del cultivo de lechuga no se han reportado estudios de la implementación de roca fosfórica y *Bacillus* sp. sin embargo, algunas investigaciones se han realizado con otros microorganismos PGPR como bacterias del género *Pseudomonas* sp. y hongos solubilizadores de fósforo y formadores de micorrizas. Para ambos casos, los resultados obtenidos muestran mejores atributos en plantas de lechuga inoculadas con los microorganismos y con roca fosfórica, indicando las ventajas de la mezcla de PGPR con fuentes alternas de fertilización para mejorar atributos en las plantas en términos de nutrición (Sánchez. 2014; Velázquez et al., 2017). Los resultados reportados coinciden con lo obtenido para el aislamiento 4p-03 en el ensayo con 100% y 50% de roca fosfórica, en donde se obtuvo un aumento mayor al 50% en los valores de peso seco de raíz y vástago respecto al control, en ambas dosis de fertilización. Estos resultados permiten sugerir esta cepa como promisoría para su uso en campo junto con la aplicación de enmiendas de roca fosfórica debido posiblemente a un efecto de solubilización.

A pesar que otros aislamientos mostraron una mejor actividad de solubilización de fosfato tricálcico *in vitro*, no mostraron mejoría en los atributos de las plantas, lo cual se puede deber a interacciones planta-microorganismo o a la naturaleza de la roca fosfórica. En estudios realizados por Alkhader et al., (2013), evaluando diferentes fuentes de fósforo como: roca fosfórica, fosfato de monoamonio, superfosfato y fosfato diamonio, obtuvieron los valores más bajos de pesos frescos y secos de plantas de lechuga en el tratamiento fertilizado únicamente con roca fosfórica,

atribuyendo este fenómeno a la naturaleza de la roca fosfórica y a las condiciones fisicoquímicas del suelo, especialmente el pH el cual afecta considerablemente la solubilización de fósforo, teniendo en cuenta además que la roca fosfórica es una fuente de liberación lenta de fósforo.

Estudios similares se encontraron en las investigaciones realizadas por Agyarko., (2016), en donde utilizaron roca fosfórica y estiércol de animales como fertilizante en plantas de lechuga, obteniendo los valores más bajos de disponibilidad de fósforo y atributos como peso, área foliar y longitud, en los tratamientos únicamente con roca fosfórica, sin embargo, en aquellos tratamientos en los cuales realizaron una mezcla de las fuentes de fertilización obtuvieron resultados óptimos por encima del control, siendo la mezcla con estiércol de aves de corral y roca fosfórica la que mejores resultados mostró, lo que indica que al aplicar la roca fosfórica junto con otra fuente de fósforo, las condiciones de disponibilidad de este elemento pueden mejorar.

Este fenómeno podría sugerir la evaluación de otras fuentes de fósforo adicionales a la roca fosfórica, que puedan mejorar la actividad de los aislamientos, como el ácido fítico. La mineralización de ácido fítico es otra actividad típica de las PGPR, relacionada con la liberación de fósforo a partir del fitato gracias a la producción de enzimas como las fitasas, una actividad importante en el suelo, debido a que una gran porción del fósforo orgánico se encuentra como hexafosfato de inositol (Ramesh, 2014). Diferentes especies de *Bacillus* sp. han sido reportadas por su capacidad para mineralizar fitato. En estudios realizados por Jorquera et al., (2011), encontraron que una proporción del 70-98% de especies de *Bacillus* aisladas de suelos de pastos, tienen la habilidad de mineralizar fitato en el medio sólido PSM, proporción que se asemeja a lo encontrado en esta investigación, donde el 75% de los aislamientos presentaron mineralización, siendo el aislamiento 6p-08 la que mejores resultados arrojó.

## 4.3 Caracterización de la actividad antagónica de las BAFEs frente a *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*

### 4.3.1 Aislamiento e identificación de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*

En las muestras recolectadas en campo de las variedades Batavia, Crespa y Romana se observaron síntomas presuntivos de BLS, como manchas necróticas alrededor del margen foliar y algunas a lo largo de las nervaduras de la hoja en forma de V (Figura 29).

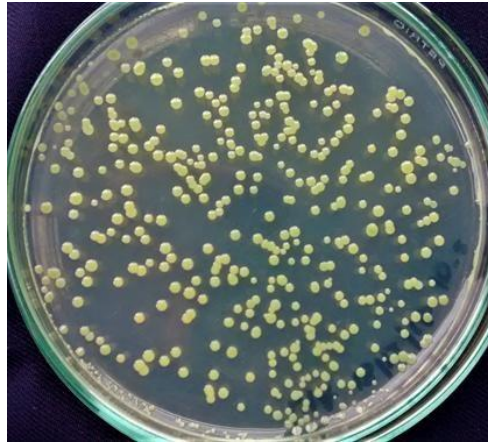


**Figura 29.** Sintomatología presuntiva de BLS en hoja de lechuga crespa recolectadas del Centro Agropecuario Marengo en Mosquera- Cundinamarca.

Del procesamiento de las muestras mediante la maceración, dilución y siembra en medio MMG se obtuvieron colonias que corresponden a los aislamientos LC100 y LC100A provenientes de las muestras de lechuga Crespa y LB103 proveniente de la muestra de lechuga Batavia. Las colonias presentaban una tonalidad verde oliva tanto en el haz como en el envés, bordes regulares, lisas y elevadas, apariencia mucóide y brillante (figura 30).

El medio selectivo MMG facilita la identificación de colonias correspondientes a *Xcv*, debido a que éste posee antibióticos que inhiben significativamente el crecimiento de bacterias saprófitas. Adicionalmente, la presencia de verde de metilo como colorante, permite la identificación rápida, ya que las colonias de *Xcv* toman una coloración verde

que la diferencian de otros microorganismos (Toussaint et al., 2001).

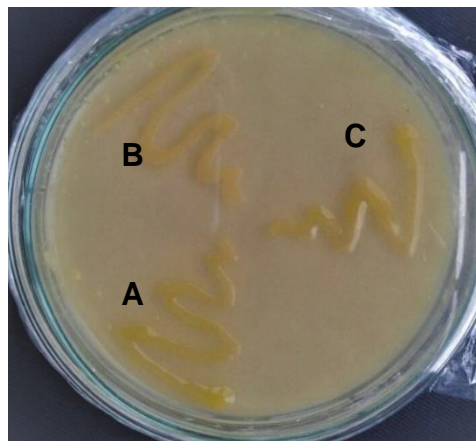


**Figura 30.** Colonias aisladas de síntomas presuntivos de mancha foliar bacteriana de hojas de lechuga crepsa en medio MMG después de 48 horas de incubación.

El perfil bioquímico de cada uno de los aislamientos se muestra en la tabla 9. Los tres aislamientos presentaron el mismo comportamiento, correspondiente a lo descrito para el género *Xanthomonas* (Alvez et al., 2016; Elliot., 1931; Guzmán Rodríguez, 2007). En la prueba de TSI los aislamientos no presentaron capacidad de fermentación de los azúcares glucosa y sacarosa, la coloración amarilla en el medio YDCA se observa a continuación en la figura 31.

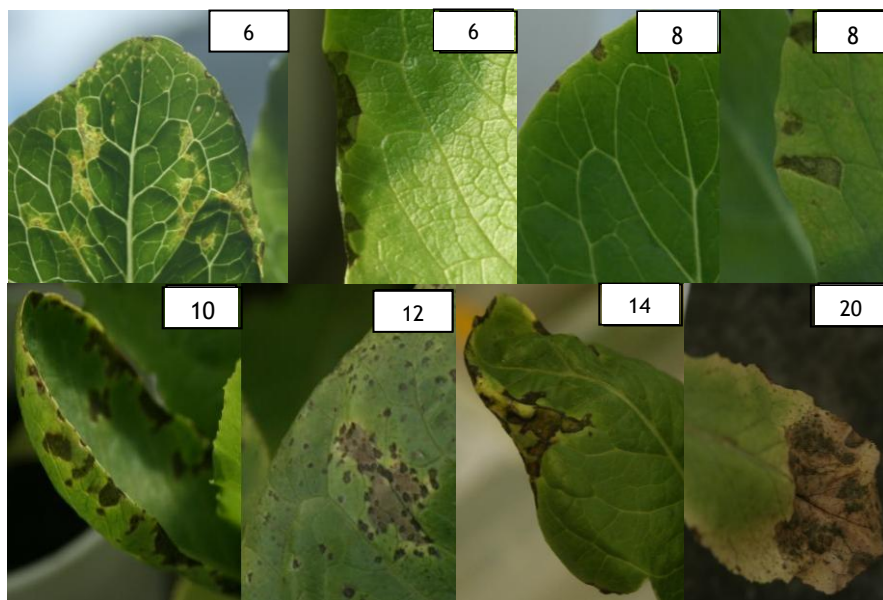
**Tabla 9.** Perfil bioquímico de los aislamientos LC100, LC100A y LB103. K: reacción alcalina.

<b>Prueba bioquímica</b>	<b>LC100</b>	<b>LC100A</b>	<b>LB103</b>
<b>Tinción de Gram</b>	Bacilo Gram Negativo	Bacilo Gram Negativo	Bacilo Gram Negativo
<b>KOH 3%</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Hugh y Leifson</b>	Aerobio estricto	Aerobio estricto	Aerobio estricto
<b>TSI</b>	K/K sin producción de Gas	K/K sin producción de Gas	K/K sin producción de Gas
<b>Oxidasa</b>	Negativa	Negativa	Negativa
<b>Catalasa</b>	Positiva	Positiva	Positiva
<b>Fluorescencia en King B</b>	Negativa	Negativa	Negativa
<b>Pigmentos amarillos en YDCA</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Producción de Lévano</b>	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Crecimiento a 40°C</b>	Positivo	Positivo	Positivo



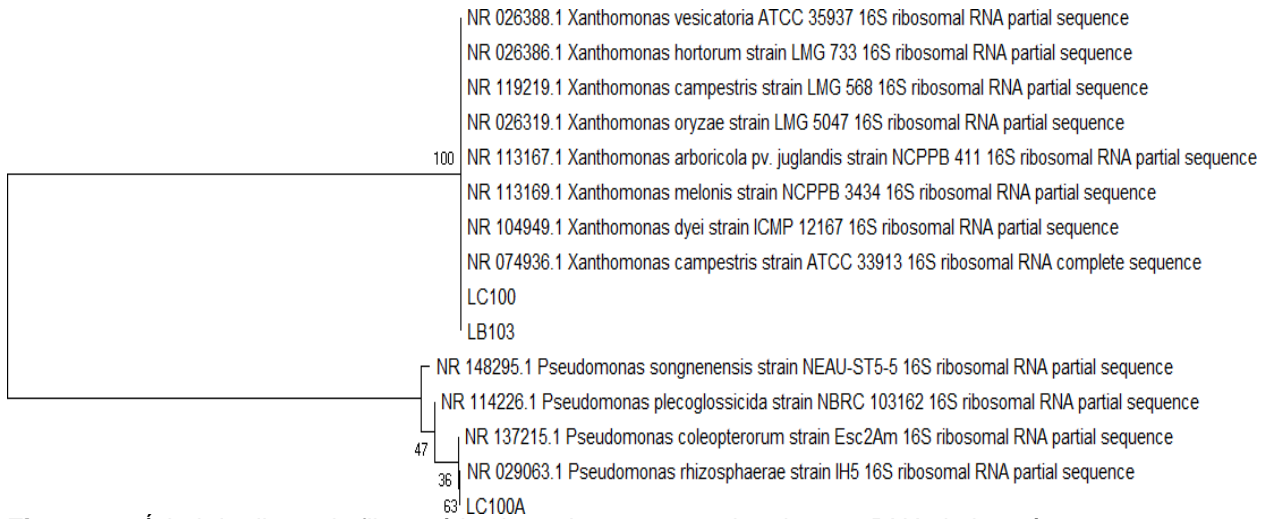
**Figura 31.** Producción de pigmentos amarillos en medio YDCA después de incubación a 28°C por 48h. A). aislamiento LC100 B). aislamiento LC100A C). aislamiento LB103.

En estudios realizados con *Xcv*, se observan síntomas sobre hojas de lechuga que inician con la aparición de manchas marrón o negras en los bordes de la hoja, que posteriormente coalescen y se extienden por el margen de esta, tomando una textura de papel hasta alcanzar necrosis y clorosis total (Al-Saleh y Ibrahim, 2009; Sahin y Miller, 1997). Estos síntomas coincidieron con lo encontrado en hojas de lechuga variedad Paris Island a partir de los 6 dpi con los aislamientos LC100 y LB103 siguiendo el método ISTA descrito en international Seed Testing Association, observando manchas marrón individuales en el margen de la hoja, que posteriormente coalescieron y se extendieron por las nervaduras de las hojas formando una V con presencia de halos cloróticos (figura 32). Las lesiones generadas por el aislamiento LC100 se extendieron a lo largo de toda la hoja hasta alcanzar la muerte total de las mismas. En el caso del aislamiento LB103 las lesiones estuvieron restringidas a las nervaduras de la hoja sin extenderse a lo largo de toda el área foliar. La incidencia después de 12 días de inoculación fue de 61,1% y 47,2% para los aislamientos LC100 y LB103, respectivamente. De la maceración, diluciones y siembra de las lesiones obtenidas, se aislaron nuevamente las colonias puras con las características típicas iniciales de los aislamientos. El aislamiento LC100A no presentó síntomas sobre plantas de lechuga Paris Island.



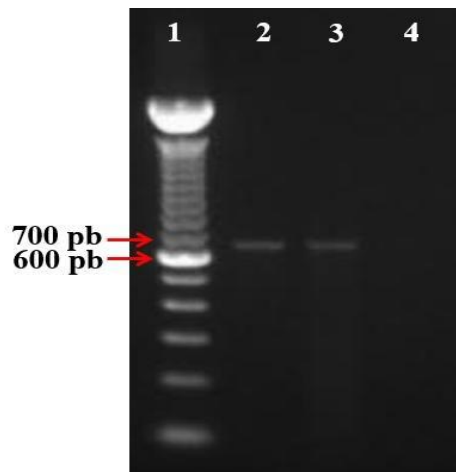
**Figura 32.** Progreso de la enfermedad BLS sobre hojas de lechuga variedad Paris Island a los 6, 8, 10, 12, 14 y 20 después de la inoculación con el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians*.

Mediante la amplificación del gen que codifica para la subunidad del 16s RNA los aislamientos LC100 y LB103 se identificaron como *Xanthomonas campestris* con un ID de 99% y el aislamiento LC100A como *Pseudomonas rhizosphaerae* con un ID de 98%. Mediante el programa MEGA se realizó el árbol filogenético, el cual confirmó la identificación de los aislamientos, con base en la cercanía filogenética a partir de las secuencias de referencia obtenidas en la base de datos del GenBank (figura 33).



**Figura 33.** Árbol de distancia filogenética basado en secuencias de 16s rRNA de los géneros *Xanthomonas* sp. y *Pseudomonas* sp. Los aislamientos LC100 y LB103 se ubican con las *Xanthomonas* sp mientras que el aislamiento LC100A con *Pseudomonas* sp. Herramienta de construcción estadístico Neighbor-joining.

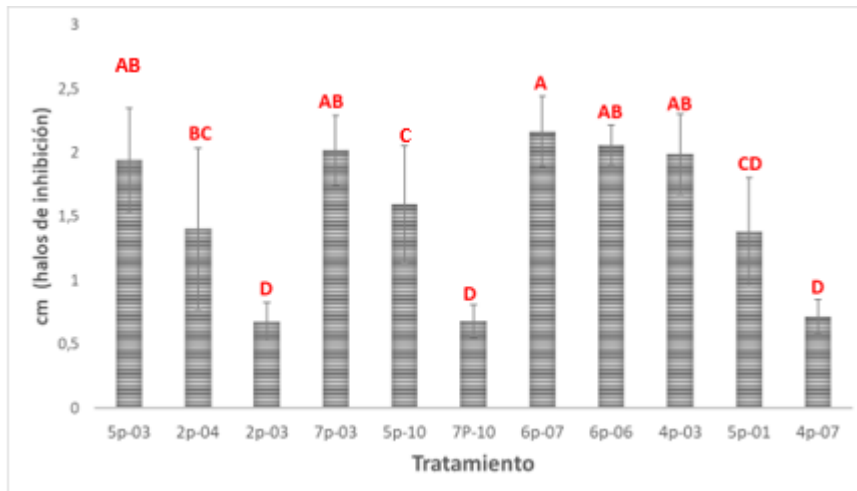
En la amplificación PCR con los primers del gen que codifica para la enzima glicosil hidrolasa específica para *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* se observó el tamaño de banda esperado de 663pb para los aislamientos LC100 y LB103, lo que sugiere que corresponden a *Xcv* (figura 34).



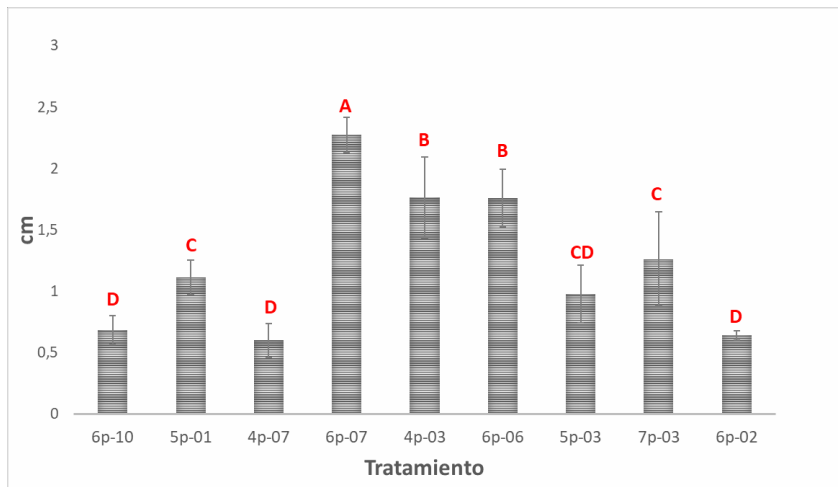
**Figura 34.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se observa la amplificación del gen de 700pb que codifica para una Glicosil Hidrolasa de *X. campestris* pv *vitians* con los primers 9308B. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 pb Invitrogen; Línea 2: aislamiento LC100; Línea 3: aislamiento LB103; Línea 4: control negativo, *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* VAR 226.

### 4.3.2 Actividad antagónica *in vitro*

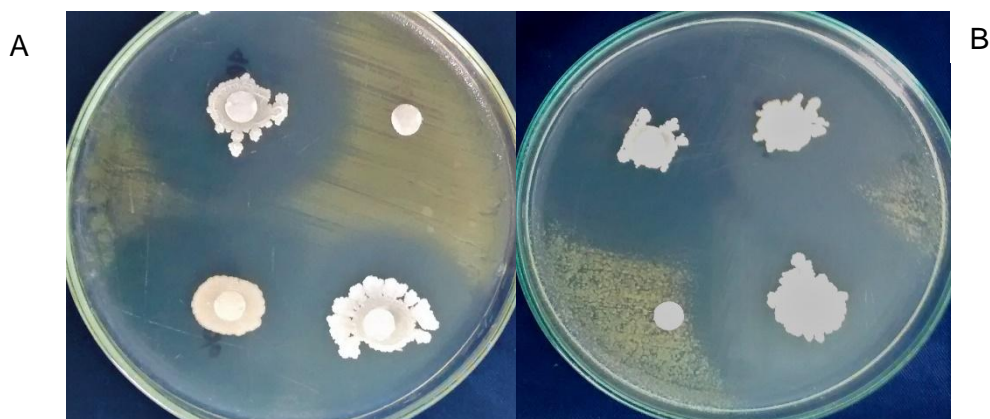
De los 50 aislamientos evaluados, el 22% presentaron actividad antagónica contra el aislamiento LC100 (figura 35) y el 18% contra el aislamiento LB103 (figura 36). La comparación de medias por el análisis de Tukey con un alfa de  $p \leq 0,05\%$  mostró diferencias significativas en los tratamientos, sobresaliendo para ambos casos los aislamientos 6p-07, 6p-06 y 4p-03 (figura 35).



**Figura 35.** Halos de inhibición en cm de los aislamientos de BAFEs sobre la cepa LC100. Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 36.** Halos de inhibición en cm los aislamientos de BAFEs sobre la cepa LB103 medida en cm de halos de inhibición. Se observa la desviación estándar del promedio de 3 réplicas por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 37.** Halos de inhibición de BAFEs sobre los aislamientos A). LC100 y B). LB103 en medio LB después de 24 horas de incubación.

## 4.4 Actividad antagónica *in vivo*

### 4.4.1 Evaluación *in vivo* de la actividad antagónica de los aislamientos de BAFEs frente a *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* sobre plantas de lechuga

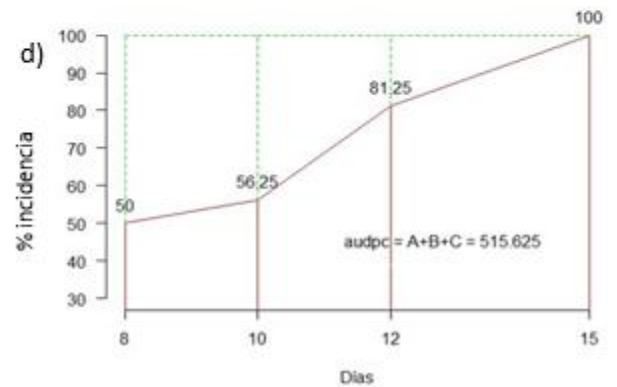
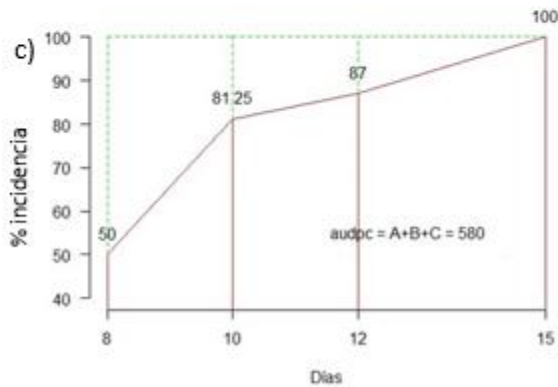
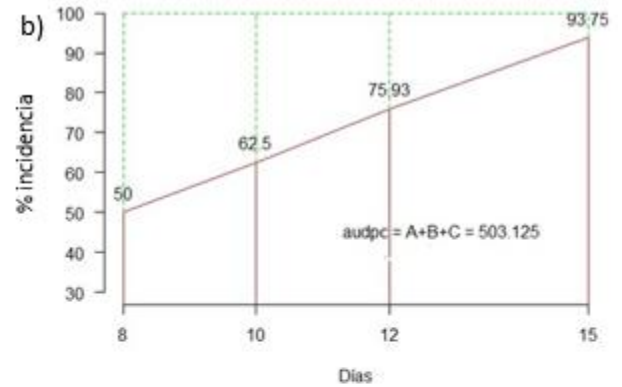
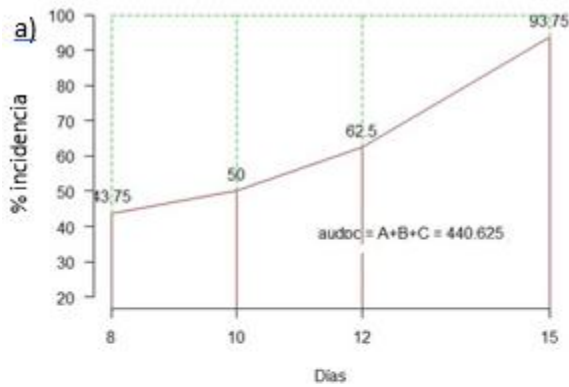
Aquellos aislamientos que presentaron actividad antagónica frente a la cepa LC100 en los ensayos *in vitro*, fueron evaluados sobre plantas de lechuga determinando incidencia y severidad, los valores para ambas variables y cada tratamiento se observan a continuación en la tabla 10. El análisis de varianza ANOVA de medidas repetidas determinó una influencia en el tiempo, pero no en la interacción tratamiento/día, razón por la cual se procedió a realizar una prueba intersujetos, con el fin de observar el comportamiento de los tratamientos al final del experimento. La prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% mostró que para incidencia únicamente el aislamiento 7p-03 presentó diferencias significativas respecto a los demás tratamientos y en severidad ninguno de los aislamientos mostró diferencias significativas respecto al control, sin embargo se destacan los aislamientos 7p-10, 7p-03, 2p-03 y 6p-06 que disminuyeron la severidad de la enfermedad en un 30.2%, 25.3%, 25.3% y 6.71% respectivamente, en comparación con el control.

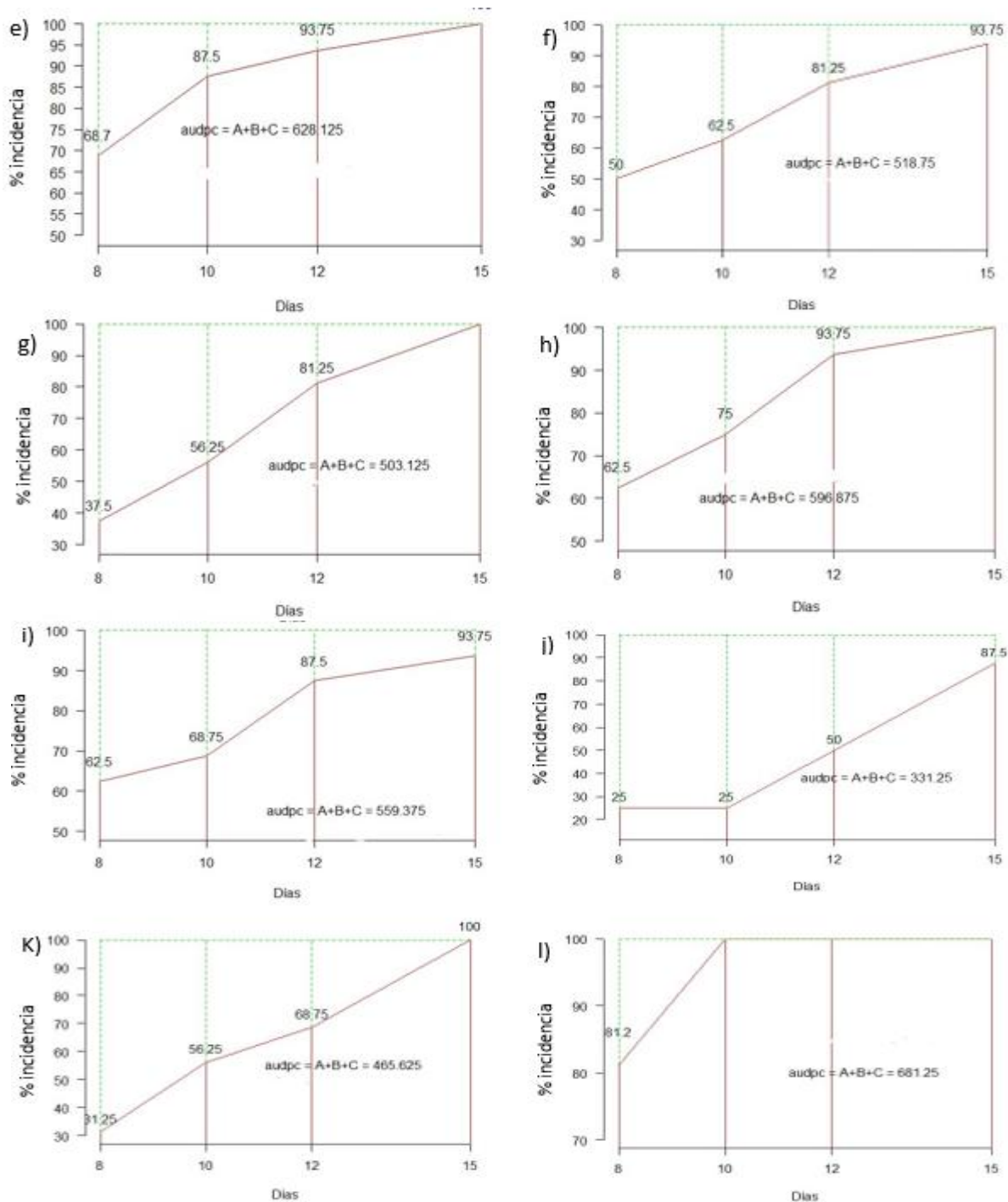
Los valores de AUDPC para incidencia y severidad se observan en la tabla 10. Las curvas del progreso de la enfermedad para cada uno de los tratamientos se muestran en las figuras 38 y 39.

**Tabla 10.** Efecto en la incidencia y severidad de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación foliar con los aislamientos de BAFEs.

Cepa	% incidencia	índice de severidad	AUDPC Incidencia	AUDPC Severidad
5p-01	100 A	2,37 A	628.13 A	10.750 A
6p-07	100 A	2,25 A	596.88 AB	10.000 A
7p-03	87.5 A	2 A	331.25 B	7.5000 A
2p-03	93.75 A	2 A	440.63 AB	7.5937 A
4p-07	100 A	2,25 A	515.63 AB	8.7500 A
2p-04	93.75 A	2,37 A	503.12 AB	10.125 A
4p-03	100 A	2,25 A	580 AB	10.125 A
5p-03	93.75 A	2,25 A	518.75 AB	9.6250 A
6p-06	100 A	2,5 A	503.13 AB	9.1563 A
5p-10	93.75 A	2,25 A	559.38 AB	9.3750 A
7p-10	100 A	1,87 A	465.625 AB	7.805 A
Control	100 A	2,68 A	685.25 A	12.52 A

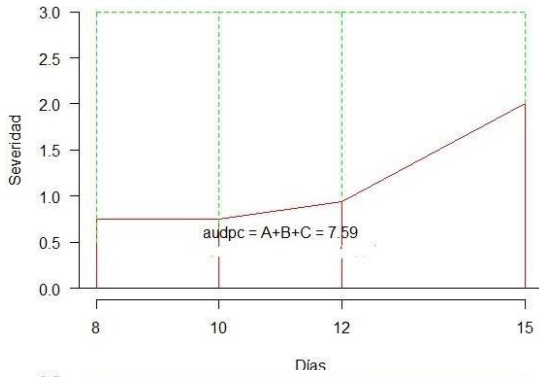
AUDPC: área del progreso de la enfermedad bajo la curva. Letras diferentes indican diferencias significativas, prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



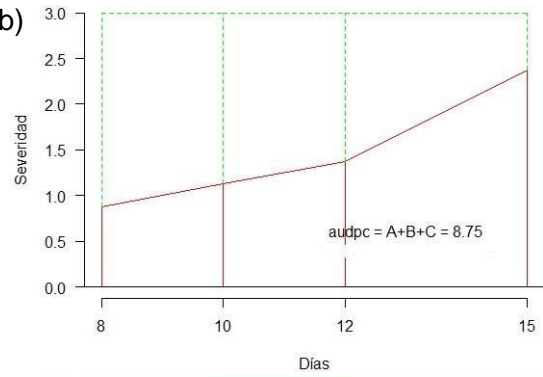


**Figura 38.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de porcentaje de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 2p-03, b). 2p-04, c). 4p-03, d). 4p-07, e). 5p-01, f). 5p-03, g). 6p-06, h). 6p-07, i).5p-10, j). 7p-03, k). 7p-10, l). Control de la enfermedad.

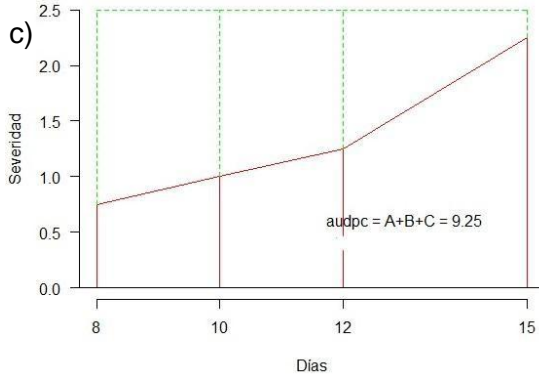
a)



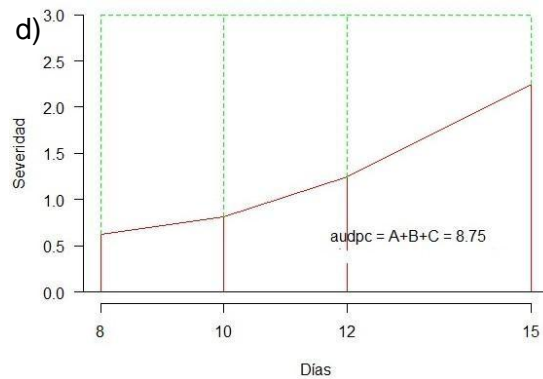
b)



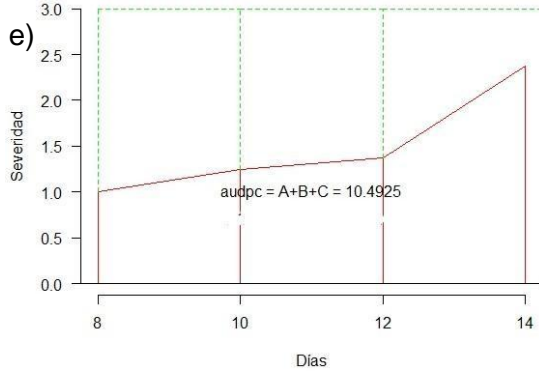
c)



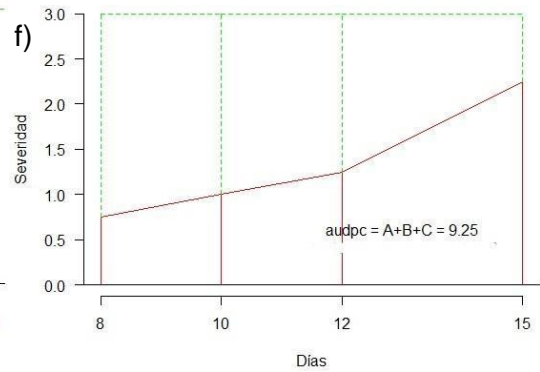
d)



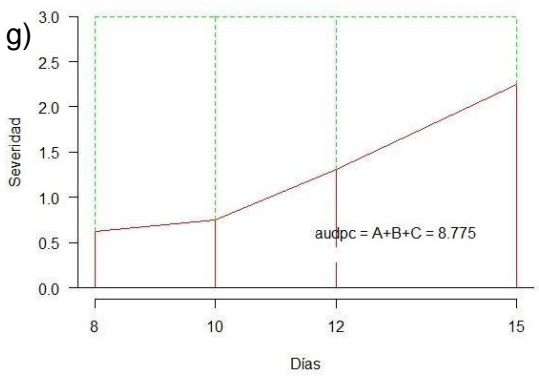
e)



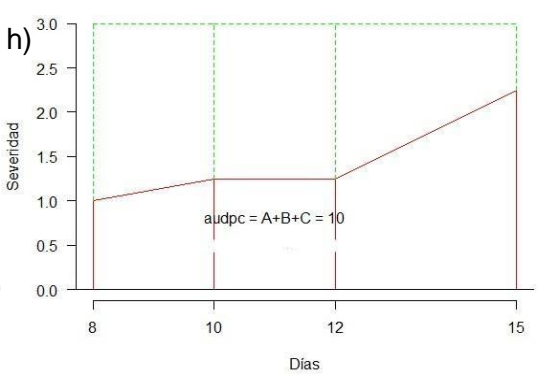
f)

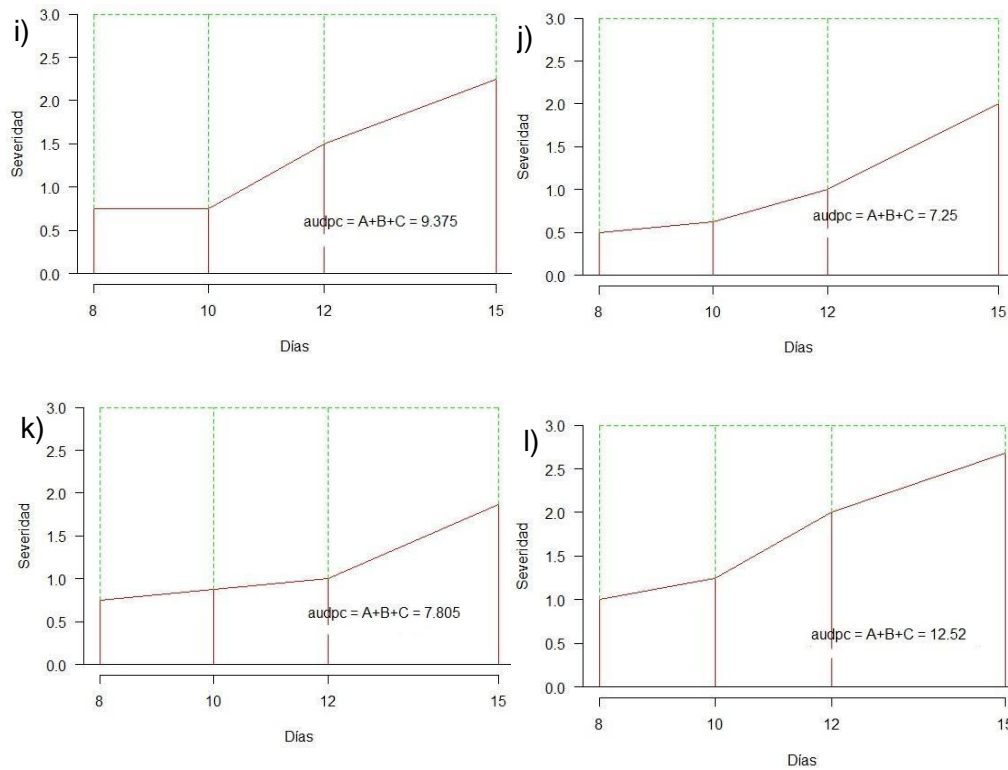


g)



h)





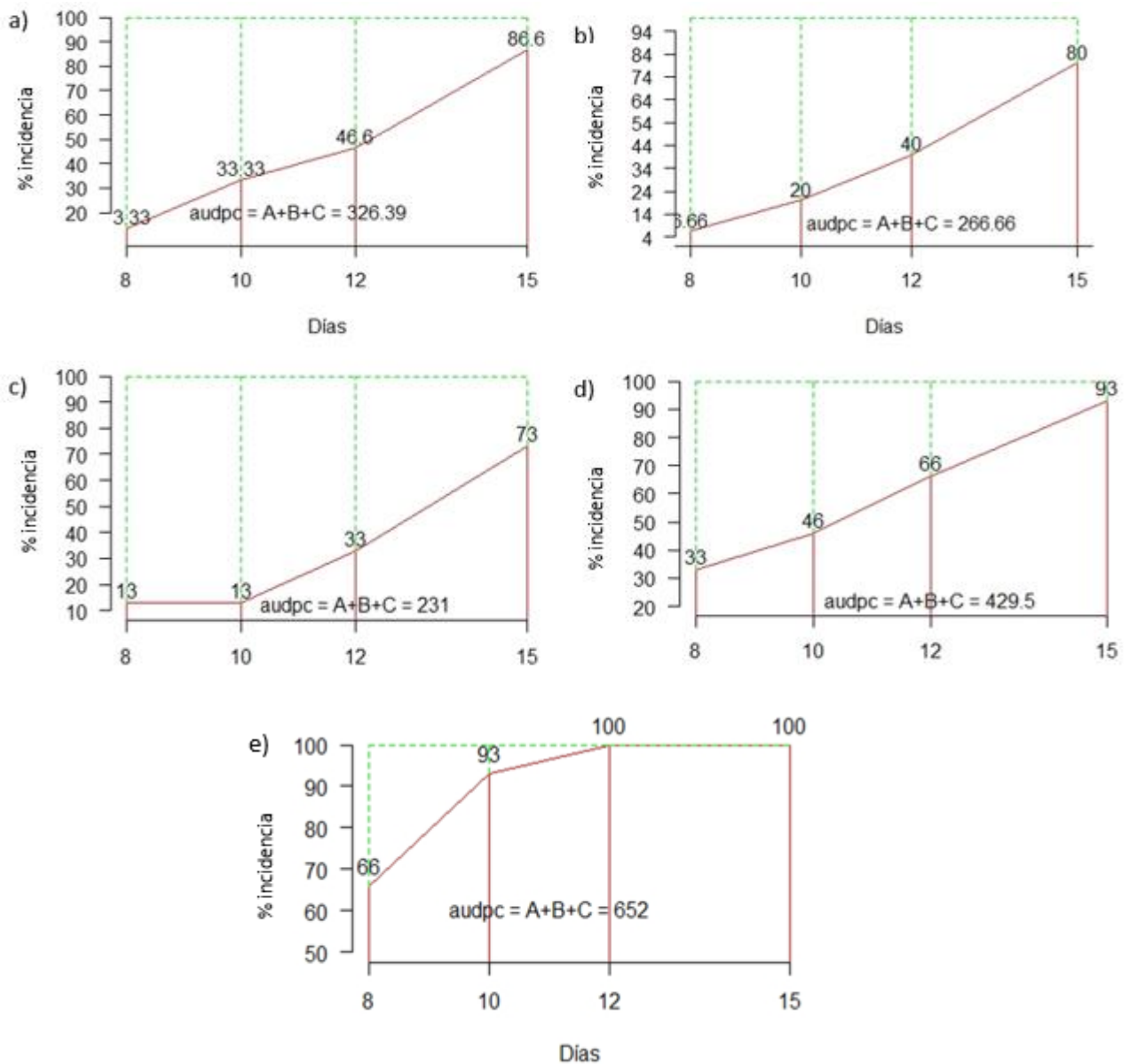
**Figura 39.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 2p-03, b). 2p-04, c). 4p-03, d). 4p-07, e). 5p-01, f). 5p-03, g). 6p-06, h). 6p-07, i).5p-10, j). 7p-03, k). 7p-10, l). Control de la enfermedad.

La repetición del ensayo de antagonismo *in vivo* se realizó con los aislamientos 2p-03, 7p-10, 6p-06 y 7p-03, debido a que fueron aquellos que mayor disminución de la enfermedad tuvieron respecto al control. En los resultados obtenidos se observó una disminución de la incidencia entre el 26.7% y 6.7%, y de la severidad entre el 12.5% y 25%, siendo los aislamientos 7p-03 y 2p-03 quienes mayor efecto en la disminución de la enfermedad presentaron, retrasando el desarrollo en las hojas inoculadas y por lo tanto su severidad. Los resultados obtenidos para porcentajes y AUDPC de incidencia y severidad se muestran a continuación en la tabla 11 en donde podemos observar diferencias significativas en los tratamientos con las cepas 7p-03 y 2p-03 respecto al control, aunque sin diferencias respecto a los demás tratamientos con BAFEs, las gráficas del progreso de la enfermedad AUDPC se observan en las figuras 40 y 41.

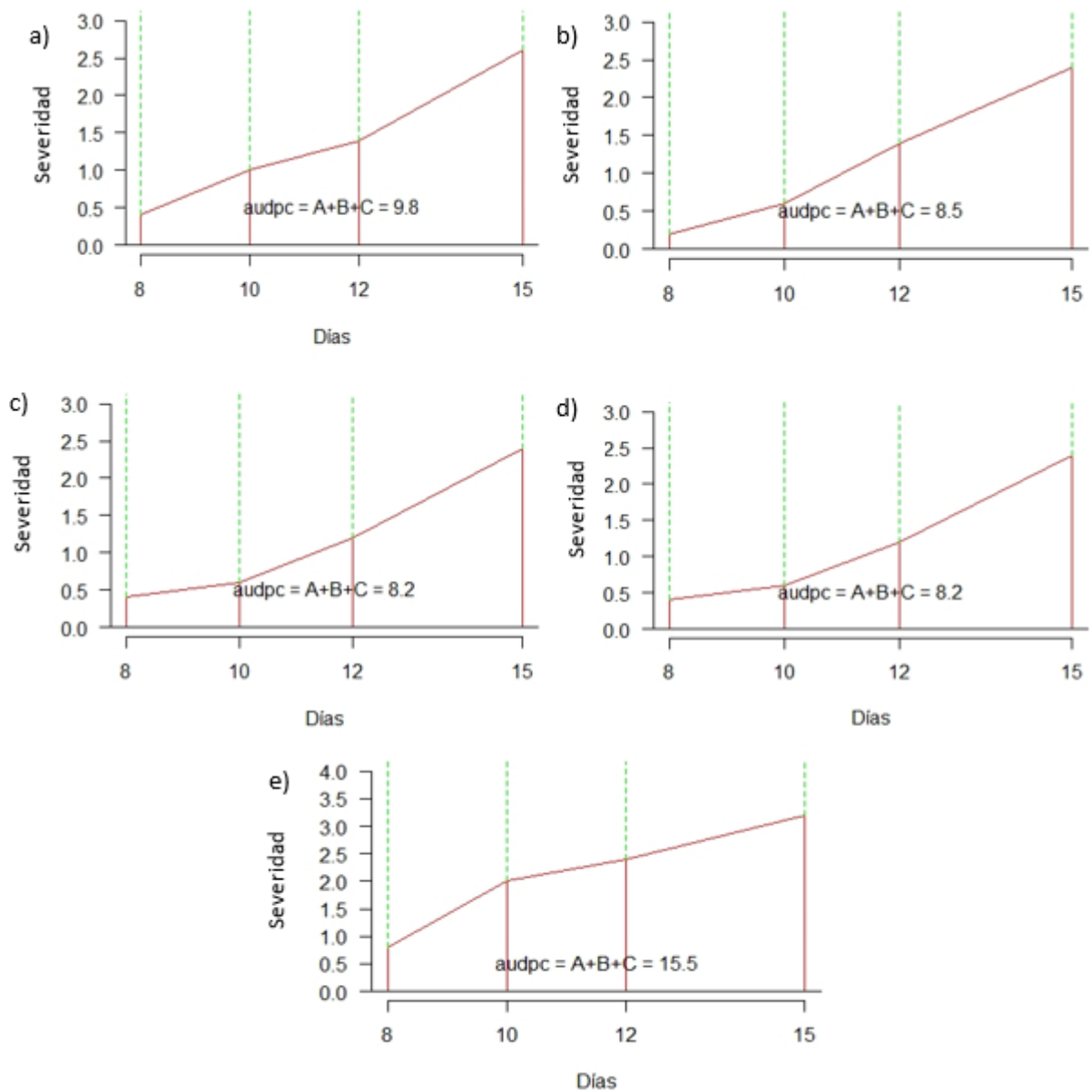
**Tabla 11.** Valores de incidencia y severidad de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación foliar con los aislamientos de BAFEs seleccionados

Cepa	% incidencia	Índice de severidad	AUDPC Incidencia	AUDPC Severidad
7p-03	73,33 A	2.4 A	231 B	8.2 A
2p-03	80 A	2.4 A	266.6 B	8.5 A
7p-10	86,6 A	2.6 A	326.29 AB	9.8 A
6p-06	93,3 A	2.8 A	429.5 AB	13.4 A
Control	100 A	3.2	652 A	15.5 A

AUDPC: área del progreso de la enfermedad bajo la curva. Letras diferentes indican diferencias significativas, prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ )



**Figura 40.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 7p-10, b). 2p-03, c). 7p-03, d). 6p-06, e). Control de la enfermedad.



**Figura 41.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 7p-10, b). 2p-03, c). 7p-03, d). 6p-06, e). Control de la enfermedad.

Actualmente un único estudio ha sido publicado evaluando el efecto del uso de *Bacillus* sp. en el control de la BLS en campo. En este estudio Bull y Koike (2005), evaluaron el efecto del uso de productos químicos y un producto a base de una cepa de *Bacillus subtilis*. El montaje de los ensayos de invernadero consistió en la aplicación rociada de una mezcla de tres cepas de *Xcv* dejadas en condiciones de humedad. Pasados 3 días los tratamientos fueron rociados de igual forma, los productos fueron aplicados seis veces durante todo el ciclo antes de la cosecha. Dentro de los resultados obtenidos encontraron inicialmente que la severidad e incidencia de la enfermedad fue mayor durante los ensayos desarrollados en otoño que en primavera, debido seguramente a la temperatura y las condiciones de humedad, por otro lado, respecto a la reducción de la enfermedad, únicamente encontraron diferencias significativas de la incidencia y la severidad en los tratamientos correspondientes a una mezcla del producto a base de *B. subtilis* y Cuprofix y la mezcla de Cuprofix y Maneb, la primera mezcla logro reducción en cuatro de los seis experimentos realizados y la segunda en dos, sin embargo, respecto a la severidad esta reducción no fue mayor al 36%, porcentaje que se asemeja a lo reportado por nosotros.

Los autores mencionan el hecho que la reducción en la incidencia solo fue posible cuando la enfermedad no alcanzó el 100% en el control, esto es promisorio, ya que de manera natural difícilmente la enfermedad alcanza su nivel más alto de incidencia. El tratamiento únicamente con *B. subtilis* no mostró diferencias significativas en la reducción de la severidad respecto al control, lo cual concuerda con lo encontrado por nosotros, sin embargo, los porcentajes de reducción con las BAFEs evaluadas fueron mayores a las reportadas por Bull y Koike (2005), lo cual refleja resultados promisorios, teniendo en cuenta adicionalmente que realizamos una única aplicación de los tratamientos.

A pesar de este vacío en los estudios de este patovar, para el control de otros patovares de *X. campestris*, mayores investigaciones han sido desarrolladas para evaluar el efecto antagonista de *Bacillus* sp. En los estudios realizados por Massomo et al., (2004), en donde diferentes aislamientos de *Bacillus* sp. fueron evaluados en antagonismo *in vitro* e *in vivo* para el control de *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) en plantas de repollo, encontraron que en la evaluación *in vitro* el 35% de los aislamientos de *Bacillus* tuvieron actividad antagonista contra el patógeno.

Respecto al antagonismo *in vivo* Massomo et al., (2004) desarrollaron dos experimentos en campo con diferencias respecto a las condiciones medio ambientales. En el primer experimento que se caracterizó por constantes lluvias y altas temperaturas y utilizando 16 de los aislamientos con actividad *in vitro*, se observó disminución en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, estos valores no fueron significativamente diferentes al control. Los autores le atribuyen este comportamiento a los factores ambientales, debido a que variables como alta humedad y precipitación constante favorecen el desarrollo de los patógenos foliares y conllevan a una alta severidad sobre su hospedero, disminuyendo la eficacia del control (Massomo et al., 2004). Estos resultados se asemejan al comportamiento observado por nosotros, en donde se obtuvo disminución en la severidad e incidencia de BLS en plantas de lechuga, pero sin diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, se debe tener en cuenta que durante la aplicación del patógeno y los días después a la inoculación, se mantuvieron condiciones de humedad altas y temperatura óptima para favorecer el ingreso de *Xcv* y el desarrollo de la enfermedad, lo que pudo dificultar el sistema de control por acción de los aislamientos de BAFEs.

En el segundo experimento en condiciones de baja lluvia y humedad, Massomo et al., (2004), encontraron disminución en los índices de severidad y rendimiento de plantas, observando que menor humedad y precipitación mejoran la acción de los *Bacillus* sp. El aislamiento 14 correspondiente a un *B. cereus* presentó los menores índices de severidad, aunque sin diferencias significativas respecto a los demás tratamientos con *Bacillus*. Este resultado concuerda con lo encontrado por nosotros, debido a que los menores resultados de incidencia y severidad se dieron con el aislamiento 7p-03 que por la identificación molecular corresponde a un *B. cereus*.

Respecto al sitio de inoculación, Massomo et al., (2004) obtuvieron los menores índices de enfermedad en la inoculación a raíz respecto a semillas y hojas. Sin embargo, ellos sugieren realizar varias aplicaciones foliares, debido a que los ensayos fueron llevados hasta cosecha, pero la inoculación se realizó una única vez en plántulas con pequeñas áreas foliares, por lo que las nuevas hojas podrían no estar protegidas ante el patógeno requiriendo más de una aplicación en campo.

Esto puede explicar el comportamiento evidenciado en las curvas de AUDPC de incidencia y severidad, especialmente con los aislamientos 7p-03 y 2p-03 los cuales en los primeros 10 días después de la inoculación muestran una notable reducción en la incidencia y la severidad de las plantas de lechuga, siendo del 85% y 70% respectivamente para el aislamiento 7p-03 y 78% y 70% para el aislamiento 2p-03. Sin embargo, a partir de los 12 días después de la inoculación aumenta de manera abrupta tanto la incidencia como la severidad de la enfermedad, sugiriendo que, en este momento, la acción de las BAFEs disminuye, requiriendo posiblemente una nueva aplicación.

Aunque las investigaciones realizadas y los resultados obtenidos en este artículo no encuentran una disminución en la enfermedad mayor al 50% con tratamientos biológicos, los estudios realizados con el uso de productos químicos tampoco son contundentes, dada la alta resistencia de las cepas de *Xcv* a los principios activos (Moss et al., 2007; Pernezny et al., 2008; Toussaint, 2019), razón por la cual se hace necesario continuar evaluando el modo, sitio y tiempo de aplicación de controladores biológicos para el manejo de esta enfermedad.

## 4.4 Identificación molecular

Los aislamientos seleccionados por su capacidad promotora y su actividad antagonista fueron identificados una vez se obtuvieron las secuencias de la amplificación del gen 16S rRNA. De 22 aislamientos identificados el 59% se ubicaron en el grupo cereus, identificados como *B. cereus* (3) y en su mayoría *B. mycooides*. (11), un 32% se ubicaron en el grupo subtilis identificados como *B. subtilis* (2), *B. velezensis* (2), *B. pumilus* (1), *B. megaterium* (1) y *B. xiamenensis* (1) por último un aislamiento fue identificado en el género de *Brevibacterium*. En la tabla 12 se muestra la identificación y el % de identidad (% ID) para cada aislamiento.

Los aislamientos 7p-03 y 6p-08, identificados como *B. cereus*, fueron descartados para los siguientes ensayos debido a que al ser la lechuga un producto de consumo humano, se evita la aplicación de microorganismos posiblemente peligrosos por su patogenicidad en humanos.

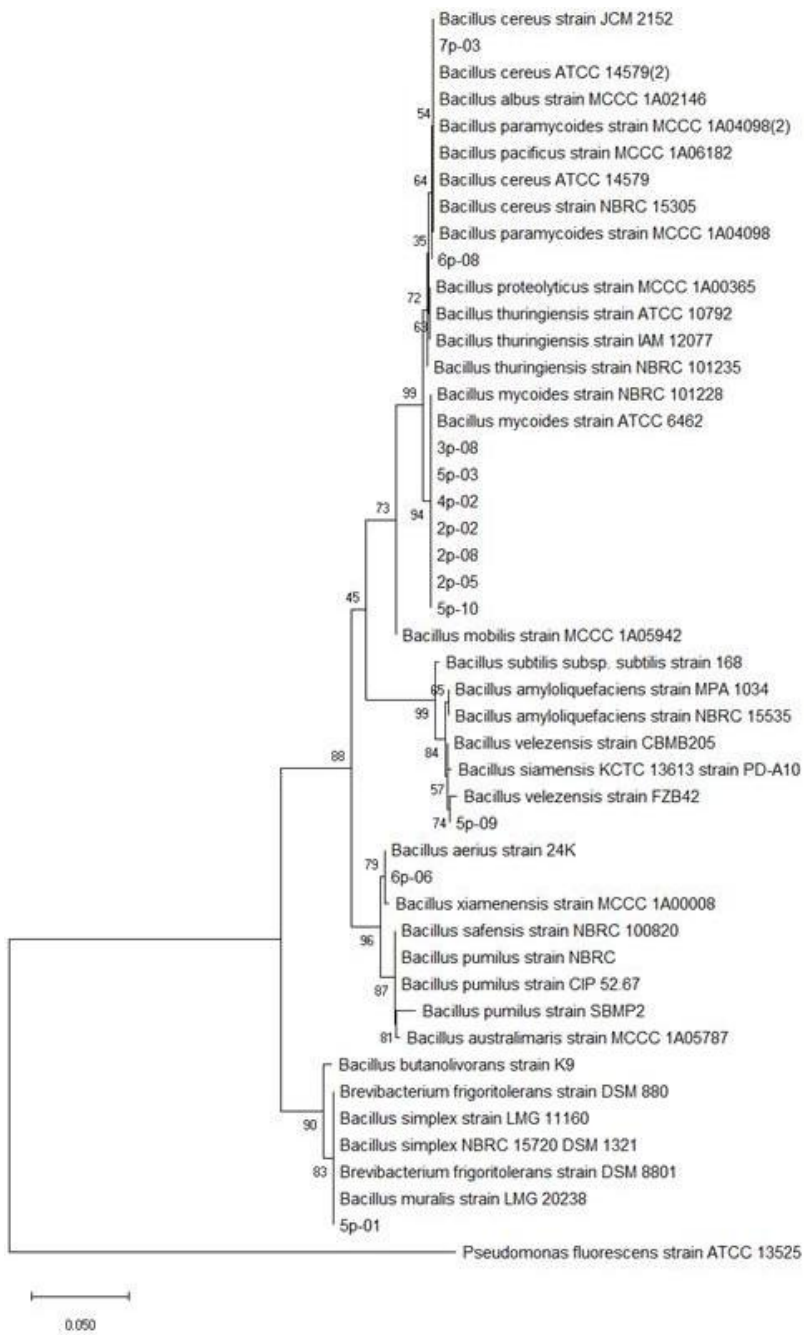
**Tabla 12.** Identificación molecular a partir de la región 16s de los aislamientos seleccionados

Promotoras			Antagonistas		
Aislamiento	Género	% ID	Aislamiento	Género	% ID
7p-07	<i>B. megaterium</i>	99%	7p-10	<i>B. subtilis</i>	100%
6p-03	<i>B. subtilis</i>	100%	6p-07	<i>B. pumilus</i>	100%
4p-03	<i>B. velenzensis</i>	100%	4p-07	<i>B. cereus</i>	100%
6p-01	<i>B. mycooides</i>	100%	2p-04	<i>B. mycooides</i>	100%
2p-05	<i>B. mycooides</i>	100%	2p-03	<i>B. mycooides</i>	100%
6p-08	<i>B. cereus</i>	100%	7p-03	<i>B. cereus</i>	99.8%
4p-02	<i>B. mycooides</i>	100%	5p-10	<i>B. mycooides</i>	100%
3p-02	<i>B. mycooides</i>	100%	5p-01	<i>Brevibacterium sp</i>	100%
5p-09	<i>B. velenzensis</i>	99.6%	5p-03	<i>B. mycooides</i>	100%
2p-08	<i>B. mycooides</i>	100%	6p-06	<i>B. xiamenensis</i>	99.6%
2p-02	<i>B. mycooides</i>	100%			
3p-08	<i>B. mycooides</i>	100%			

% ID: porcentaje de identidad según la base del NCBI.

Con la comparación de secuencias en la base de datos del NCBI y con ayuda del programa MEGA versión 7.0 se realizó el árbol de distancia filogenética en donde se ubican los aislamientos en cuestión (Figura 42).

Teniendo en cuenta el comportamiento de los aislamientos y en base a su identificación molecular, los aislamientos 4p-03 y 2p-03 fueron seleccionados en base a su acción promotora y antagonista, respectivamente, y fueron evaluados en un ensayo final que permitiera determinar la interacción de los dos aislamientos y el patógeno *Xcv* en una misma planta.

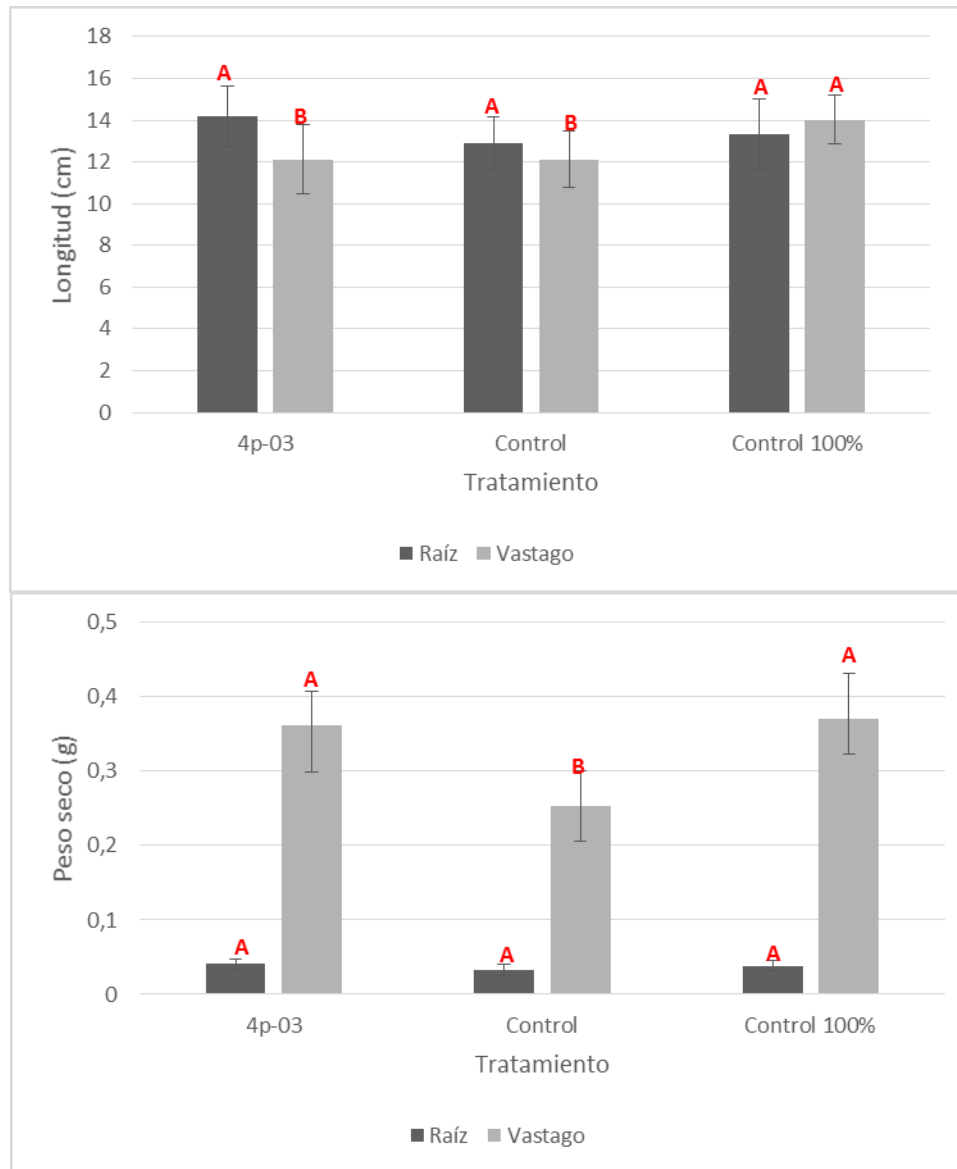


**Figura 42.** Árbol de distancia filogenética del género *Bacillus*. Se observa la división del grupo *Subtilis* y grupo *Cereus*. Se incluye la especie *Pseudomonas fluorescens* como outgroup.

#### **4.4 Evaluación de la promoción de crecimiento y antagonismo en una misma planta en presencia o no de *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*.**

Este ensayo final permitió observar la interacción entre los tres microorganismos (4p-03, 2p-03, LC100) en una misma planta de lechuga y contó con los controles correspondientes.

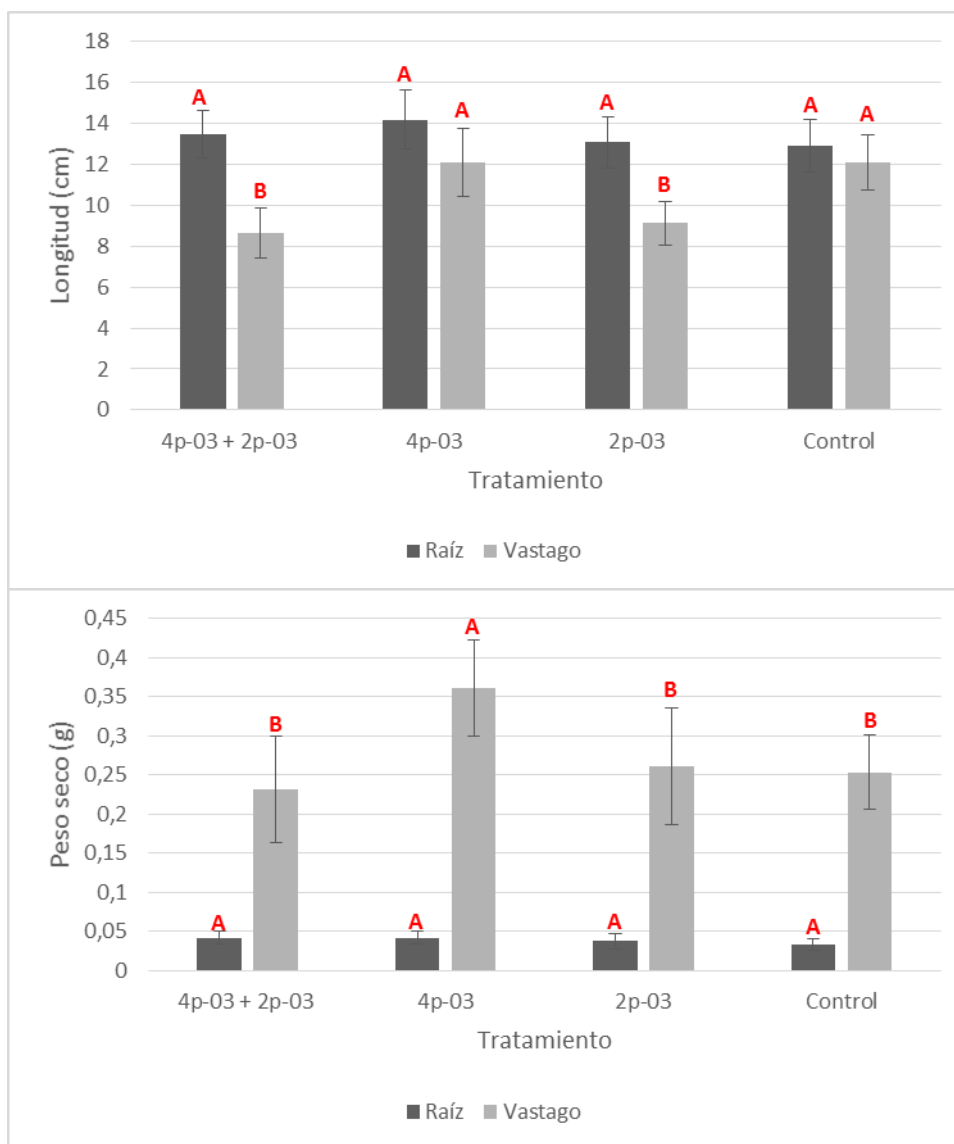
Respecto a la promoción de crecimiento, la figura 43 muestra los valores de longitud y peso seco de raíz y vástago con el aislamiento 4p-03 y el tratamiento con ADE bajo un régimen de fertilización con 50% de fósforo en solución de Hoagland y 50% en roca fosfórica; se incluye el control con 100% de fósforo soluble en solución de Hoagland. El tratamiento 4p-03 presentó diferencias significativas respecto al control con ADE en la variable de peso seco vástago, con un aumento del 42.5% en este parámetro. Del mismo modo se observó que el tratamiento con este aislamiento arroja valores similares sin diferencias significativas en las variables de longitud de raíz y peso seco de raíz y vástago respecto al tratamiento con 100% de fósforo soluble en solución de Hoagland, este resultado concuerda con lo obtenido en el ensayo anterior de 50% fósforo y es promisorio para los cultivos de lechuga, ya que el uso de enmiendas como la roca fosfórica son comunes en estos cultivos dado el alto costo de productos químicos a base de fósforo (Forero et al., 2010).



**Figura 43.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica, se incluye el control 100% que corresponde a solución de Hoagland con una dosis de fósforo al 100%. Se observa la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

La interacción entre los aislamientos 4p-03 y 2p-03 se observa a continuación en la figura 44, incluyendo los controles correspondientes a cada evaluación. En los resultados se visualiza la disminución en el efecto promotor del aislamiento 4p-03 en las plantas tratadas foliarmente con la cepa 2p-03, obteniendo valores menores o iguales al control

en las variables de longitud y peso seco de vástago en los tratamientos 2 (2p-03+4p-03) y 6 (2p-03). Este comportamiento resulta ser interesante debido a que la presencia del aislamiento 2p-03 en el área foliar, afecta el crecimiento de la planta y su respuesta frente a la promoción de crecimiento ejercida por la cepa 4p-03.



**Figura 44.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observan los tratamientos correspondientes a cada aislamiento de BAFEs (4p-03 y 2p-03) y el control. Se incluye la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

En condiciones naturales, las plantas son capaces de reconocer diversos estímulos y receptores moleculares asociados a microorganismos patógenos como (PAMPs) o no patógenos (MAMPs), principalmente flagelinas, lipopolisacáridos, factores de elongación o quitinasas (He et al., 2007; Henry et al., 2012; Van et al., 2008). En contacto con la planta estos patrones moleculares son reconocidos por receptores de la superficie celular, conocidos como PRRs (He et al., 2007). Aunque tanto microorganismos patógenos y no patógenos conllevan al mismo evento de reconocimiento, la planta es capaz de diferenciar estos microorganismos y modular su respuesta ante cada uno, activando diferentes genes y rutas de señalización (Henry et al., 2012). Frente a microorganismos benéficos se activa la respuesta sistémica inducida (ISR) relacionada especialmente con rutas dependientes del ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET), por otro lado, en presencia de patógenos se activa la respuesta sistémica adquirida (SAR) que además de activar rutas de AJ y ET activa principalmente la ruta del ácido salicílico (AS) (Henry et al., 2012; Van et al., 2008).

Huot et al., (2014) reportan que el costo por la activación de rutas de defensa tras el reconocimiento de estos patrones moleculares afecta el *fitness* de la planta en términos de crecimiento y desarrollo por diversos procesos como silenciamiento de vías, gasto energético, entre otras, además de las condiciones bióticas o abióticas del momento. Es importante tener en cuenta que la activación de la ISR no genera una protección total en el hospedero frente a un patógeno, pero prende las alarmas y la maquinaria de defensa para contrarrestar el ataque, esto traducido en términos de costos, genera menores afectaciones a procesos como desarrollo y crecimiento, siendo menor la disminución del crecimiento en ISR respecto a SAR, lo cual no es extraño, teniendo en cuenta que el objetivo de las PGPR es favorecer el desarrollo y la protección de la planta (Heil, 2001; Van Wees et al., 2008).

Sin embargo, algunos estudios han determinado que la activación de la defensa en ausencia de un patógeno o plaga genera aún mayores costos y disminuye el *fitness* de la planta (Heidel et al., 2004), fenómeno que concuerda con lo encontrado en este estudio, en donde la presencia de la cepa 2p-03 en ausencia del patógeno *Xcv* disminuye la actividad promotora y el crecimiento de las plantas de lechuga, evidenciado especialmente en la longitud y peso seco de vástago.

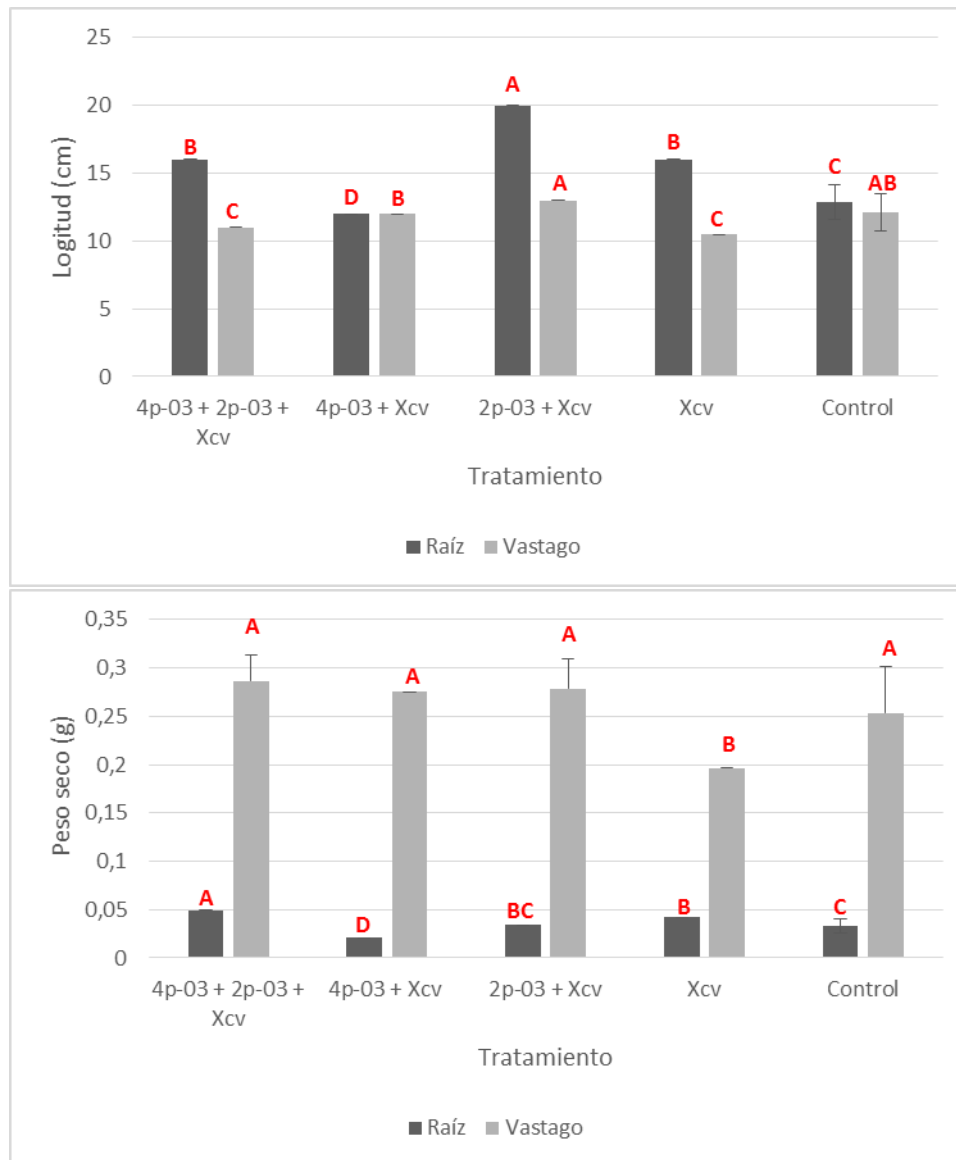
Los resultados de este estudio abren un panorama para conocer la interacción planta-microorganismo, en sentido de: i) la respuesta de la planta ante un microorganismo benéfico en el área foliar y en la raíz en un mismo momento ii) los costos asociados a ISR por el reconocimiento de microorganismos benéficos ya sea en el área foliar o radicular de la planta.

La interacción de los aislamientos 4p-03, 2p-03 y LC100 en las variables de respuesta de longitud y peso seco de raíz y vástago se muestran a continuación en la figura 45. En primer lugar, podemos observar que la presencia del patógeno disminuye significativamente los valores de peso seco de vástago respecto al control sin inocular, debido seguramente a su acción sobre el área foliar de las plantas, tales como necrosis, clorosis y muerte celular y adicionalmente por la activación de rutas de defensa en la planta, que como se mencionó anteriormente, generan altos costos en procesos de defensa adquirida (SAR) y por lo tanto un efecto negativo sobre el crecimiento. Diversos estudios han determinado el costo de la activación de rutas relacionadas con la producción de AS, encontrando disminución en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Heidel et al., 2004; Heil, Hilpert, Kaiser, y Linsenmair, 2000; Huot et al., 2014). Se sugiere que, dentro de las razones para la disminución de estos factores de crecimiento en presencia de AS, se encuentran: el bloqueo de vías relacionadas con la producción de hormonas de crecimiento, como auxinas, brasinoesteroides o giberelinas (Heil et al., 2000). Otra razón, es el costo de estas vías, con la activación de la ruta del ácido salicílico se ha encontrado la expresión de más de 413 genes, presentado en su mayoría sobreexpresión, adicionalmente se ha encontrado una reducción en la tasa de fotosíntesis (Heidel et al., 2004).

Sin embargo, es importante mencionar que en las plantas tratadas con los aislamientos 2p-03 y/o 4p-03 se observa una mejoría de estos atributos. En comparación con el control de la enfermedad, el tratamiento con la presencia de las dos cepas de BAFEs aumenta el peso seco de vástago en un 46%, el tratamiento con la cepa 2p-03 en un 41.8%, y el tratamiento con la 4p-03 en un 40.4%, lo cual se puede relacionar con la disminución en el impacto de los síntomas (necrosis, muerte del tejido foliar) ya sea por activación de ISR o por la actividad antagonista directa sobre el patógeno mediante la producción de sustancias antimicrobianas,

adicionalmente la activación de estos mecanismos de defensa contribuyen a la defensa por SAR, disminuyendo los costos de activación, viéndose reflejado en mejoras para el fitness de la planta. Estos resultados son importantes en términos de rendimiento y producción del cultivo, ya que, según Hayes et al., (2014) lechugas infestadas y con manifestaciones sintomatológicas avanzadas, presentan menor calidad y rendimiento y pueden presentar problemas de pérdidas en postcosecha.

Respecto a la severidad e incidencia de los tratamientos los resultados contrastan con lo evidenciado en la disminución de síntomas en términos de pérdida de peso seco de plantas, debido a que no se presentaron diferencias significativas respecto al control de la enfermedad. Los resultados muestran que el tratamiento con las cepas 4p-03 + 2p-03, 4p-03 y 2p-03 disminuyen el porcentaje de severidad de la enfermedad en un 29%, 29% y 14.5% respectivamente, lo que concuerda con los demás ensayos de control realizados en este estudio respecto a la 2p-03, y que en términos de la 4p-03 nos abre un panorama a la posibilidad de evaluación por ISR desde la aplicación de PGPR en raíz.

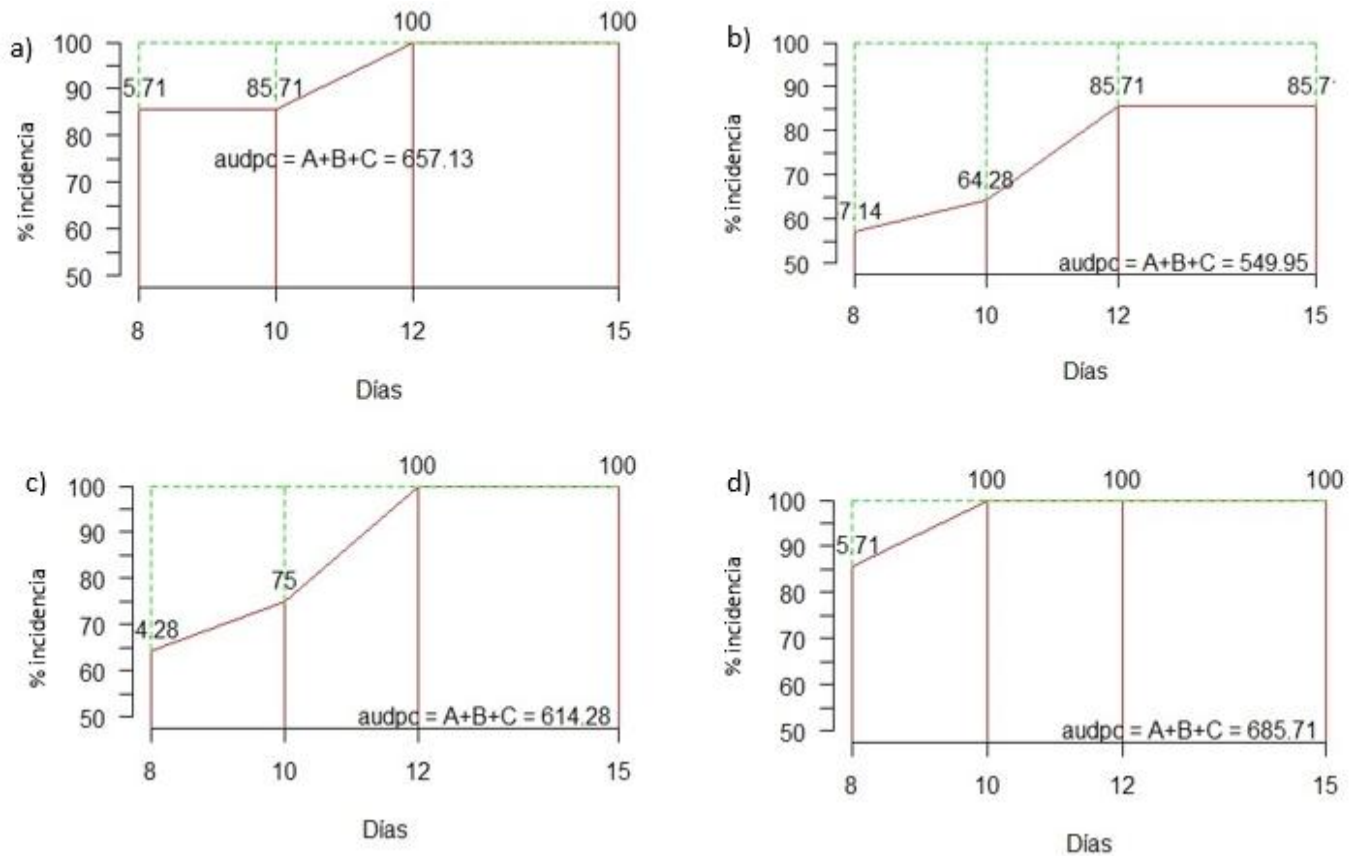


**Figura 45.** Variables de respuesta longitud (A) y peso seco (B) de raíz y vástago de lechuga, después de 35 días bajo invernadero con una dosis de fertilización de solución de Hoagland modificada con 50% de fósforo soluble y 50% de fósforo como roca fosfórica. Se observan los tratamientos correspondientes a cada aislamiento de BAFEs y *Xcv* (4p-03, 2p-03 y LC100) y el control. Se incluye la desviación estándar del promedio de 7 repeticiones por tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos bajo la prueba de varianza Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 13.** Valores de incidencia, severidad y AUDPC de BLS en hojas de lechuga Batavia Var Altamira, después de la inoculación con los aislamientos de BAFEs 4p-03 y 2p-03.

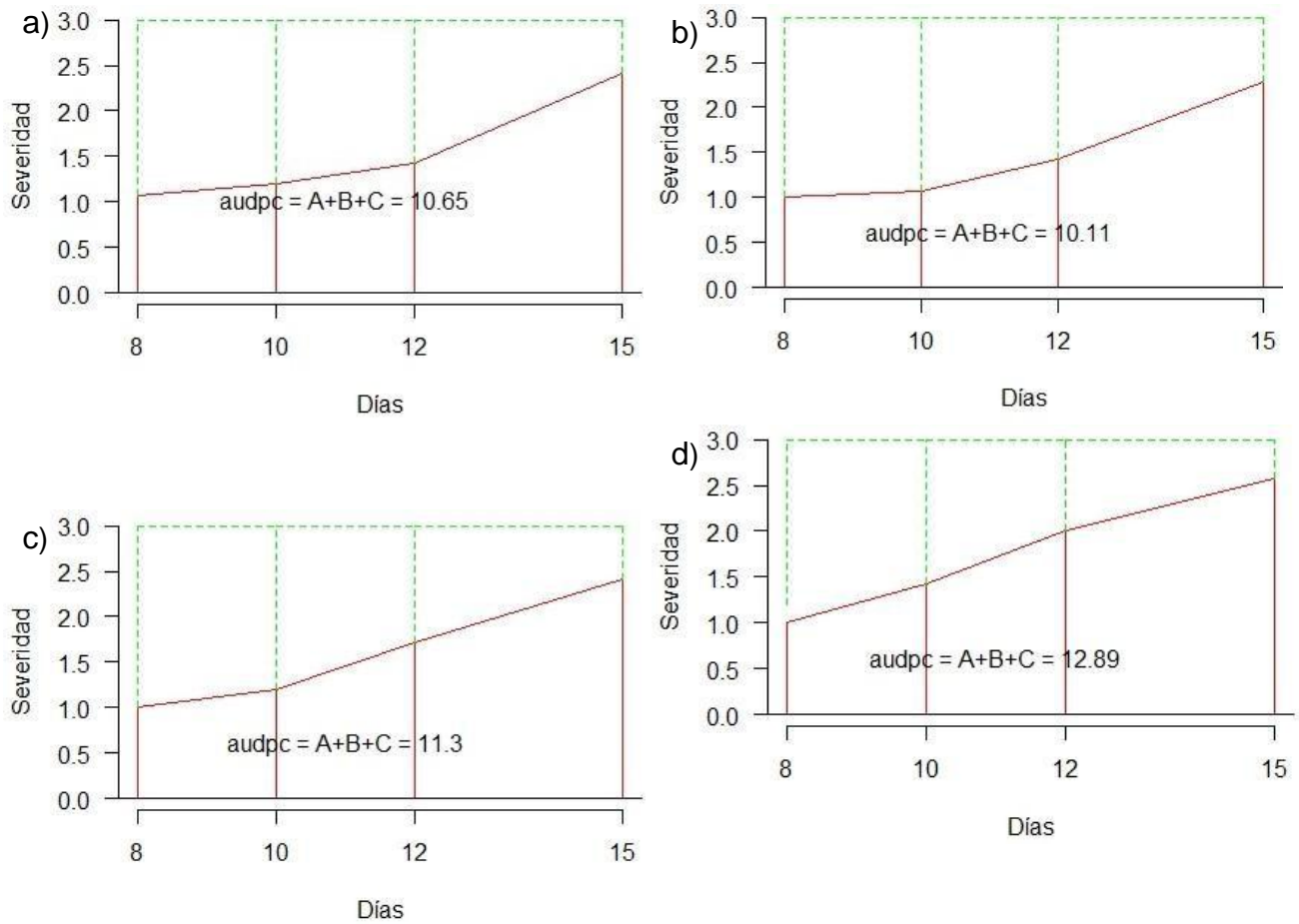
Tratamiento	% incidencia	Índice de severidad	AUDPC Incidencia	AUDPC Severidad
1	100 A	2,42 A	657.13 A	10.65 A
3	85.71 A	2,28 A	549.95 A	10.11 A
5	100 A	2,42 A	614.28 A	11.3 A
7	100 A	2, 57 A	685.71 A	12.89 A

Tratamiento, 1: 4p-03 + 2p-03 + LC100, 3: 4p-03 + LC100, 5: 2p-03 + LC100, 7: LC100.  
 Letras diferentes indican diferencias significativas. Prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 46.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC porcentaje de incidencia 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 4p-03+2p-03, b). 4p-03, c). 2p-03, d). Control de la enfermedad.





**Figura 47.** Curvas del progreso de la enfermedad AUDPC de severidad 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación con BAFEs y el aislamiento LC100 de *X. campestris* pv. *vitians* en plantas de lechuga, a). 4p-03+2p-03, b). 4p-03, c). 2p-03, d). Control de la enfermedad.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El aislamiento *Bacillus velezensis* 4p-03 mostró los mejores parámetros de promoción de crecimiento en ensayos de invernadero bajo una fertilización con diferentes niveles de fósforo en solución de Hoagland y roca fosfórica, mejorando especialmente los valores de peso seco de vástago, siendo una cepa promisoría para su uso en campo junto con la aplicación de enmiendas orgánicas a base de fósforo.

La evaluación de actividades relacionadas con promoción de crecimiento *in vitro*, indica que los doce aislamientos tuvieron actividad en la producción de ácido indol acético y solubilización de fosfatos, sin embargo, respecto a la mineralización de ácido fítico, tan solo el 75% de los aislamientos presentó esta actividad.

A partir de muestras de lechuga Batavia y Crespa con síntomas presuntivos de BLS y en base al perfil bioquímico, pruebas de patogenicidad e identificación molecular, se obtuvieron dos aislamientos identificados como *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* (*Xcv*). Este es el primer reporte que se hace de este patógeno en el país.

De los 50 aislamientos evaluados, once presentaron actividad antagónica *in vitro* frente a los dos aislamientos de *Xcv* aislados.

Los aislamientos de *B. cereus* 7p-03 y *B. mycooides* 2p-03 mostraron la mejor actividad antagonista *in vivo*, aunque sin diferencias significativas respecto al control, con un promedio de disminución de la severidad del 25,15% para ambas cepas.

La presencia del aislamiento LC100 de *Xcv* afecta el desarrollo de la planta, disminuyendo los valores de longitud y peso seco de vástago como efecto de los

síntomas sobre el área foliar, tales como clorosis y muerte.

Los aislamientos 2p-03 y 4p-03 de forma individual o conjunta contrarrestan el efecto negativo en biomasa causado por *Xcv*.

El aislamiento 2p-03 genera una disminución en el desarrollo de la planta en ausencia del patógeno, que la cepa 4p-03 no es capaz de contrarrestar, perdiendo su efecto promotor de crecimiento.

## 5.2 Recomendaciones

- Llevar los ensayos a campo, hasta final del ciclo del cultivo con el fin de determinar los beneficios en rendimiento y producción por efectos promotores y controladores de los aislamientos.
- Evaluar otras formas de aplicación de las BAFEs con actividad antagonista en términos de sitio, concentración y tiempo de inoculación, esperando encontrar mayores porcentajes de reducción en la severidad de la enfermedad.
- Incluir en los ensayos de antagonismo un control químico y biológico comercial, que funcionen como control positivo del ensayo e indiquen la efectividad de los tratamientos evaluados.
- Realizar un seguimiento a los aislamientos de BAFEs y *Xcv* en las diferentes partes de la planta, para determinar movilidad y endofitismo. De igual manera estudiar los fenómenos alrededor de la interacción de los aislamientos tales como SAR o ISR y su implicación en costos y fitness de la planta.

## Bibliografía

- Agronet. (2019). *Agronet*. Retrieved from <https://www.agronet.gov.co/Paginas/inicio.aspx>
- Agronet - MINAGRICULTURA. (2017). *Evaluaciones agropecuarias municipales - Lechuga*.
- Agyarko, K., Abunyewa, A., Kwasi Asiedu, E., y Heva, E. (2016). Dissolution of rock phosphate in animal manure soil amendment and lettuce growth. In *Eurasian Journal of Soil Science (EJSS)* (Vol. 5).  
<https://doi.org/10.18393/ejss.2016.2.084-088>
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Al-Saleh, M. A., Ibrahim, Y. E., Abo-Elyousr, K. A. M., y Alibrahim, J. S. (2011). Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* on different plant species and management of bacterial leaf spot of lettuce under greenhouse conditions. *Crop Protection*, 30(7), 883–887.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.032>
- Al-Saleh, M., y Ibrahim, Y. (2009). First Report of Bacterial Leaf Spot of Lettuce (*Lactuca sativa*) Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in Saudi Arabia. In *Plant Disease - PLANT DIS* (Vol. 93). <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-1-0107B>
- Alejandro Antúnez B., Sofía Felmer E., Patricia Estay P, Paulina Sepúlveda R, Fabio Corradini S, R., G. S. Del. (2017). *Manual de producción de lechuga*. Santiago de Chile.
- Ali, B., Sabri, A., Ljung, K., y Hasnain, S. (2008). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 25).  
<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9>

- Alkhader, A., Abu-Rayyan, A., y Rusan, M. (2013). The effect of phosphorus fertilizers on the growth and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under greenhouse and field conditions. In *Journal of Food, Agriculture and Environment* (Vol. 11).
- Alori, E. T., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2017). Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Alvez, B., Alonso, G., y Oropeza, M. (2016). GENOTIPIFICACIÓN Y PERFIL BIOQUÍMICO DE AISLADOS DE *Xanthomonas albilineans* EN VENEZUELA. *Interciencia*, 41(11), 732–739. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33948191002>
- Arkhipova, T., U. Veselov, S., Melent'ev, A., V. Martynenko, E., y Kudoyarova, G. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. In *Plant and Soil - PLANT SOIL* (Vol. 272). <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- ASOHOFRUCOL, C. C. I. C. (2007). *Plan Hortícola Nacional PHN*.
- ASOHOFRUCOL, y Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo rural. (2009). *Guía ambiental Hortofrutícola de Colombia*.
- Barak, J. D., Koike, S. T., y Gilbertson, R. L. (2001). Role of Crop Debris and Weeds in the Epidemiology of Bacterial Leaf Spot of Lettuce in California. *Plant Disease*, 85(2), 169–178. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.2.169>
- Barak, J., T. Koike, S., y Gilbertson, R. (2002). Movement of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in the stems of lettuce and seed contamination. In *Plant Pathology* (Vol. 51). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00730.x>
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., y Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 (suppl)), 1044–1051. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411488>
- Bull, C., y Koike, S. T. (2005). Evaluating the Efficacy of Commercial Products for Management of Bacterial Leaf Spot on Lettuce. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2005-1121-01-RS>
- Camara de comercio. (2015). Manual lechuga. *Producción y Calidad Vol. 22*, pp. 1–53. Retrieved from <http://hdl.handle.net/11520/14316>

- Carisse, O., Ouimet, A., Toussaint, V., y Phillion, V. (2000). Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Disease*, 84(3), 295–299. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.295>
- Cassan, F., Vanderleyden, J., y Spaepen, S. (2013). Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>
- Chan, J. W. Y. F., y Goodwin, P. H. (1999). The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances*, 17(6), 489–508. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00025-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00025-7)
- Choudhary, D. K., y Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493–513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Compant, S., Van der Heijden, M., y Sessitsch, A. (2010). Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. In *FEMS microbiology ecology* (Vol. 73). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x>
- DANE. (2016). *Encuesta nacional agropecuaria ENA*.
- Daniels, M. J. (1989). *Chapter 17 - Pathogenicity of Xanthomonas and Related Bacteria Towards Plants A2 - Hopwood, David A.* (K. F. B. T.-G. of B. D. Chater, Ed.). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-355574-8.50027-6>
- Vries, I. M. (1997). Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(2), 165–174. <https://doi.org/10.1023/A:1008611200727>
- Ednar, W., M. Mguni, C., Mortensen, C., L. Keswani, C., y Hockenhull, J. (2002). Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Brassicas with an Antagonistic Strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 108). <https://doi.org/10.1023/A:1015671031906>
- Elliot, C. (1931). Manual of Bacterial Plant Pathogens. *Soil Science*, 31(1). Retrieved from [https://journals.lww.com/soilsci/Fulltext/1931/01000/Manual\\_of\\_Bacterial\\_Plant\\_Pathogens.7.aspx](https://journals.lww.com/soilsci/Fulltext/1931/01000/Manual_of_Bacterial_Plant_Pathogens.7.aspx)
- Evidente, A., y Mottats, A. (2002). Bioactive metabolites from phytopathogenic bacteria and plants. In B. T.-S. in N. P. C. Atta-ur-Rahman (Ed.), *Bioactive Natural Products* (Vol. 26, pp. 581–628). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(02\)80015](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-5995(02)80015)
- FAOFAST. (2019). Retrieved from <http://www.fao.org/news/archive/news-by->

date/2019/es/

FINAGRO. (2014). *Perspectiva del sector agropecuario*.

Forero, A., Escobar, H., Medina, A., y Monsavel, O. (2010). *Uso de materiales Orgánicos en el manejo del suelo en cultivos de hortalizas* (Primera). Bogotá.

Fritze, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In *Phytopathology* (Vol. 94). <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1245>

G Santos, B., Lobato, A., Silva, R., Schimidt, D., C L Costa, R., A R Alves, G., y Neto, C. F. (2009). Growth of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) In Protected Cultivation and Open Field. In *Journal of Applied Sciences Research* (Vol. 5).

Galelli, M. E., Sarti, G. C., y Miyazaki, S. S. (2015). *Lactuca sativa* biofertilization using biofilm from *Bacillus* with PGPR activity. In *Journal of Applied Horticulture* (Vol. 17).

Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Specca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., y Stagnari, F. (2015). Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Scientia Horticulturae*, 187, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.036>

Gardener, B. (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. In *Phytopathology* (Vol. 94). <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252> Garrity, G., A Bell, J., y G Lilburn, T. (2003). Taxonomic Outline of the Prokaryotic

Genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In *Release 5.0*.

Gent, M. (2017). Factors Affecting Relative Growth Rate of Lettuce and Spinach in Hydroponics in a Greenhouse. In *HortScience* (Vol. 52). <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12477-17>

Goto, L. S., Vessoni Alexandrino, A., Malvessi Pereira, C., Silva Martins, C., D'Muniz Pereira, H., Brandão-Neto, J., y Marques Novo-Mansur, M. T. (2016). Structural and functional characterization of the phosphoglucosyltransferase from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(12), 1658–1666. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.014>

Gray, E. J., y Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395–412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>

- Gurdon, C., Poulev, A., Armas, I., Satorov, S., Tsai, M., y Raskin, I. (2019). Genetic and Phytochemical Characterization of Lettuce Flavonoid Biosynthesis Mutants. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39287-y>
- Guzman Rodriguez, L. (2007). *Presencia de bacterias fitopatógenas en hortalizas y su relación con la inocuidad alimentaria* (Universidad veracruzana). Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46912>
- Han, H. S., y Lee, K. D. (2006). Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. In *Plant, Soil and Environment* (Vol. 52). <https://doi.org/10.17221/3356-PSE>
- Hayes, R. J., Trent, M. A., Truco, M. J., Antonise, R., Michelmore, R. W., y Bull, C. T. (2014). The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. *Horticulture Research*, 1, 14066. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.66>
- He, P., Shan, L., y Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular Microbiology*, 9(6), 1385–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00944.x>
- Heidel, A. J., Clarke, J. D., Antonovics, J., y Dong, X. (2004). Fitness Costs of Mutations Affecting the Systemic Acquired Resistance Pathway in *Arabidopsis thaliana* *Genetics*, 168(4), 2197 LP – 2206. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032193>
- Heil, M. (2001). The Ecological Concept of Costs of Induced Systemic Resistance (ISR). *European Journal of Plant Pathology*, 107, 137–146. <https://doi.org/10.1023/A:1008793009517>
- Heil, M., Hilpert, A., Kaiser, W., y Linsenmair, K. E. (2000). Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology*, 88(4), 645–654. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2000.00479.x>
- Henry, G., Thonart, P., y Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: An update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 16, 257–268.
- Hernández, T., Chocano, C., Moreno, J.-L., y García, C. (2016). Use of compost as an alternative to conventional inorganic fertilizers in intensive lettuce (*Lactuca sativa* L.) crops—Effects on soil and plant. *Soil and Tillage Research*, 160, 14–22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.still.2016.02.005>
- Hoang, L., Joo, G.-J., Kim, W.-C., Jeon, S.-Y., Choi, S.-H., Kim, J.-W., Song, K.-S.

- (2005). Growth Inhibitors of Lettuce Seedlings From *Bacillus cereus* EJ-121. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 47). <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3217-3>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267–1287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Jaramillo Noreña, J., Aguilar Aguilar, P. A., Tamayo Molano, P. J., Agropecuaria., C. C. de I., (Colombia)., A., y Rural., S. de A. y D. (2016). *Modelo tecnológico para el cultivo de lechuga bajo buenas prácticas agrícolas en el Oriente Antioqueño*.
- Jorquera, M. A., Crowley, D. E., Marschner, P., Greiner, R., Fernández, M. T., Romero, D., De La Luz Mora, M. (2011). Identification of  $\beta$ -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(1), 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00995.x>
- Kanwa, S. (2011). Aerobic composting of water lettuce for preparation of phosphorus enriched organic manure. In *African Journal of Microbiology Research* (Vol. 5). <https://doi.org/10.5897/AJMR11.053>
- Kushima, M., Kakuta, H., Kosemura, S., Yamamura, S., Yamada, K., Yokotani-Tomita, K., y Hasegawa, K. (1998). An allelopathic substance exuded from germinating watermelon seeds. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 25). <https://doi.org/10.1023/A:1005907101778>
- Lebeda, A., Křístková, E., Kitner, M., Mieslerová, B., Jemelková, M., y Pink, D. A. C. (2014). Wild *Lactuca* species, their genetic diversity, resistance to diseases and pests, and exploitation in lettuce breeding. *European Journal of Plant Pathology*, 138(3), 597–640. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0254-z>
- López Cruz, I. L., van Willigenburg, L. G., y van Straten, G. (2003). Optimal control of nitrate in lettuce by a hybrid approach: differential evolution and adjustable control weight gradient algorithms. *Computers and Electronics in Agriculture*, 40(1), 179–197. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(03\)00019-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1699(03)00019-X)
- Lugtenberg, B., y Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Martínez F., Garcés, G. (2012). Crecimiento y producción de lechuga (*Lactuca sativa* L.var. romana) bajo diferentes niveles de potasio. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(2 SE-SECCION DE HORTALIZAS).

<https://doi.org/10.17584/rcch.2010v4i2.1239>

Marschner, P., y Rengel, Z. (2012). *Chapter 12 - Nutrient Availability in Soils* (P. B. T.-M. M. N. of H. P. (Third E. Marschner, Ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00012-1>

Martínez, O., Jorquera, M., Crowley, D. E., Gajardo, G., y Mora, M. L. (2010).

Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. In *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* (Vol. 10). <https://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>

Massomo, S., N. Mortensen, C., B. Mabagala, R., Newman, M.-A., y Hockenhull, J. (2004). Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. In *Journal of Phytopathology* (Vol. 152). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2003.00808.x>

Molinaro, A., Evidente, A., Lanzetta, R., Parrilli, M., y Zoina, A. (2000). O-specific polysaccharide structure of the aqueous lipopolysaccharide fraction from *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* strain 1839. *Carbohydrate Research*, 328(3), 435–439. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00112-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00112-9)

Moss, W. P., Byrne, J. M., Campbell, H. L., Ji, P., Bonas, U., Jones, J. B., y Wilson, M. (2007). Biological control of bacterial spot of tomato using hrp mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Biological Control*, 41(2), 199–206. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.01.008>

Nadeem, S., Naveed, M., Zahir, Z., y Hafi z Naeem Asghar, and. (2013). Plant–Microbe Interactions for Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances. In *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* (pp. 51–103). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_2)

Navarrete, F., y De La Fuente, L. (2015). Zinc detoxification is required for full virulence and modification of the host leaf ionome by *Xylella fastidiosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(4), 497–507. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0221-R>

Neocleous, D., y Savvas, D. (2019). The effects of phosphorus supply limitation on photosynthesis, biomass production, nutritional quality, and mineral nutrition in lettuce grown in a recirculating nutrient solution. *Scientia Horticulturae*, 252, 379– 387. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.007>

- Nicolas, O, Charles, M. T., Jenni, S., Toussaint, V., Parent, S.-É., y Beaulieu, C. (2019). The ionomics of lettuce infected by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00351>
- Nicolas, Olbert, Charles, M., Jenni, S., Toussaint, V., & Beaulieu, C. (2018). Relationships between *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* population sizes, stomatal density and lettuce resistance to bacterial leaf spot. In *Canadian Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1495269>
- Noumedem, J. A. K., Djeussi, D. E., Hritcu, L., Mihasan, M., y Kuete, V. (2017). Chapter 20 - *Lactuca sativa* (V. B. T.-M. S. and V. from A. Kuete, Ed.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00020-0>
- Ogugua, U., Ntushelo, K., Makungu, M. C., y Kanu, S. (2018). Effect of *Bacillus subtilis* BD233 on seedlings growth of sweet pepper (*Capsicum annuum*), Swiss chard (*Beta vulgaris*) and lettuce (*Lactuca sativa*). In *Acta Horticulturae*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1204.26>
- Panhwar, Q., Othman, R., A Rahman, Z., Meon, S., y Mohd Razi, I. (2011). Role of phosphate solubilizing bacteria on rock phosphate solubility and growth of aerobic rice. In *Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India* (Vol. 32).
- Patten, C., & Glick, B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. In *Canadian journal of microbiology* (Vol. 42). <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Pearson, S., Wheeler, T. R., Hadley, P., y Wheldon, A. E. (1997). A validated model to predict the effects of environment on the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.): Implications for climate change. In *Journal of Horticultural Science* (Vol. 72). <https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515538>
- Pernezny, K., Nagata, R., Havranek, N., y Sanchez, J. (2008). Comparison of two culture media for determination of the copper resistance of *Xanthomonas* strains and their usefulness for prediction of control with copper bactericides. *Crop Protection*, 27(2), 256–262. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.05.012>
- Peyraud, R., Dubiella, U., Barbacci, A., Genin, S., Raffaele, S., y Roby, D. (2017). Advances on plant-pathogen interactions from molecular toward systems biology perspectives. *The Plant Journal For Cell and Molecular Biology*, 90(4), 720–737. <https://doi.org/10.1111/tbj.13429>
- Pishchik, V. N., Vorobyov, N. I., Walsh, O. S., Surin, V. G., y Khomyakov, Y. V. (2016).

- Estimation of synergistic effect of humic fertilizer and *Bacillus subtilis* on lettuce plants by reflectance measurements. *Journal of Plant Nutrition*, 39(8), 1074–1086. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1061551>
- Radhakrishnan, R., Hashem, A., y Abd Allah, E. F. (2017). Bacillus: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Frontiers in Physiology*, 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>
- Radhakrishnan, R., & Lee, I.-J. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109, 181–189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.018>
- Ramesh, A., Sharma, S., Yadav, N., y Joshi, O. (2014). Phosphorus Mobilization from Native Soil P-Pool upon Inoculation with Phytate-Mineralizing and Phosphate-Solubilizing *Bacillus aryabhatai* Isolates for Improved P-Acquisition and Growth of Soybean and Wheat Crops in Microcosm Conditions. In *Agricultural Research* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1007/s40003-014-0105-y>
- Robinson, P. E., Jones, J. B., y Pernezny, K. (2006). Bacterial leaf spot of lettuce: Relationship of temperature to infection and potential host range of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Disease*, 90(4), 465–470. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0465>
- Rosseto, F. R., Manzi, L. R., de Oliveira Neto, M., y Polikarpov, I. (2016). Biophysical and biochemical studies of a major endoglucanase secreted by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 91, 1–7. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.05.007>
- Sahin, F., & Miller, S. A. (1997). Identification of the bacterial leaf spot pathogen of lettuce, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, in Ohio, and assessment of cultivar resistance and seed treatment. *Plant Disease*, 81(12), 1443–1446. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1443>
- Sahoo, R., Ansari, M., Pradhan, M., Dangar, T., Mohanty, S., y Tuteja, N. (2014). Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. In *Protoplasma*. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0607-7>
- Sánchez López, D. B., García Hoyos, A. M., Romero Perdomo, F. A., y Bonilla Buitrago, R. R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston TT - Effect of plant growth promoting rhizobacteria phosphate solubilizing *Lactuca sativa* cultivar White Boston.

- Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 122–128.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077>
- Scala, F., Evidente, A., Coppola, L., Capasso, R., Lorito, M., y Zoina, A. (1996) Identification and phytotoxicity of 3-methylthiopropionic and trans-3- methylthiopropionic acids produced in culture by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Journal of Phytopathology*, 144(6), 325–329. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb01537.x>
- Sharma, A., Gautam, S., y Wadhawan, S. (2014). *Xanthomonas A2 - Batt, Carl A.* (M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, Ed.). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00359-1>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Shukla, A. K. (2019). *Chapter One - Ecology and Diversity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Landscape* (A. K. Singh, A. Kumar, y P. K. B. T.-P. A. in S. A. Singh, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00001-X>
- Singh, R. (2019). *Chapter 8 - Microbial Biotechnology: A Promising Implement for Sustainable Agriculture* (J. S. Singh & D. P. B. T.-N. and F. D. in M. B. and B. Singh, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00008-0>
- Szczech, M., Szafirowska, A., Kowalczyk, W., Szwejda-Grzybowska, J., Włodarek, A., y Maciorowski, R. (2016). The Effect of Plant Growth Promoting Bacteria on Transplants Growth and Lettuce Yield in Organic Production. In *Journal of Horticultural Research* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1515/johr-2016-0026>
- T P Ferreira, J., Santos, T. M., S Albuquerque, L., Santos, J., Cardoso Filho, J., y E Ramalho Neto, C. (2011). *Isolation and selection of growth-promoting bacteria of the genus Bacillus and its effect on two varieties of lettuce (Lactuca sativa L.)*.
- THEODORACOPOULOS, M., LARDIZABAL, R., & ARIAS, S. (2009). *MANUAL DE PRODUCCIÓN - PRODUCCIÓN DE LECHUGA*. Honduras.
- Tiwari, S., Prasad, V., y Lata, C. (2019). *Chapter 3 - Bacillus: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment* (J. S. Singh & D. P. B. T.-N. and F. D. in M. B. and B. Singh, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>

- Toussaint, V, Benoit, D. L., y Carisse, O. (2012). Potential of weed species to serve as a reservoir for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Crop Protection*, 41, 64–70.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.018>
- Toussaint, V, Morris, C. E., y Carisse, O. (2001). A new semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Disease*, 85(2), 131–136.
- Toussaint, Vicky. (2019). *Ecology of Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in relation to development of bacterial leaf spot of lettuce by Vicky Toussaint.
- Uchida, R. S. (2000). Essential nutrients for plant growth: Nutrient functions and deficiency symptoms. In *Plant Nutr Manag Hawaii's Soils* (Vol. 3).
- Vallad, G., y M. Goodman, R. (2004). Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. In *Crop Science - CROP SCI* (Vol. 44). <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.1920>
- Van Henten, E. J. (1994). Validation of a dynamic lettuce growth model for greenhouse climate control. *Agricultural Systems*, 45(1), 55–72.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-521X\(94\)90280-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-521X(94)90280-1)
- Van Wees, S. C. M., Van der Ent, S., & Pieterse, C. M. J. (2008). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(4), 443–448. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005>
- Vauterin, L., Rademaker, J., y Swings, J. (2000). Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. In *Phytopathology* (Vol. 90).  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.7.677>
- Velásquez V, P., Ruíz E, H., Chaves J, G., y Luna C, C. (2014). Productividad de Lechuga *Lactuca Sativa* en condiciones de Macrotúnel en suelo Vitric Haplustands . *Revista de Ciencias Agrícolas*, Vol. 31, pp. 93–105. scieloco.
- Velázquez, M. S., Cabello, M. N., Elíades, L. A., Russo, M. L., Allegrucci, N., y Schalamuk, S. (2017). Combinación de hongos movilizadores y solubilizadores de fósforo con rocas fosfóricas y materiales volcánicos para la promoción del crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 347–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.07.005>
- Wheeler, T. R., Hadley, P., Morison, J. I. L., y Ellis, R. H. (1993). Effects of temperature on the growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) and the implications for assessing the impacts of potential climate change. *European Journal of Agronomy*, 2(4), 305–311.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(14\)80178-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1161-0301(14)80178-0)

Yobo, K. S., Laing, M. D., y Hunter, C. H. (2004). Effect of commercially available rhizobacteria strains on growth and production of lettuce, tomato and pepper. *South African Journal of Plant and Soil*, 21(4), 230–235. <https://doi.org/10.1080/02571862.2004.10635054>

Złotek, U., Gawlik-Dziki, U. (2015). Selected biochemical properties of polyphenol oxidase in butter lettuce leaves (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) elicited with dl- $\beta$ - amino-n-butyric acid. *Food Chemistry*, 168, 423–429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.033>